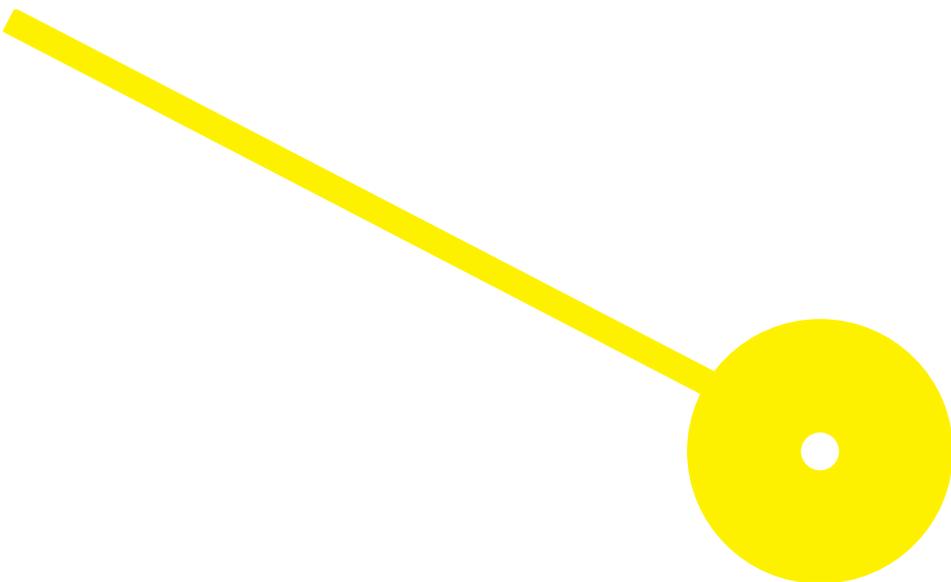




Determinação do Potencial de Proteção Solar de Plantas da Flora Portuguesa

Sónia Maria Matos Barbosa

12/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Determinação do Potencial de Proteção Solar de Plantas da Flora Portuguesa

Autor

Sónia Maria Matos Barbosa

Orientador(es)

Prof. Doutora Ana Isabel Oliveira, Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Prof. Doutora Cláudia Pinho, Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Disertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Farmácia** – Ramo de Especialização em **Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste projeto de investigação e da elaboração da presente dissertação representou em mim um desafio pessoal. Ao longo deste percurso, existiram momentos de desmotivação e de dúvida na exequibilidade do projeto no tempo proposto. Para isso, tive de arranjar forças nas pessoas que me são mais próximas e queridas.

Começo por agradecer à orientadora deste projeto de investigação, Professora Doutora Ana Isabel Oliveira pela confiança que depositou em mim, pelo permanente acompanhamento, motivação e partilha de conhecimentos que foram imprescindíveis para a elaboração da dissertação.

À orientadora Professora Doutora Cláudia Pinho que se mostrou disponível sempre que precisei.

Aos membros do laboratório do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), por me aconselharem e pela disponibilidade prestada, em particular à Lídia Rocha e à Ana Joice.

A todos os meus amigos pelo encorajamento, momentos de diversão e companheirismo.

Um agradecimento especial ao meu namorado, José Brito, por toda a motivação ao longo destes anos, carinho e amor sem o qual teria sido difícil de ultrapassar determinadas etapas deste percurso.

Um muito obrigado à minha família, aos meus irmãos e à minha cunhada, pelas imensas reflexões, leituras, revisões e discussões de ideias.

Não esquecendo as minhas crenças e fé, os que já partiram e os quais me deram grandes lições de vida, fazendo-me crescer e contribuindo para o que sou hoje.

O último agradecimento e o mais especial é dirigido aos meus pais, por todo o esforço realizado para que a concretização deste sonho fosse possível, por todo o amor incondicional, confiança, paciência e incentivo que me transmitiram diariamente. Obrigada por serem quem são, a vós devo tudo e como forma de agradecimento e do amor que sinto por vocês dedico todo este trabalho e percurso académico.

Por fim e não esquecendo ninguém, dedico todas as palavras de carinho e reconhecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Um sincero e profundo obrigada!

Resumo

A exposição à radiação solar está associada a problemas como o cancro cutâneo e o fotoenvelhecimento precoce. Como preventivo são utilizados compostos sintéticos em diversos produtos. Contudo, a toxicidade desses compostos tem sido apresentada como um problema comum. Assim, vários compostos naturais têm sido utilizados como modo de proteção. Este trabalho apresenta, assim, como objetivos identificar os principais grupos de compostos presentes nos extratos de plantas estudadas, determinar a atividade antioxidante e determinar o potencial de proteção solar. Para tal, prepararam-se dois extratos (aquoso e metanólico) das plantas *Melilotus indicus* e *Pterospartum tridentatum*. Realizou-se um *screening* fitoquímico e através de métodos *in vitro* determinou-se a capacidade antioxidante, coeficiente de absorção e o fator de proteção solar. Todos os extratos apresentaram compostos fenólicos, flavonóides, taninos e diterpenóides. O extrato aquoso de *P. tridentatum* foi o que demonstrou um maior teor de compostos fenólicos totais (615.28 ± 21.28 mgGAE/100g) e uma capacidade quelante superior (77.01 ± 3.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No ensaio de eliminação de radicais livres, capacidade de absorção e FPS, o extrato metanólico de *P. tridentatum* apresentou os melhores resultados, 169.89 ± 9.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 11.11 e 30.80 ± 2.18 , respetivamente. Os extratos apresentam capacidade antioxidante baixa a moderada e uma forte capacidade de absorção UV e de proteção solar.

