

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Atividade fotoprotetora de extratos de *Punica granatum* L.: avaliação *in vitro*

Hugo Ricardo Pinto Cardoso

Trabalho de campo orientado pela Professora Doutora Lúcia Maria Veloso Pinheiro, Professora Auxiliar e coorientado pela Professora Doutora Rita Maria Olivença Trindade dos Santos Serrano, Professora Auxiliar

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Atividade fotoprotetora de extratos de
Punica granatum L.: avaliação *in vitro***

Hugo Ricardo Pinto Cardoso

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Trabalho de campo orientado pela Professora Doutora Lúcia Maria
Veloso Pinheiro, Professora Auxiliar e coorientado pela Professora
Doutora Rita Maria Olivença Trindade dos Santos Serrano, Professora
Auxiliar

2021

Resumo

A radiação ultravioleta (UV) em excesso promove graves problemas de pele tais como eritema solar, fotoenvelhecimento e cancro de pele. Os filtros solares atuam na prevenção de doenças através de filtros químicos (origem sintética ou natural) e filtros físicos. De uma forma geral, os filtros físicos refletem as radiações UV e os filtros químicos absorvem a energia das radiações UV. Os filtros solares químicos de origem natural com atividade fotoprotetora são desenvolvidos para formulações dermocosméticas. Estas substâncias químicas devem ser atóxicas e compatíveis com o veículo do produto dermocosmético. Além disso, devem apresentar estabilidade físico-química ao longo de um determinado tempo. A romã (*Punica granatum* L.) é fruto de uma árvore cultivada em grande parte do planeta. No interior do fruto existem sementes carnudas. Estudos encontrados na literatura demonstram que a romã contém compostos químicos propícios para fotoproteção, tais como, antioxidantes, antocianinas e compostos fenólicos. Neste trabalho experimental foram preparados extratos de material vegetal fresco de romã com diferentes solventes: extrato puro, extrato aquoso, extrato hidroalcoólico, extrato glicólico e extrato oleoso. Estes extratos foram incorporados em gel de carbopol. Foi determinado o fator de proteção solar *in vitro* dos diferentes extratos de romã e extratos de romã incorporados em gel. A determinação do fator de proteção solar foi feita através do método de Mansur por ser uma metodologia simples e de baixo custo. A estabilidade acelerada dos geles com extratos de romã foi efetuada através de análises físico-químicas (pH e viscosidade) e características organolépticas. Perante os resultados obtidos verificou-se que as características organolépticas e físico-químicas não sofreram grandes alterações ao longo do estudo de estabilidade acelerada de 28 dias. O fator de proteção solar nos extratos e gel com extratos estudados apresentaram valores muito baixos, abaixo do valor mínimo considerado para a atividade fotoprotetora. Estes resultados mostraram a necessidade de otimização da metodologia de extração de compostos químicos presentes na romã para melhorar o nível do fator de proteção solar.

Palavras-chave: *Punica granatum*; Fator de proteção solar; Estabilidade acelerada

Abstract

Ultraviolet (UV) radiation in excess leads to skin problems such as sunburn erythema, photoaging and cancer. The purpose of the sunscreens is to prevent diseases through chemical filters (synthetic or natural) and physical filters. Generally, physical filters reflect UV radiation and chemical filters acts on the absorption of energy from UV radiation. Chemical sunscreens of natural origin with photoprotective activity are developed for dermocosmetic formulations. These substances must be non-toxic and compatible with the vehicle of the dermocosmetic product. In addition, they must show physicochemical stability over a certain period of time. The pomegranate (*Punica granatum* L.) is the fruit of a tree cultivated in a large part of the planet. Inside the fruit are succulent seeds. Studies found in the literature demonstrate that pomegranate contains chemical compounds likely to result in successful photoprotection, such as antioxidants, anthocyanins and phenolic compounds. In this experimental work, extracts of fresh plant material from pomegranate were prepared with different solvents: pure extract, aqueous extract, hydroalcoholic extract, glycolic extract and oil extract. These extracts were incorporated into carbopol gel. The *in vitro* sun protection factor of different pomegranate extracts and pomegranate extracts incorporated in gel was determined. The determination of the sun protection factor was based on the method of Mansur because it is a simple methodology and of low cost. The accelerated stability of gels with pomegranate extracts was performed through physical-chemical analyses (pH and viscosity) and organoleptic characteristics. Based on the results obtained, it was verified that the organoleptic and physical-chemical characteristics did not change after 28 days of accelerated stability. The sun protection factor in the studied extracts and gel with extracts had very low values, below to the minimum value considered for photoprotection. These results led to the need to optimize the methodology for extracting chemical compounds present in pomegranate in order to improve the level of sun protection factor.

Keywords: *Punica granatum*; Sun protection factor; Accelerated stability

Agradecimentos

Agradeço à Professora Rita Serrano e à Professora Lídia Pinheiro por terem aceite o tema e a orientação deste trabalho de campo.

Agradeço ao Professor Luís Gouveia e Joana Marto pela cedência do laboratório e apoio na execução do trabalho experimental durante o período de confinamento resultante da situação pandémica.

Abreviaturas

EE - efeito eritematogénico

FPS – fator de proteção solar

ROS – espécies Reativas de Oxigénio

UV – radiação ultravioleta

UVA – radiação ultravioleta A

UVB – radiação ultravioleta B

UVC – radiação ultravioleta C

Índice geral

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Revisão bibliográfica | 11 |
| 2.1 Radiação solar | 11 |
| 2.2 Filtros solares | 12 |
| 2.3 Formulações de fotoprotetores | 13 |
| 2.4 Determinação do fator de proteção solar | 14 |
| 2.5 Ensaio físico-químico | 14 |
| 2.5.1 Ensaio químico | 15 |
| 2.5.2 Ensaio físico | 15 |
| 2.6 Estudo de estabilidade | 15 |
| 2.7. <i>Punica granatum</i> | 16 |
| 3. Objetivos | 18 |
| 3.1. Objetivo principal | 18 |
| 3.2. Objetivos específicos | 18 |
| 4. Parte experimental | 19 |
| 4.1. Reagentes | 19 |
| 4.2. Material vegetal | 19 |
| 4.3. Materiais e equipamentos | 19 |
| 4.4. Procedimento experimental | 20 |
| 4.4.1 Preparação de extratos de <i>P. granatum</i> | 20 |
| 4.4.2 Preparação do gel com extratos de <i>P. granatum</i> | 21 |
| 4.4.3 Ensaio de controlo de qualidade | 21 |
| 4.4.3.1 Ensaio organolético | 21 |
| 4.4.3.2 Determinação de pH | 21 |
| 4.4.3.3 Determinação da viscosidade | 22 |
| 4.4.3.4 Determinação do fator de proteção solar | 22 |
| 4.4.4 Estudo de estabilidade acelerada | 23 |
| 5 Resultados e discussão | 26 |
| 5.1 Ensaio organolético e determinação de pH | 26 |
| 5.2 Determinação da viscosidade | 30 |
| 5.3 Determinação do fator de proteção solar | 32 |
| 6 Conclusões | 35 |
| Referências Bibliográficas | 36 |
| Anexos | 40 |
| A1. Tabela dos valores de absorvência | 40 |
| A2. Resultados da determinação da viscosidade | 44 |

Índice de Tabelas:

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Descrição da categoria de proteção solar..... | 14 |
| Tabela 2 - Descrição da preparação dos extratos de <i>P. granatum</i> | 20 |
| Tabela 3 - Ponderação utilizada no cálculo do fator solar por espectrofotometria..... | 23 |
| Tabela 4 - Descrição das análises efetuadas nos extratos de <i>Punica granatum</i> | 23 |
| Tabela 5 - Descrição das análises efetuadas nos geles com extrato de <i>Punica granatum</i> submetidos na condição de <i>Shelf life</i> | 24 |
| Tabela 6 - Descrição das análises efetuadas nos geles com extrato de <i>Punica granatum</i> submetidos na condição de temperatura de 2°C-8°C (Frigorífico) e de temperatura de 40°C (Estufa)..... | 25 |
| Tabela 7 - Resultados de ensaios organolépticos e determinação de pH dos extratos e do gel com extratos no tempo inicial | 27 |
| Tabela 8 - Resultados da determinação de pH dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada | 28 |
| Tabela 9 - Resultados da determinação do fator de proteção solar dos extratos e dos geles com extratos no tempo inicial..... | 32 |
| Tabela 10 - Valores de absorvência de branco, extrato puro e gel com extrato puro em soluções de concentração de 0,2 mg/mL | 40 |
| Tabela 11 - Valores de absorvência de branco, extrato puro e gel com extrato puro em soluções de concentração de 10 mg/mL | 40 |
| Tabela 12 - Valores de absorvência de branco, extrato aquoso e gel com extrato aquoso em soluções de concentração de 0,2 mg/mL | 41 |
| Tabela 13 - Valores de absorvência de branco, extrato aquoso e gel com extrato aquoso em soluções de concentração de 10 mg/mL | 41 |
| Tabela 14 - Valores de absorvência de branco, extrato hidroalcoólico e gel com extrato hidroalcoólico em soluções de concentração de 0,2 mg/mL | 41 |
| Tabela 15 - Valores de absorvência de branco, extrato hidroalcoólico e gel com extrato hidroalcoólico em soluções de concentração de 10 mg/mL | 42 |
| Tabela 16 - Valores de absorvência de branco, extrato glicólico e gel com extrato glicólico em soluções de concentração de 0,2 mg/mL | 42 |
| Tabela 17 - Valores de absorvência de branco, extrato glicólico e gel com extrato glicólico em soluções de concentração de 10 mg/mL | 42 |
| Tabela 18 - Valores de absorvência de branco, extrato oleoso e gel com extrato oleoso em soluções de concentração de 0,2 mg/mL | 43 |
| Tabela 19 - Valores de absorvência de branco, extrato oleoso e gel com extrato oleoso em soluções de concentração de 10 mg/mL | 43 |
| Tabela 20 - Valores de absorvência de branco e gel de carbopol em soluções de concentração de 0,2 mg/mL..... | 43 |
| Tabela 21 - Valores de absorvência de branco e gel de carbopol em soluções de concentração de 10 mg/mL..... | 44 |
| Tabela 22 - Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada | 44 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ilustração da fruta romã, <i>Punica granatum</i> | 20 |
| Figura 2- Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no tempo inicial..... | 30 |
| Figura 3 - Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada | 31 |

1. Introdução

O uso de extratos provenientes de fontes naturais poderá constituir um meio promissor para a obtenção de agentes fotoprotetores sustentáveis, uma vez que parecem possuir uma elevada capacidade de absorção na região UV e propriedades antioxidantes comparáveis aos produtos de síntese.

Neste contexto, o presente trabalho constitui uma abordagem preliminar sobre o eventual uso de filtros solares químicos preparados com base em extratos de plantas ou derivados de partes de plantas, mais precisamente a partir da romã (*Punica granatum* L.). Os extratos da romã foram preparados recorrendo a solventes usados em formulações dermocosméticas, sendo incorporados em gel de carbopol. Fez-se a determinação do fator de proteção solar e o estudo de estabilidade acelerada.

A escolha da romã deve-se à sua fácil aquisição e aos seus constituintes químicos descritos na literatura que poderão revelar fator de proteção solar.

A parte experimental deste trabalho de campo foi executada entre Fevereiro e Março de 2021 durante a pandemia de COVID-19, vindo a influenciar o plano inicial pensado para o trabalho, a que se somou a reduzida disponibilidade própria de um trabalhador-estudante.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Radiação solar

No decurso da exposição à radiação solar, a pele é atingida por raios ultravioleta (UV) os quais se definem como radiação eletromagnética correspondente à banda dos menores comprimentos de onda do espectro ótico (6 – 400 nm, aproximadamente) (1). Os raios ultravioleta (provenientes de fontes naturais como o sol ou artificiais como os solários) são constituídos por átomos e moléculas excitados, assim como por descargas elétricas. A sua energia é da ordem de grandeza da envolvida na ionização de átomos e na dissociação molecular, explicando muitos dos efeitos químicos da radiação UV. A radiação ultravioleta do Sol interage igualmente com os átomos das camadas superiores da atmosfera, conduzindo a uma significativa quantidade de iões. Dependendo das suas características físicas e da capacidade de penetração na pele (com os efeitos biológicos que daí advêm) a radiação UV é dividida em três tipos:

(i) UVA, a qual corresponde a cerca de 90% da radiação solar; apresenta comprimentos de onda compreendidos entre 315 e 400 nm e atravessa a camada de ozono penetrando nas camadas mais profundas da pele; os efeitos iniciais da radiação UVA fazem aumentar o teor em melanina, enquanto o eritema solar ocorre entre 8 a 48h após doses mais elevadas (2).

(ii) UVB, que atua principalmente na camada basal da pele, sendo caracterizada por comprimentos de onda entre 280 e 315 nm e por uma absorção parcial pela camada de ozono, podendo provocar eritema solar (3-4).

As radiações UVA e UVB (esta em menor grau) são capazes de induzir processos oxidativos na pele, provavelmente resultante das reações fotoquímicas e/ou respostas bioquímicas (3). Contrariamente à UVA, a radiação UVB é um fraco indutor de foto-

oxidação do ácido desoxirribonucleico (ADN). No entanto, a radiação UVA mostra-se capaz de originar várias espécies reativas de oxigênio (ROS) podendo induzir reações inflamatórias e danos ao ADN (2-3).

(iii) UVC, com comprimentos de onda entre 100 e 280 nm e total absorção pelo ozono estratosférico; embora altamente lesiva à pele humana, devido aos efeitos carcinogênicos e mutagênicos, não provoca efeitos adversos na saúde humana uma vez que não atinge a superfície terrestre (5).

2.2 Filtros solares

A utilização de protetores solares constitui uma abordagem relevante no que diz respeito aos efeitos nocivos da radiação UV. Um filtro UV é um composto que impede a passagem da radiação ultravioleta. Do ponto de vista dermatológico, os filtros UV são comumente divididos em físicos e químicos. Os filtros físicos (inorgânicos) são substâncias opacas que absorvem, refletem ou refratam os fótons UV, embora o principal mecanismo de fotoproteção seja a absorção (sem necessariamente reagir com esta radiação). Como exemplos de filtros físicos destacam-se o dióxido de titânio e o óxido de zinco (6). De uma forma geral, os filtros químicos (orgânicos) absorvem a energia da radiação UV, podem ser sintéticos ou naturais. As moléculas que constituem os filtros químicos são essencialmente compostos aromáticos com grupos carboxilo, apresentando um grupo dador de elétrons (que pode ser uma amina ou um grupo metoxilo). Ao receber a energia da radiação UV, o filtro orgânico ativa os elétrons e estes passam do estado fundamental ao estado excitado. Ao voltarem para o estado fundamental, libertam o excesso de energia sob a forma de calor ou de radiação fluorescente (7). Como exemplos de filtros solares químicos sintéticos referem-se o bisdisulidol dissódico e a oxibenzona (atuantes em UVA) e o ácido fenilbenzimidazol sulfônico (atuante em UVB). Os filtros solares químicos naturais são constituídos por extratos de plantas incorporados nas formulações cosméticas (8-9).

2.3 Formulações de fotoprotetores

Um fotoprotetor é um produto cosmético em que o filtro solar está incorporado num veículo. Para este tipo de produto existem requisitos para a sua comercialização: os fotoprotetores não devem ser tóxicos, devem possuir características solúveis apropriadas e compatíveis com o veículo e material de acondicionamento, não devem causar sensibilidade, irritabilidade e manchas na pele nem serem mutagénicos. Os veículos principais usados nos dermocosméticos com fotoprotetores são:

- Soluções hidroalcoólicas – formulações pouco utilizadas compostas por água e etanol, de fácil preparação.
- Emulsões – dispersões contendo compostos hidrofílicos e lipofílicos, dando origem a emulsões de água em óleo (A/O) e emulsões de óleo em água (O/A), apresentando-se assim como os veículos que conferem uma maior proteção. As emulsões A/O apenas contêm filtros lipofílicos. As emulsões O/A possibilitam a incorporação de filtros hidrofílicos, os quais atuam em sinergia com os filtros lipofílicos, sendo por isso, as emulsões mais utilizadas.
- Geles – materiais semissólidos em meio líquido, constituídos por espessantes hidrofílicos, sintéticos ou naturais. No caso de formulações aquosas, apenas os fotoprotetores químicos hidrossolúveis irão conferir proteção solar. No caso dos fotoprotetores lipofílicos é necessário o uso de excipientes como o etanol (10)
- Aerossol – produtos à base de óleo com grande facilidade de espalhamento. No entanto, esta aplicação pode resultar na dispersão desigual dos agentes protetores solares, correspondendo a algumas áreas de alta cobertura com quantidade excessiva de protetor solar e outras áreas com pouca cobertura para proteger a pele de forma adequada (11).
- Bastões – tem como base vaselina e ceras, é muito utilizado por ser leve e com aplicação apenas nos lábios (11).

2.4 Determinação do fator de proteção solar

A eficácia de um protetor solar é medida em função do seu fator de proteção solar (FPS), o qual indica o tempo de exposição ao sol, sem risco de eritema. O FPS é aplicado exclusivamente às radiações UVB por serem as causadoras de eritema.