Palavras-chave: *Pterospartum tridentatum*, *Melilotus indicus*, capacidade antioxidante, Fator de proteção solar

Abstract

Exposure to solar radiation is associated with problems such as skin cancer and early photoaging. As a preventive, synthetic compounds are used in several products. However, the toxicity of these compounds has been presented as a common problem. Therefore, natural compounds have been used as a means of protection. The aims of this study are to identify the main groups of compounds present in the studied plant extracts, determine the antioxidant activity and the potential of sun protection. Two extracts (aqueous and methanolic) of the plants *Melilotus indicus* and *Pterospartum tridentatum* were prepared. A phytochemical screening was conducted in each extract and antioxidant capacity, absorption coefficient and sun protection factor were also determined using *in vitro* methods. The aqueous extract of *P. tridentatum* demonstrated a higher total phenolic content (615.28 ± 21.28 mgGAE/100g) and a chelating capacity superior to the others extracts ($77.01 \pm 3.58 \mu\text{g/mL}$). In the free radical scavenging, absorption capacity and SPF assays, the methanolic extract of *P. tridentatum* showed better results with $169.89 \pm 9.00 \mu\text{g/mL}$, 11.11 e 30.80 ± 2.18 , respectively. All extracts studied presented low to moderate antioxidant capacity and strong UV absorption coefficient and SPF.

Keywords: *Pterospartum tridentatum*, *Melilotus indicus*, antioxidant capacity, sun protection factor

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice de Tabelas.....	VII
Índice de Figuras.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Fototipos de pele.....	5
1.2. Cancro da Pele.....	8
1.2.1. Epidemiologia.....	8
1.2.2. Tipos de Cancro.....	8
1.2.3. Fatores de Risco.....	9
1.3. Fator de Proteção Solar.....	9
1.4. Agentes antioxidantes.....	11
1.5. Plantas Medicinais e Proteção Solar.....	12
1.5.1. <i>Pterospartum tridentatum</i>.....	13
1.5.2. <i>Melilotus indicus</i>.....	14
1.6. Objetivos do Estudo.....	15
2. Métodos.....	16
2.1. Reagentes.....	16
2.2. Material Vegetal e Preparação dos Extratos.....	16
2.3. Screening Fitoquímico.....	16
2.3.1. Compostos Fenólicos.....	17
2.3.2. Polifenóis.....	17
2.3.3. Flavonóides.....	17
2.3.4. Taninos.....	17
2.3.5. Diterpenóides.....	17
2.3.6. Terpenóides e Triterpenóides.....	17
2.3.7. Alcalóides.....	18
2.4. Ensaio para determinação do potencial antioxidante.....	18
2.4.1. Ensaio do radical DPPH.....	18

2.4.2.	Determinação da Capacidade Quelante do Ferro	18
2.4.3.	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	19
2.5.	Ensaio de determinação do potencial do fator de proteção solar	19
2.5.1.	Determinação da capacidade de absorção ultravioleta.....	19
2.5.2.	Determinação do fator de proteção solar	19
2.6.	Análise Estatística.....	20
3.	Resultados e Discussão	21
3.1.	<i>Screening</i> Fitoquímico	21
3.2.	Avaliação do Potencial Antioxidante.....	23
3.3.	Capacidade de Absorção de radiação Ultravioleta	26
3.4.	Determinação do Fator de Proteção Solar	28
4.	Conclusão	30
	Referências Bibliográficas.....	31

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Escala de Fitzpatrick, pigmentação da pele e risco da radiação Ultravioleta.....	7
Tabela 2 – Metodologia in vivo segundo a Food and Drug Administration e o método Europeu	11
Tabela 3 – Screening fitoquímico para ambos os extratos de cada planta	21
Tabela 4 – Avaliação do Potencial Antioxidante.....	23
Tabela 5 – Capacidade de Absorção de radiação Ultravioleta	26
Tabela 6 – Fator de Proteção Solar	28

Índice de Figuras

Figura 1 - Danos causados na pele devido à radiação solar.....	3
Figura 2 - Penetração da radiação solar na pele e os seus danos	4
Figura 3 - Resposta cutânea à radiação UV	6
Figura 4 - Síntese das melaninas.....	6
Figura 5 -Planta <i>Pterospartum tridentatum</i>	14
Figura 6 - Planta <i>Melilotus indicus</i>	15