O valor de FPS *in vivo* define-se pela razão entre a dose mínima de radiação UVB que causa eritema na pele protegida por um protetor solar e a dose mínima de radiação UVB que causa o eritema na mesma pele quando não protegida pelo filtro solar (12). A avaliação *in vivo* é requerente de voluntários e necessária para a comercialização de filtros solares.

O valor de FPS *in vitro* também é possível de ser calculado. Conhecido como método de Mansur, é uma metodologia rápida e de baixo custo que permite estimar o valor de FPS de uma formulação dermocosmética fotoprotetora (13).

O valor de FPS é importante ser descrito nas embalagens de produtos cosméticos para o consumidor saber o seu grau de proteção. A tabela 1 descreve o grau de proteção para cada faixa de FPS (12,15).

Tabela 1 - Descrição da categoria de proteção solar

| Categoria indicada no rótulo | Fator de Proteção Solar |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| "Proteção baixa" | 6,0 - 9,9 |
| "Proteção média" | 10,0- 29,9 |
| "Proteção elevada" | 30,0 - 50,0 |
| "Proteção muito elevada" | > 50,0 |

2.5 Ensaio físico-químico

Os produtos dermocosméticos necessitam de ensaios de controlo de qualidade para manterem a segurança e eficácia da sua utilização. Neste âmbito, referem-se alguns dos ensaios químicos e físicos que podem ser efetuados.

2.5.1 Ensaios químicos

A análise química caracteriza-se pela aplicação de métodos analíticos que visam identificar e quantificar substâncias ativas ou componentes de uma amostra. Neste tipo de controlo podem encontrar-se os ensaios de identificação, doseamento e quantificação de impurezas, por exemplo. A cromatografia líquida e a espectrofotometria na região UV são metodologias frequentemente utilizadas (13).

2.5.2 Ensaios físicos

No controlo de qualidade físico são efetuadas determinações físicas que visam garantir a especificação dos produtos. De uma forma geral, os ensaios físicos considerados incluem (13):

- Características organolépticas – avaliação pelos órgãos do sistema sensorial, incluindo-se aqui a aparência, cor, odor, sabor, textura.
- Determinação de pH – inserção de dois elétrodos (referência e de medida) na amostra e determinação da diferença de potencial para o posterior cálculo do logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica expressa em molaridade.
- Determinação da viscosidade – medição da resistência de um material fluido ao escoamento, que ele oferece quando sujeito a uma tensão de corte ou de cisalhamento. A determinação pode ser feita através de viscosímetro rotacional, viscosímetro de orifício (copo Ford) e viscosímetro capilar.
- Determinação da densidade – relação entre a massa e o volume da amostra, a uma determinada temperatura e pressão.
- Centrifugação – teste visual, com base na indução de stress na amostra através da simulação do aumento da força gravitacional, o que faz aumentar a mobilidade das partículas (e antecipar instabilidades como precipitação, separação de fases, coalescência e sedimentação) (13).

2.6 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade são importantes para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil, e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. É um estudo que pretende prever a validade do produto em determinadas condições. Podemos considera os seguintes estudos de estabilidade:

- Estabilidade acelerada – onde as formulações são submetidas a altas e baixas temperaturas e teores de humidade. Os estudos de estabilidade acelerada têm duração de 90 dias (podendo ser prolongados por um período maior de tempo, de acordo com as características da amostra a analisar).
- Estabilidade de prateleira (*shelf life*) – em que a formulação é mantida à temperatura de 25°C e humidade relativa de 60% e analisada periodicamente por tempo indeterminado (14).

2.7. *Punica granatum*

A romã é um fruto de uma árvore (*Punica granatum* L.) pertencente à família *Punicaceae*, nativa da Ásia central, cultivada por séculos e difundida por várias regiões do planeta (16).

O fruto, denominado de balausta, é do tipo baga globosa medindo até 12 cm, coroada por um cálice carnoso e persistente. Tem casca grossa avermelhada formada por camada polispermas, separadas por membranas. O seu interior contém inúmeras sementes gradas e carnudas. A polpa é sumarenta vermelha, rosa e ácida (17).



Figura 2 – Ilustração da fruta romã, *Punica granatum* (17)

Na literatura é possível encontrar estudos onde compostos presentes na romã apresentam propriedades terapêuticas, auxiliando no tratamento de enfermidades.

- Propriedades antimicrobianas – Compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos e taninos) contribuindo para a eficácia antimicrobiana (18-19).
- Propriedade anti-inflamatória – Flavonóides, esteróis, triterpenos e ácidos orgânicos demonstram propriedades anti-inflamatórias (19,20).
- Propriedade anti-oxidantes – Compostos fenólicos, com capacidade redutora, apresentam propriedades antioxidantes (21).
- Aplicações da saúde da pele – Clareamento, envelhecimento e enrugamento da pele; queimadura e cicatrização de feridas (ácido elágico) (19).
- Propriedades antiproliferativas – Vários tipos de cancro tais como da próstata, mama, pulmão, cólon e de pele (22).

Sugere-se que grandes concentrações de polifenóis, tais como taninos hidrolisáveis e elagitaninos, presentes na romã são potenciais antioxidantes e anti-ateroscleróticos. Os extratos de fruta de romã podem inibir as enzimas COX-1, COX-2, a atividade IL-1 β e ativação de vias inflamatórias MAPK. Além disso, intervêm na cascata de sinalização de citocinas nocivas como TNF diminuindo a sua produção (22).

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

Este trabalho tem como objetivo principal determinar o fator de proteção solar *in vitro* de diferentes extratos de *Punica granatum* incorporados num gel de carbopol (GranVelada).

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o Fator de Proteção Solar (FPS) de extratos de *P. granatum*.
- Fazer o controlo de qualidade físico-químico do gel de carbopol com extratos de *P. granatum*.
- Fazer ensaios de estabilidade acelerada do gel de carbopol com extratos de *P. granatum* a vários tempos: inicial, 14 dias e 28 dias.

4. Parte experimental

4.1. Reagentes

Água bidestilada, Tintinhas, 0218A036D

Etanol, Honeywell, K2890

Glicerina, Lacrilar, 0101012017

Vaselina líquida, Lacrilar, 20F09569AS

Gel de carbopol, Gran Velada, 27970

Tween 80, Panreac, 0001929449

4.2. Material vegetal

Romãs (*Punica granatum* L.) adquiridas em estabelecimento comercial na localidade de Torres Vedras.

4.3. Materiais e equipamentos

Estufa

Frigorífico

Processador mecânico Becken LW-3315

Medidor de pH Metrohm 744

Viscosímetro digital Brookfield modelo DV-II

Balança METTLER AE 260 Delta Range

Balança KERN PFB 3000-2A

Espectrofotômetro, BMG LABTECH Fluostar Omega

Micropipeta 200 µL, Gilson

Espátula de silicone

Almofariz

Balões volumétricos de 10 mL e 25 mL

Papel de filtro Whatman 1

Algodão hidrófilo

Tubos cónicos de 15 mL, Deltalab

4.4. Procedimento experimental

4.4.1 Preparação de extratos de *P. granatum*

As romãs foram lavadas com água e descascadas. Na preparação dos extratos foram usadas as sementes e o mesocarpo da romã como material vegetal. O material vegetal fresco foi adicionado ao solvente na proporção de 1:5 (m:m). De seguida procedeu-se à agitação mecânica até desintegração e homogeneização do material vegetal no solvente. Fez-se a maceração do material vegetal no solvente por 24 horas ou 72 horas ao abrigo da luz solar. Finalmente, procedeu-se à filtração dos extratos com algodão ou papel de filtro Whatman 1 (23-24).

A tabela 2 descreve a preparação dos extratos nos diferentes solventes.

Tabela 3 - Descrição da preparação dos extratos de *P. granatum*

| Condições experimentais | Extratos | | | | |
|-------------------------|----------|--------|--------------------|-----------|--------|
| | Puro | Aquoso | Hidro alcoólico | Glicólico | Oleoso |
| Material vegetal (g) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Água bidestilada (g) | - | 240 | 72 | - | - |
| Etanol (g) | - | - | 168 | - | - |

| | | | | | |
|-------------------------------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
| Glicerina (g) | - | - | - | 240 | - |
| Vaselina líquida (g) | - | - | - | - | 240 |
| Tempo de maceração (h) | 24 | 24 | 72 | 72 | 72 |
| Filtro | Algodão | Whatman 1 | Whatman 1 | Algodão | Algodão |

4.4.2 Preparação do gel com extratos de *P. granatum*

Num almofariz adicionou-se 10 g do extrato de *P. granatum* e 90 g de gel de carbopol. Homogeneizou-se com espátula de silicone. Para cada extrato obtido prepararam-se 100 g de gel.

Na preparação do gel com extrato oleoso foi necessário colocar quatro gotas de Tween 80 (Panreac) para promover a homogeneidade da formulação.

Os geles obtidos foram acondicionados em tubos cónicos de 15 mL para posterior análise físico-química e de determinação do FPS.

4.4.3 Ensaio de controlo de qualidade

4.4.3.1 Ensaio organoléticos

A forma física e as características de cada produto devem ser consideradas nos ensaios organoléticos. Estes ensaios avaliam de forma imediata o estado de conservação do produto em estudo através dos sentidos de visão e olfato. Os ensaios organoléticos efetuados foram:

- Aspecto
- Cor
- Odor

4.4.3.2 Determinação de pH

Após lavagem adequada do eléctrodo com água, a determinação de pH foi feita inserindo o eléctrodo na amostra e anotando o valor de pH após estabilização. Foi determinado o pH de duas amostras e feito o cálculo da média e desvio padrão.

4.4.3.3 Determinação da viscosidade

A determinação da viscosidade foi feita na velocidade mínima do viscosímetro rotacional de Brookfield usando uma agulha (elemento de medida) nº7. O valor da viscosidade (em centipoise, cP) foi registado 15 s após o início da medição. Foi determinada a viscosidade de duas medidas e feito o cálculo da média e desvio padrão.

4.4.3.4 Determinação do fator de proteção solar

A determinação do fator de proteção solar (FPS) dos extratos e do gel com extratos de *P. granatum* foi feita através do método espectrofotométrico descrito por Mansur (25). Num balão volumétrico de 25 mL foi adicionado 250 mg de amostra a analisar, seguindo-se a aferição com etanol e agitação manual (concentração de 10 mg/mL). Pipetou-se 200 µL da solução anterior para um balão volumétrico de 10 mL, aferiu-se com etanol e agitou-se manualmente (concentração de 0,2 mg/mL).

As soluções finais foram colocadas numa placa de 96 poços e lidas num espectrofotómetro. As absorvências foram lidas entre 290 e 320 nm (com intervalos de 5 em 5 nm). Fez-se a subtração do valor de branco nas amostras analisadas. Por fim, os valores de absorvências obtidos foram aplicados na equação de Mansur (eq. 1) que relaciona o efeito eritematígeno (EE) e a constante em cada comprimento de onda da intensidade da radiação (I) (Tabela 2):

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (1)$$

onde FC é o fator de correção (igual a 10), $EE(\lambda)$ é o efeito eritematígeno da radiação solar em cada comprimento de onda (λ); $I(\lambda)$ é a intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ); e $Abs(\lambda)$ é a leitura da absorvência obtida em cada comprimento de onda (λ).

Os testes foram feitos em triplicado com o cálculo da média e desvio padrão.

A tabela 3 apresenta a ponderação utilizada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria (25).

Tabela 3 - Ponderação utilizada no cálculo do fator solar por espectrofotometria

| Comprimento de onda (nm) | EE.I (normalizado) Valores relativos |
|---------------------------------|---|
| 290 | 0,0150 |
| 295 | 0,0817 |
| 300 | 0,2874 |
| 305 | 0,3278 |
| 310 | 0,1864 |
| 315 | 0,0839 |
| 320 | 0,0180 |
| Total | 1,0002 |

4.4.4 Estudo de estabilidade acelerada

Os diferentes geles preparados com extratos de *P. granatum* foram submetidos às seguintes condições de stress:

- Temperatura/humidade ambiente (*Shelf life*)
- Temperatura de 2°C-8°C (Frigorífico)
- Temperatura de 40°C (Estufa) sem humidade controlada

As análises efetuadas foram no tempo inicial e, após condições de stress, 14 dias e 28 dias. As tabelas 4, 5 e 6 descrevem as análises efetuadas.

Tabela 4 - Descrição das análises efetuadas nos extratos de *Punica granatum*

| Extrato | Ensaio organoléuticos | Determinação de pH | Determinação do FPS |
|----------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Puro | Sim | Sim | Sim |
| Aquoso | Sim | Sim | Sim |

| | | | |
|------------------------|-----|-----|-----|
| Hidro alcoólico | Sim | Sim | Sim |
| Glicólico | Sim | Sim | Sim |
| Oleoso | Sim | Não | Sim |

Tabela 5 - Descrição das análises efetuadas nos geles com extrato de *Punica granatum* submetidos na condição de *Shelf life*

| Gel com extrato | Tempo de análise | Ensaio organolépticos | Determinação de pH | Viscosidade | Determinação do FPS |
|------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|
| Placebo (sem extrato) | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |
| | 14 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| Puro | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |
| | 14 dias | Não | Não | Não | Não |
| | 28 dias | Não | Não | Não | Não |
| Aquoso | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |
| | 14 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| Hidro alcoólico | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |
| | 14 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| Glicólico | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |
| | 14 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| Oleoso | Inicial | Sim | Sim | Sim | Sim |

| | | | | | |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|
| | 14 dias | Sim | Sim | Sim | Não |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim | Não |

Tabela 6 - Descrição das análises efetuadas nos geles com extrato de *Punica granatum* submetidos na condição de temperatura de 2°C-8°C (Frigorífico) e de temperatura de 40°C (Estufa)

| Gel com extrato | Tempo de análise | Ensaaios organoléticos | Determinação de pH | Viscosidade |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Placebo (sem extrato) | 14 dias | Sim | Sim | Sim |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim |
| Aquoso | 14 dias | Sim | Sim | Sim |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim |
| Hidroalcoólico | 14 dias | Sim | Sim | Sim |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim |
| Glicólico | 14 dias | Sim | Sim | Sim |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim |
| Oleoso | 14 dias | Sim | Sim | Sim |
| | 28 dias | Sim | Sim | Sim |

5 Resultados e discussão

5.1 Ensaio organoléptico e determinação de pH

Os primeiros resultados obtidos decorreram da análise organoléptica e da determinação do pH, onde o valor de pH teve influência na caracterização das diferentes amostras analisadas. A Tabela 7 descreve os resultados dos ensaios organolépticos e de determinação de pH no tempo inicial dos extratos e nos geles com extrato.

Tabela 7 - Resultados de ensaios organolépticos e determinação de pH dos extratos e do gel com extratos no tempo inicial

| | | Aspetto | Cor | Odor | Determinação de pH |
|-------------------------|------------------------------|----------------|---------------------|---|---------------------------|
| Extratos | Puro | Líquido | Vermelho arroxeado | Característico de romã | 3,53 |
| | Aquoso | Líquido | Vermelho arroxeado | Característico de romã | 3,35 |
| | Hidro alcoólico | Líquido | Vermelho arroxeado | Característico de romã e forte a etanol | 4,36 |
| | Glicólico | Líquido | Vermelho arroxeado | Característico de romã | 3,89 |
| | Oleoso | Líquido | Vermelho | Característico de romã | Não aplicado |
| Gel com extratos | Placebo (sem extrato) | Gel homogéneo | Transparente | Inodor | 6,68 |
| | Puro | Gel homogéneo | Castanho esverdeado | Característico de romã | 5,58 |
| | Aquoso | Gel homogéneo | Castanho esverdeado | Característico de romã | 6,22 |
| | Hidro alcoólico | Gel homogéneo | Castanho esverdeado | Característico de romã e a etanol | 6,35 |
| | Glicólico | Gel homogéneo | Castanho esverdeado | Característico de romã | 6,36 |
| | Oleoso | Gel homogéneo | Branco | Característico de romã | 6,61 |

Os extratos obtidos foram diluídos num gel de carbopol sem odor. Tal como esperado, a intensificação do odor característico da romã nos geles com extrato é inferior ao odor sentido nos extratos preparados.

Nos resultados obtidos destaca-se o gel com extrato oleoso que apresentou uma cor branca. Esta alteração deve-se à formação de micelas na emulsão entre a vaselina líquida e o Tween 80 no gel de carbopol hidrofílico. Além disso, como o extrato oleoso não tem iões hidrogénio que promovam uma variação de pH então a sua adição no gel de carbopol não influenciou o pH do gel com extrato oleoso.

Os extratos puro, aquoso, hidroalcoólico e glicólico são de cor vermelho arroxeadado com pH determinado entre 3,35 e 4,36. Os geles com os extratos respetivos são de cor castanho esverdeado com pH entre 5,58 e 6,36. Esta diferença de cor concomitante com o pH pode estar relacionada com a presença de antocianinas na romã. As antocianinas presentes em diferentes faixas de pH mudam de coloração. A mudança de pH dos extratos, em contato com o gel de carbopol, promoveram a alteração da coloração final dos geles com os extratos (26-27).

Considerando as análises efetuadas nas três diferentes condições de stress no estudo de estabilidade acelerada não ocorreu qualquer diferença em relação ao tempo inicial para todos os ensaios organoléticos.

No que diz respeito à determinação do pH no estudo de estabilidade acelerada, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da determinação de pH dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada

| Gel com extrato e pH inicial | Tempo | Condição | Amostra 1 | Amostra 2 | Média | Desvio padrão |
|--|----------------|--------------------|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| Placebo (sem extrato) pH Inicial = 6,68 | 14 dias | Frigorífico | 6,46 | 6,45 | 6,46 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,70 | 6,69 | 6,70 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,67 | 6,66 | 6,67 | 0,01 |
| | 28 dias | Frigorífico | 6,41 | 6,42 | 6,42 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,42 | 6,43 | 6,43 | 0,01 |

| | | | | | | |
|--|----------------|--------------------|------|------|------|------|
| | | Estufa | 6,32 | 6,33 | 6,33 | 0,01 |
| Aquoso pH Inicial = 6,22 | 14 dias | Frigorífico | 6,12 | 6,13 | 6,13 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,35 | 6,34 | 6,35 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,23 | 6,23 | 6,23 | 0,00 |
| | 28 dias | Frigorífico | 6,05 | 6,10 | 6,08 | 0,04 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,13 | 6,15 | 6,14 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,05 | 5,99 | 6,02 | 0,04 |
| Hidro alcoólico pH Inicial = 6,35 | 14 dias | Frigorífico | 6,17 | 6,16 | 6,17 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,42 | 6,40 | 6,41 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,30 | 6,30 | 6,30 | 0,00 |
| | 28 dias | Frigorífico | 6,12 | 6,14 | 6,13 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,12 | 6,15 | 6,14 | 0,02 |
| | | Estufa | 6,10 | 6,09 | 6,10 | 0,01 |
| Glicólico pH Inicial = 6,36 | 14 dias | Frigorífico | 6,13 | 6,12 | 6,13 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,36 | 6,37 | 6,37 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,17 | 6,15 | 6,16 | 0,01 |
| | 28 dias | Frigorífico | 6,15 | 6,14 | 6,15 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,01 | 6,12 | 6,07 | 0,08 |
| | | Estufa | 6,11 | 6,11 | 6,11 | 0,00 |
| Oleoso pH Inicial = 6,61 | 14 dias | Frigorífico | 6,38 | 6,38 | 6,38 | 0,00 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,71 | 6,70 | 6,71 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,56 | 6,56 | 6,56 | 0,00 |
| | 28 dias | Frigorífico | 6,32 | 6,31 | 6,32 | 0,01 |
| | | <i>Shelf life</i> | 6,31 | 6,33 | 6,32 | 0,01 |
| | | Estufa | 6,43 | 6,43 | 6,43 | 0,00 |

Neste parâmetro de controlo de qualidade verificou-se um decréscimo de pH em todos os geles com e sem extrato acondicionados em frigorífico e em todas as condições de stress em estudo para o período de 28 dias. No gel com extrato glicólico houve um decréscimo em todas as condições exceto no que diz respeito ao acondicionamento em frigorífico onde se observa um aumento de 14 para 28 dias. No entanto o parâmetro em discussão mostrou-se estável uma vez que a variação observada nos valores medidos de pH não alterou as características iniciais do produto.

5.2 Determinação da viscosidade

O Gráfico 1 descreve os resultados obtidos da viscosidade no tempo inicial e, no Gráfico 2, o estudo de estabilidade acelerada executado neste trabalho, obtidos à temperatura ambiente. O valor de viscosidade é dado em centipoise (cP) e multiplicado por 1000 ($\times 10^3$ centipoise).

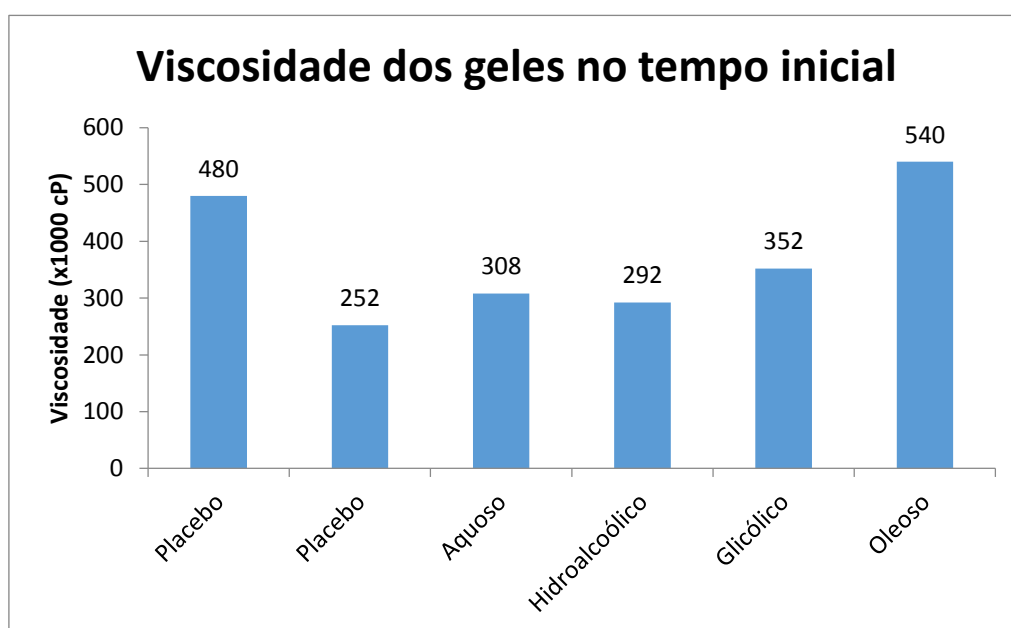


Figura 2 - Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no tempo inicial

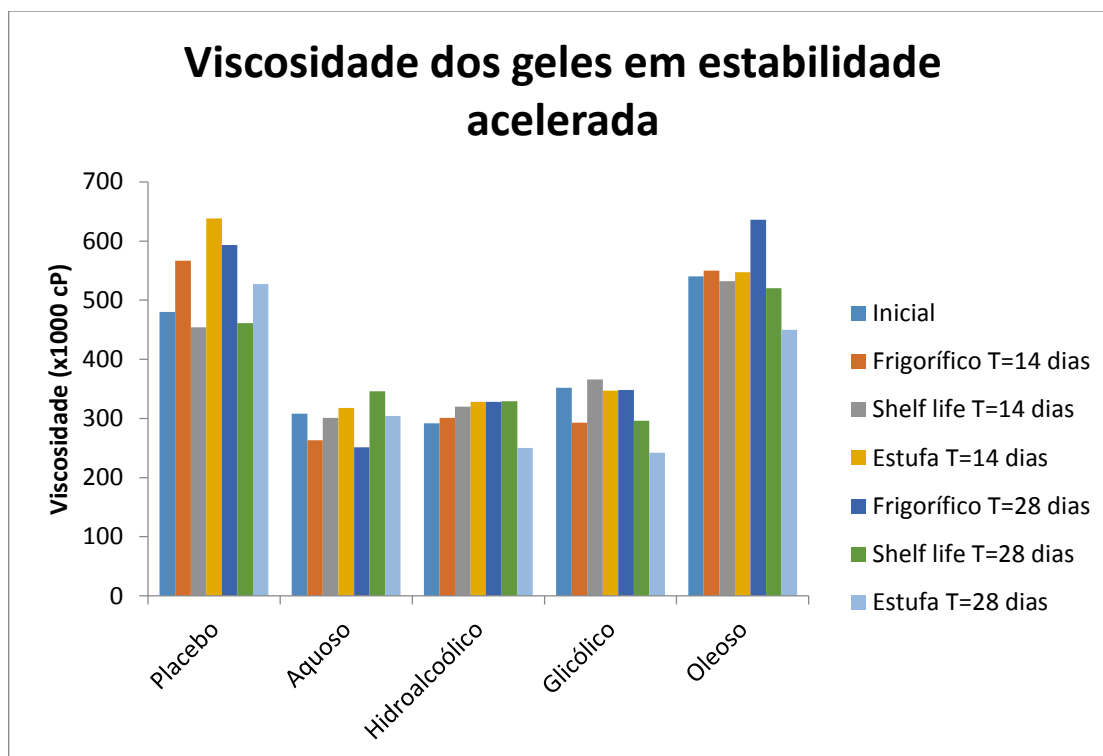


Figura 3 - Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada

Na discussão da determinação da viscosidade, o resultado a destacar é o gel com extrato oleoso. Este gel oleoso formou uma emulsão e isso fez aumentar a viscosidade em relação ao gel de carbopol.

Na relação entre o gel de carbopol com os restantes extratos, verificou-se que este foi diluído com os extratos líquidos, fazendo assim diminuir a sua viscosidade. Este seria um resultado esperado e coerente que se demonstrou.

No estudo de estabilidade acelerada o gel de carbopol manteve a viscosidade na condição de *shelf life*. Na exposição à estufa ocorrer evaporação da água aumentando a viscosidade. Na exposição a temperaturas baixas é possível ter ocorrido mudança da estrutura do polímero de carbopol aumentando a viscosidade.

Ao longo do tempo e nas diferentes condições submetidas, a alteração da viscosidade é influenciada pela evaporação de água (28). Além disso, o carbopol é uma substância ácida e na sua produção processa-se à sua neutralização do pH para aumentar a viscosidade (29). Assim, estes fatores influenciam a viscosidade do produto ao longo

do tempo. No entanto mostrou-se ser estável porque não obteve variações nas características do produto.

No trabalho de Dahlan e Razali (30) foram preparados geles com extratos de *Punica granatum* para efeitos antimicrobianos. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de carbopol influencia a viscosidade e a libertação dos constituintes activos. Os geles demonstraram condições físicas satisfatórias mesmo após um mês de armazenamento em diferentes temperaturas (30).

5.3 Determinação do fator de proteção solar

Para a determinação do fator de proteção solar foram usadas absorvências que se encontram no Anexo 1. A Tabela 10 descreve os resultados obtidos na determinação do fator de proteção solar nos diferentes extratos e geles com extratos.

Tabela 9 - Resultados da determinação do fator de proteção solar dos extratos e dos geles com extratos no tempo inicial

| | | Concentração 0,2 mg/mL | | Concentração 10 mg/mL | |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | | FPS | Desvio padrão | FPS | Desvio padrão |
| Extrato | Puro | 0,13 | 0,05 | 3,32 | 0,57 |
| | Aquoso | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,02 |
| | Hidro alcoólico | 0,15 | 0,10 | 2,51 | 0,60 |
| | Glicólico | 0,06 | 0,02 | 0,14 | 0,01 |
| | Oleoso | -0,03 | 0,03 | 0,10 | 0,01 |
| Gel com extrato | Placebo (sem extrato) | 0,12 | 0,09 | 0,87 | 0,13 |
| | Puro | -0,03 | 0,06 | 0,64 | 0,20 |
| | Aquoso | 0,17 | 0,28 | 0,8 | 0,07 |
| | Hidro alcoólico | 0,01 | 0,04 | 0,98 | 0,16 |
| | Glicólico | 0,15 | 0,19 | 0,69 | 0,15 |
| | Oleoso | 0,01 | 0,03 | 0,81 | 0,04 |

Para o cálculo da determinação do fator de proteção solar a amostra terá de estar na concentração de 0,2 mg/mL (25). Os resultados obtidos mostraram que em qualquer extrato e em qualquer gel com extrato o valor do fator de proteção solar é praticamente igual a zero.

Adicionalmente, foi feito o cálculo do fator de proteção solar das soluções iniciais à concentração de 10 mg/mL. Nesta concentração o extrato puro e o extrato hidroalcoólico tiveram um valor de FPS de 3,32 e 2,51, respectivamente. Assim, com o aumento da concentração do material vegetal poderia fazer aumentar o FPS dos extratos e, conseqüentemente, da formulação. As soluções para aumentar a concentração de material vegetal em contato com o solvente seriam: 1) desidratar o material vegetal fresco e 2) aumentar a proporção entre material vegetal (seco) com o solvente na operação unitária de maceração.

Trabalhos realizados demonstram resultados promissores de FPS para as plantas *Dirmpophandra mollis*, *Ginkgo biloba*, *Ruta graveolens* e *Vitis vinifera* (31) e com extratos de *Lippia microphylla* e *Dimorphandra gardneriana* (32). No entanto foram usados extratos secos das plantas melhorando a obtenção de substâncias que promovem a proteção solar (31).

Estudos de fotoproteção com extrato seco de *Punica granatum* em nanoemulsões demonstraram bons resultados relativos ao fator de proteção solar. Neste trabalho foi usado uma fração de acetato de etilo para obtenção de óleo de semente de *Punica granatum* (33). Extratos aquosos de plantas e frutas trituradas a fresco e maceradas com água destilada por 48h demonstraram bons resultados de fotoproteção. A laranja com FPS de 37,4 devido à grande quantidade de vitamina C. A uva apresentou um FPS de 6,45 por ter resveratrol na sua constituição. A beterraba um FPS de 12,83 e a beringela um FPS de 14,37. Este estudo demonstra que a relação entre material vegetal fresco e solvente, bem como, o tempo de maceração pode influenciar na extração de compostos fotoprotetores (34).

As tarefas laboratoriais que poderiam ter auxiliado na consolidação e melhoramento dos resultados deste trabalho são:

- Determinação de pH e viscosidade no tempo inicial em duplicado.

- Determinação do parâmetro de densidade na matéria prima, extratos e produto final.
- Ensaio de centrifugação para o gel com extrato oleoso para verificar se haveria instabilidade irreversível da emulsão.
- Avaliação da agulha mais adequada para determinar a viscosidade dos solventes e extratos.
- Repetição do trabalho com material vegetal seco e com maior proporção com solvente durante a maceração dos extratos.

6 Conclusões

Após a realização experimental deste trabalho, juntamente com a obtenção e discussão de resultados, concluiu-se que a metodologia usada na preparação dos extratos de *Punica granatum* parece não ser indicada para obter formulações com níveis do fator de proteção solar adequado. Embora a composição química da romã possa ser compatível com a atividade de fotoproteção solar, os seus extratos incorporados no gel carbopol não mostraram qualquer efeito. No entanto, os resultados obtidos permitiram sugerir correções para melhorar os objetivos a serem cumpridos. Mais estudos deverão ser elaborados para melhorar a qualidade e eficácia das formulações a serem desenvolvidas.

Referências Bibliográficas

1. Hailun H. et al. Natural components in sunscreens: topical formulations with sun protection factor (SPF), *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134, 111161.
2. Severino P. et al. Fotoenvelhecimento cutâneo e inovações em filtros solares. *Cadernos da Graduação*. 2018; 5(1). Acesso em: 2021 Set 02 Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/index.php/cadernobiologicas/article/view/5252>.
3. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. *Photochemistry and Photobiology*, 2015, 91, 140-155.
4. Holick M.F. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and vitamin D for health. *Anticancer research*. 2016; 36 (3): 1345-1356.
5. Widel M. et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 68: 278-287.
6. Schneider S.L, Lim HW. A review of inorganic UV filters Zinc Oxide and Titanium Dioxide. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 2019, 35, 442-446
7. Balogh TS. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2011, 86(4), 732-742.
8. Moura M. M. V. Atividade fotoprotetora de extratos vegetais: uma revisão de literatura. [Paraíba]: Universidade Federal da Paraíba; 2020. 45 p.
9. Barata E. A. F. *Cosméticos: A cosmética, inovações e enquadramento legal*. 2ª Edição. Lisboa: Lidel, 2018. 177-187 p.
10. Flor J. Davolos M. R. Correa M. A. Protetores solares. *Quim. Nova*. 2007; 30 (1): 153-158.

11. Ngoc L. T. N. Tran V. V. Moon J. Chae M. Park D. Lee Y. Recent Trends os Suncreen Cosmetic: An Update Review. *Cosmetics*. 2019; 6 (64): 1-15.
12. Recomendação da Comissão nº 2006/647//CE de 22 de Setembro. *Jornal Oficial da União Europeia L 265/39*. Comissão Europeia.
13. Teixeira M. S. M. Avaliação da atividade fotoprotetora de formulação cosmética contendo a associação entre fração em clorofórmio de *Garcinia cambogia* Desr. (Clusiaceae) e filtro solar sintético de amplo espectro. [Juiz de Fora]: Universidade Federal da Juiz de Fora; 2016. 61 p. Anvisa. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Uma abordagem sobre os ensaios químicos e físicos. 2ª Edição. Brasília: Anvisa, 2008. 120 p.
14. Anvisa. Cosméticos. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Uma abordagem sobre os ensaios químicos e físicos. 1ª Edição. Brasília: Anvisa, 2004. 52 p.
15. Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº30. 2012 Jun 1; 2012. Acesso em: 2021 Sep 25. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html
16. Santos J. N. Qualidade de sementes de romã (*Punica granatum* L.) sob métodos de extração do arilo. [Ceres]: Instituto Federal Goiano – Campus Ceres; 2019. 27 p.
17. Guisado S. I. L. A Cultura da Romãzeira (*Punica granatum* L.) Práticas Culturais e Atributos Físico-Químicos do Fruto das Cultivares ‘Acco’ e ‘Wonderful’. [Beja]: Instituto Politécnico de Beja; 2018. 109 p.
18. Santos E. P. et al. *Punica Granatum* L. (Romã) e Atividade Antimicrobiana Contra o Biofilme Dental: uma Revisão Bibliográfica. *Ensaio e Ciênc.* 2019; 23 (2): 88-93.
19. Ko K. Dadmohammadi Y. Abbaspourrad A. Nutritional and Bioactive Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A Review. *Foods*. 2021; 10 (657): 1-17.
20. Sousa N. C. F. et al. Propriedades farmacológicas de *Punica granatum* L (romã): uma revisão de literatura. *Revista Ceuma Perspectivas*. 2018; 31: 56-67.

21. Jardini F. A. Filho J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.) RBCF. 2007; 41 (1): 137-147.
22. Zarfeshany A. Asgary S. Javanmard S. H. Potent health effects os pomegranate. Adv Biomed Res. 2014; 3 (100): 1-16.
23. Rohde C. et al. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre a mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Arq. Inst. Biol. 2013; 80 (4): 407-415.
24. Prista L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica Volume II. 8ª Edição. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian; 2014. 1111-1121.
25. Mansur J. S. et al. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos por espectrofotometria. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1986; 61: 167-172.
26. Arruda M. R.E. et al. Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH obtidos por diferentes métodos. Brazilian Journal of Food Research. 2019 [Acesso em: 2021 Set 02]; 10 (3): 87-100. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>
27. Santiago M. C. P. A. et al. Caracterização e avaliação do teor de antocianinas do suco de romã (*Punica granatum* L.). III Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita. 2011: 319-332. [Acesso em: 2021 Set 02];Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53785/1/2011-093.pdf>
28. Alves P. H. P. Ugoline B. C. A. Bastos J. C. S. A. Avaliação da estabilidade preliminar de géis contendo extratos glicólicos de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* M.) e Bamamélis (*Hamamelis virginiana* L.). Ágora. 2021; 1: 126-138.
29. Prista L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica Volume II. 8ª Edição. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian; 2014. 1258-1260.
30. Dahlan A. Razali M. A. M. Formulation, characterization and determination of antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum*) gel. J App Pharm. 2015 Jan; 7(1): 13-25.
31. Cefali L. C. Evaluation of In Vitro Solar Protection Factor (SPF), Antioxidant Activity, and Cell Viability of Mixed Vegetable Extracts from *Dirmophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinífera* L.

- Plants 2019, 8, 453. [Acesso em: 2021 Set 02]; Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/11/453> DOI: 10.3390/plants8110453
32. Nunes A.R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2018; 189: 119-123.
33. Baccarin T. Mitjans M. Ramos D. Lemos-Senna E. Vinardell M. P. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCat) cell line. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2015; 153: 127-136.
34. Sharma T. Tyagi V. Bansal M. Determination of sun protection factor of vegetable and fruit extracts using UV-Visible spectroscopy: A green approach. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020; 18: 1-6.

Anexos

A1. Tabela dos valores de absorvência

Tabela 10 - Valores de absorvência de branco, extrato puro e gel com extrato puro em soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato puro | | | Gel com extrato puro | | |
|--------------------------|--------|--------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,062 | 0,084 | 0,087 | 0,075 | 0,072 | 0,058 | 0,055 |
| 295 | 0,061 | 0,082 | 0,085 | 0,073 | 0,069 | 0,056 | 0,052 |
| 300 | 0,061 | 0,082 | 0,085 | 0,073 | 0,068 | 0,055 | 0,051 |
| 305 | 0,060 | 0,081 | 0,084 | 0,071 | 0,066 | 0,054 | 0,050 |
| 310 | 0,059 | 0,079 | 0,081 | 0,069 | 0,064 | 0,052 | 0,048 |
| 315 | 0,058 | 0,077 | 0,080 | 0,068 | 0,062 | 0,050 | 0,047 |
| 320 | 0,057 | 0,076 | 0,079 | 0,067 | 0,061 | 0,048 | 0,045 |

Tabela 11 - Valores de absorvência de branco, extrato puro e gel com extrato puro em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato puro | | | Gel com extrato puro | | |
|--------------------------|--------|--------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,062 | 0,767 | 0,606 | 0,662 | 0,194 | 0,173 | 0,132 |
| 295 | 0,061 | 0,702 | 0,544 | 0,597 | 0,184 | 0,165 | 0,125 |
| 300 | 0,061 | 0,653 | 0,498 | 0,548 | 0,176 | 0,161 | 0,120 |
| 305 | 0,060 | 0,603 | 0,451 | 0,500 | 0,167 | 0,157 | 0,116 |
| 310 | 0,059 | 0,548 | 0,403 | 0,449 | 0,158 | 0,152 | 0,111 |
| 315 | 0,058 | 0,504 | 0,363 | 0,408 | 0,151 | 0,148 | 0,107 |
| 320 | 0,057 | 0,465 | 0,330 | 0,372 | 0,146 | 0,145 | 0,104 |

Tabela 12 - Valores de absorvência de branco, extrato aquoso e gel com extrato aquoso em soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato aquoso | | | Gel com extrato aquoso | | |
|--------------------------|--------|----------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,055 | 0,066 | 0,064 | 0,058 | 0,132 | 0,058 | 0,057 |
| 295 | 0,054 | 0,064 | 0,062 | 0,055 | 0,129 | 0,056 | 0,055 |
| 300 | 0,053 | 0,063 | 0,060 | 0,053 | 0,125 | 0,056 | 0,054 |
| 305 | 0,053 | 0,062 | 0,059 | 0,052 | 0,122 | 0,055 | 0,053 |
| 310 | 0,052 | 0,059 | 0,055 | 0,049 | 0,110 | 0,053 | 0,051 |
| 315 | 0,052 | 0,059 | 0,055 | 0,049 | 0,110 | 0,053 | 0,051 |
| 320 | 0,052 | 0,057 | 0,055 | 0,048 | 0,105 | 0,053 | 0,050 |

Tabela 13- Valores de absorvência de branco, extrato aquoso e gel com extrato aquoso em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato aquoso | | | Gel com extrato aquoso | | |
|--------------------------|--------|----------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,049 | 0,060 | 0,057 | 0,056 | 0,168 | 0,174 | 0,156 |
| 295 | 0,047 | 0,058 | 0,055 | 0,052 | 0,163 | 0,169 | 0,151 |
| 300 | 0,046 | 0,057 | 0,053 | 0,050 | 0,160 | 0,165 | 0,148 |
| 305 | 0,046 | 0,056 | 0,052 | 0,049 | 0,158 | 0,162 | 0,144 |
| 310 | 0,045 | 0,053 | 0,050 | 0,047 | 0,154 | 0,157 | 0,140 |
| 315 | 0,044 | 0,051 | 0,048 | 0,045 | 0,151 | 0,154 | 0,137 |
| 320 | 0,044 | 0,051 | 0,048 | 0,044 | 0,149 | 0,152 | 0,135 |

Tabela 14 - Valores de absorvência de branco, extrato hidroalcoólico e gel com extrato hidroalcoólico em soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato hidroalcoólico | | | Gel com extrato hidroalcoólico | | |
|--------------------------|--------|------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,055 | 0,076 | 0,102 | 0,083 | 0,064 | 0,056 | 0,055 |
| 295 | 0,054 | 0,073 | 0,099 | 0,079 | 0,063 | 0,054 | 0,053 |
| 300 | 0,053 | 0,071 | 0,097 | 0,077 | 0,063 | 0,053 | 0,052 |
| 305 | 0,053 | 0,068 | 0,095 | 0,074 | 0,062 | 0,052 | 0,051 |
| 310 | 0,052 | 0,062 | 0,087 | 0,069 | 0,059 | 0,050 | 0,048 |
| 315 | 0,052 | 0,062 | 0,087 | 0,069 | 0,059 | 0,050 | 0,048 |
| 320 | 0,052 | 0,060 | 0,084 | 0,066 | 0,058 | 0,049 | 0,048 |

Tabela 15 - Valores de absorvência de branco, extrato hidroalcoólico e gel com extrato hidroalcoólico em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato hidroalcoólico | | | Gel com extrato hidroalcoólico | | |
|--------------------------|--------|------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,049 | 0,658 | 0,520 | 0,518 | 0,170 | 0,212 | 0,204 |
| 295 | 0,047 | 0,599 | 0,456 | 0,454 | 0,163 | 0,205 | 0,197 |
| 300 | 0,046 | 0,548 | 0,404 | 0,401 | 0,158 | 0,200 | 0,193 |
| 305 | 0,046 | 0,493 | 0,350 | 0,348 | 0,154 | 0,196 | 0,188 |
| 310 | 0,045 | 0,431 | 0,294 | 0,291 | 0,149 | 0,190 | 0,183 |
| 315 | 0,044 | 0,374 | 0,247 | 0,245 | 0,145 | 0,185 | 0,179 |
| 320 | 0,044 | 0,322 | 0,207 | 0,206 | 0,143 | 0,181 | 0,175 |

Tabela 16 - Valores de absorvência de branco, extrato glicólico e gel com extrato glicólico em soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato glicólico | | | Gel com extrato glicólico | | |
|--------------------------|--------|-------------------|-----------|-----------|---------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,055 | 0,076 | 0,073 | 0,073 | 0,062 | 0,062 | 0,103 |
| 295 | 0,054 | 0,071 | 0,069 | 0,068 | 0,061 | 0,061 | 0,104 |
| 300 | 0,053 | 0,068 | 0,065 | 0,064 | 0,060 | 0,060 | 0,105 |
| 305 | 0,053 | 0,065 | 0,063 | 0,060 | 0,059 | 0,059 | 0,104 |
| 310 | 0,052 | 0,059 | 0,056 | 0,053 | 0,056 | 0,056 | 0,098 |
| 315 | 0,052 | 0,059 | 0,056 | 0,053 | 0,056 | 0,056 | 0,098 |
| 320 | 0,052 | 0,057 | 0,055 | 0,051 | 0,055 | 0,055 | 0,094 |

Tabela 17 - Valores de absorvência de branco, extrato glicólico e gel com extrato glicólico em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato glicólico | | | Gel com extrato glicólico | | |
|--------------------------|--------|-------------------|-----------|-----------|---------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,049 | 0,078 | 0,076 | 0,075 | 0,164 | 0,135 | 0,179 |
| 295 | 0,047 | 0,073 | 0,070 | 0,070 | 0,155 | 0,127 | 0,170 |
| 300 | 0,046 | 0,069 | 0,067 | 0,067 | 0,149 | 0,122 | 0,164 |
| 305 | 0,046 | 0,066 | 0,064 | 0,065 | 0,144 | 0,117 | 0,158 |
| 310 | 0,045 | 0,062 | 0,060 | 0,061 | 0,138 | 0,112 | 0,152 |
| 315 | 0,044 | 0,059 | 0,057 | 0,059 | 0,134 | 0,108 | 0,148 |
| 320 | 0,044 | 0,057 | 0,055 | 0,057 | 0,131 | 0,106 | 0,145 |

Tabela 18 - Valores de absorvência de branco, extrato oleoso e gel com extrato oleoso em soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato oleoso | | | Gel com extrato oleoso | | |
|--------------------------|--------|----------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,055 | 0,055 | 0,053 | 0,060 | 0,063 | 0,056 | 0,059 |
| 295 | 0,054 | 0,051 | 0,050 | 0,057 | 0,061 | 0,054 | 0,057 |
| 300 | 0,053 | 0,049 | 0,048 | 0,055 | 0,061 | 0,053 | 0,056 |
| 305 | 0,053 | 0,048 | 0,047 | 0,055 | 0,060 | 0,052 | 0,055 |
| 310 | 0,052 | 0,045 | 0,045 | 0,052 | 0,056 | 0,049 | 0,051 |
| 315 | 0,052 | 0,045 | 0,045 | 0,052 | 0,056 | 0,049 | 0,051 |
| 320 | 0,052 | 0,044 | 0,045 | 0,051 | 0,055 | 0,048 | 0,050 |

Tabela 19 - Valores de absorvência de branco, extrato oleoso e gel com extrato oleoso em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Extrato oleoso | | | Gel com extrato oleoso | | |
|--------------------------|--------|----------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,049 | 0,140 | 0,142 | 0,135 | 0,174 | 0,176 | 0,167 |
| 295 | 0,047 | 0,087 | 0,089 | 0,084 | 0,165 | 0,167 | 0,158 |
| 300 | 0,046 | 0,062 | 0,064 | 0,061 | 0,160 | 0,162 | 0,153 |
| 305 | 0,046 | 0,055 | 0,058 | 0,055 | 0,158 | 0,159 | 0,150 |
| 310 | 0,045 | 0,052 | 0,054 | 0,051 | 0,155 | 0,156 | 0,147 |
| 315 | 0,044 | 0,051 | 0,053 | 0,050 | 0,153 | 0,154 | 0,145 |
| 320 | 0,044 | 0,051 | 0,053 | 0,049 | 0,152 | 0,152 | 0,143 |

Tabela 20 - Valores de absorvência de branco e gel de carbopolem soluções de concentração de 0,2 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Gel de carbopol a 0,2 mg/mL | | |
|--------------------------|--------|-----------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,055 | 0,086 | 0,067 | 0,062 |
| 295 | 0,054 | 0,085 | 0,066 | 0,061 |
| 300 | 0,053 | 0,084 | 0,066 | 0,060 |
| 305 | 0,053 | 0,083 | 0,065 | 0,059 |
| 310 | 0,052 | 0,082 | 0,063 | 0,058 |
| 315 | 0,052 | 0,080 | 0,062 | 0,057 |
| 320 | 0,052 | 0,079 | 0,060 | 0,056 |

Tabela 21 - Valores de absorvência de branco e gel de carbopol em soluções de concentração de 10 mg/mL

| Comprimento de onda (nm) | Branco | Gel de carbopol a 10 mg/mL | | |
|--------------------------|--------|----------------------------|-----------|-----------|
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 290 | 0,049 | 0,194 | 0,163 | 0,158 |
| 295 | 0,047 | 0,189 | 0,159 | 0,155 |
| 300 | 0,046 | 0,187 | 0,157 | 0,153 |
| 305 | 0,046 | 0,184 | 0,155 | 0,151 |
| 310 | 0,045 | 0,181 | 0,152 | 0,148 |
| 315 | 0,044 | 0,179 | 0,151 | 0,147 |
| 320 | 0,044 | 0,177 | 0,149 | 0,146 |

A2. Resultados da determinação da viscosidade

Tabela 22 - Resultados da determinação da viscosidade dos geles com extratos no estudo de estabilidade acelerada

| Gel com extrato e Viscosidade inicial | Tempo | Condição | Amostra 1 | Amostra 2 | Média | Desvio padrão |
|--|---------|-------------------|-----------|-----------|-------|---------------|
| Placebo (sem extrato) Viscosidade = 480 | 14 dias | Frigorífico | 564 | 570 | 567 | 4,24 |
| | | <i>Shelf life</i> | 432 | 476 | 454 | 31,11 |
| | | Estufa | 640 | 636 | 638 | 2,83 |
| | 28 dias | Frigorífico | 586 | 599 | 593 | 9,19 |
| | | <i>Shelf life</i> | 450 | 471 | 461 | 14,85 |
| | | Estufa | 516 | 537 | 527 | 14,85 |
| Aquoso Viscosidade = 308 | 14 dias | Frigorífico | 258 | 267 | 263 | 6,36 |
| | | <i>Shelf life</i> | 304 | 298 | 301 | 4,24 |
| | | Estufa | 320 | 316 | 318 | 2,83 |
| | 28 dias | Frigorífico | 243 | 258 | 251 | 10,61 |
| | | <i>Shelf life</i> | 352 | 340 | 346 | 8,49 |
| | | Estufa | 308 | 299 | 304 | 6,36 |

| | | | | | | |
|--|----------------|--------------------|-----|-----|-----|-------|
| Hidro alcoólico Viscosidade = 292 | 14 dias | Frigorífico | 304 | 297 | 301 | 4,95 |
| | | <i>Shelf life</i> | 332 | 308 | 320 | 16,97 |
| | | Estufa | 332 | 324 | 328 | 5,66 |
| | 28 dias | Frigorífico | 324 | 332 | 328 | 5,66 |
| | | <i>Shelf life</i> | 324 | 333 | 329 | 6,36 |
| | | Estufa | 256 | 244 | 250 | 8,49 |
| Glicólico Viscosidade = 352 | 14 dias | Frigorífico | 288 | 298 | 293 | 7,07 |
| | | <i>Shelf life</i> | 384 | 348 | 366 | 25,46 |
| | | Estufa | 334 | 360 | 347 | 18,38 |
| | 28 dias | Frigorífico | 352 | 344 | 348 | 5,66 |
| | | <i>Shelf life</i> | 292 | 300 | 296 | 5,66 |
| | | Estufa | 248 | 236 | 242 | 8,49 |
| Oleoso Viscosidade = 540 | 14 dias | Frigorífico | 556 | 543 | 550 | 9,19 |
| | | <i>Shelf life</i> | 524 | 539 | 532 | 10,61 |
| | | Estufa | 540 | 553 | 547 | 9,19 |
| | 28 dias | Frigorífico | 640 | 632 | 636 | 5,66 |
| | | <i>Shelf life</i> | 512 | 528 | 520 | 11,31 |
| | | Estufa | 456 | 444 | 450 | 8,49 |