Lista de Abreviaturas

- AMPc – Monofosfato de adenosina cíclica
APCC – Associação Portuguesa do Cancro Cutâneo
BHA – Butilhidroxianisol
BTH – Butilhidroxitolueno
DEM – Dose eritematosa mínima
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA- Ácido desoxirribonucleico
DOPA – 3,4-dihidroxifenilalanina
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA – Estados Unidos da América
FDA – *Food and Drug Administration*
FPS – Fator de proteção solar
MC1R – Melanocortina 1
MSH – Hormona estimulante dos melanócitos
RS – Radicais oxidativos livres
TBHQ – Tert-butilhidroquinona
TFT – Teor de compostos fenólicos totais
UE – União Europeia
UV – Ultravioleta
UVA – Ultravioleta do tipo A
UVB – Ultravioleta do tipo B
UVC – Ultravioleta do tipo C

1. Introdução

A radiação solar a que os seres vivos estão expostos é composta maioritariamente pela ultravioleta do tipo A (UVA), que se encontra no comprimento de onda entre os 320 e os 400nm e corresponde a cerca de 90 a 95% e pela radiação ultravioleta (UV) do tipo B (UVB), localizada entre os 280nm e os 320nm, que corresponde à restante percentagem (5 a 10%). A radiação ultravioleta do tipo C (UVC), localiza-se entre os 200nm e os 280nm e é absorvida pela camada de ozono. Assim sendo, apesar de ser altamente bioativa, os seres vivos não estão expostos a esta radiação (Amaro-Ortiz et al., 2014).

A exposição à radiação solar varia consoante a altitude, latitude e urbanização a que o indivíduo é sujeito. As partículas atmosféricas conseguem interferir ou refletir a radiação UV, ou seja, quanto mais atmosfera a radiação tiver de atravessar, menor será a energia a incidir na superfície terrestre. Por cada 10 metros de altitude há um aumento de 2% de risco de desenvolver problemas de saúde devido à exposição de radiação solar. Relativamente à latitude, a radiação é mais intensa na zona do Equador, uma vez que a sua trajetória é mais reta comparativamente com os polos geográficos. A urbanização reúne vários fatores que podem influenciar a exposição à radiação solar, tais como, a pressão social sobre a aparência da pele e os níveis socioeconómicos. A pressão social e o acesso ao bronzamento artificial induzem o aumento à exposição de radiação UV, assim como os níveis socioeconómicos mais elevados tendem a utilizar com maior frequência este tipo de bronzamento. Além disso, a realização frequente de viagens aéreas está também associada a um maior risco de exposição à radiação solar. Deste modo, os indivíduos que desempenham funções aéreas (especialmente pilotos) estão sujeitos a uma maior exposição, assim como os indivíduos socioeconomicamente mais elevados, que tendem a realizar mais viagens (Amaro-Ortiz et al., 2014). Ademais, embora o nível de ozono na estratosfera tenha aumentado significativamente nos últimos 10 a 15 anos, o processo de recuperação continuará a ocorrer, sendo, contudo, mais lento. A população continuará exposta, assim, a uma maior radiação solar até que esta camada seja reposta na totalidade (Steinbrecht et al., 2018).

A exposição à radiação UV traz efeitos benéficos. O principal efeito é a produção da vitamina D, sendo que o modo natural de obtenção desta vitamina apenas ocorre aquando a exposição à mesma. A radiação UVB converte o 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D, que dependente da temperatura, sofre um rearranjo molecular formando a vitamina D. Por sua vez, esta sofre hidroxilação hepática formando 25-hidroxivitamina D, principal forma de circulação, e subsequentemente hidroxilação renal sendo convertida em 1,25-di-hidroxivitamina D, forma metabolicamente mais ativa (Felton et al., 2016).

Existem evidências que associam a vitamina D a efeitos benéficos, essencialmente efeitos músculo-esqueléticos. Esta vitamina regula as concentrações de cálcio e fosfato e suprime a segregação da paratormona, levando a um aumento da mineralização óssea. Por outro lado, a hipovitaminose D está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças

imunológicas, hipertensão, diabetes tipo I e cancro. No caso de indivíduos que sofreram um transplante renal, o déficit desta vitamina está ainda associado ao aumento de fibrose intersticial, atrofia tubular renal e a uma diminuição da taxa de filtração glomerular (Vilarta et al., 2017).

O genoma humano apresenta 2776 locais de ligação aos quais a vitamina D se liga. Muitos desses locais estão concentrados em torno de genes associados a condições autoimunes e à diabetes tipo I. Simultaneamente, esta vitamina regula a diferenciação e a atividade das células T auxiliares, resultando assim numa resposta imune do tipo 1 e do tipo 2 mais eficiente e conseqüentemente uma diminuição no desenvolvimento de células T autoimunes. Por outro lado, a vitamina D aumenta a apoptose das células cancerígenas e protege o ácido desoxirribonucleico (DNA) em células normais (Schwalfenberg, 2012).

Exposições breves e regulares ao sol são assumidas como suficiente para manter a produção adequada de vitamina D e sem evidências da ocorrência de danos no DNA, perante estas condições (Felton et al., 2016).

Todavia, a radiação UVA consegue penetrar na derme, onde se encontram os fibroblastos. Os fibroblastos são células que produzem essencialmente colagénio e elastina, sendo que a senescência destes reflete-se na senescência da derme e, conseqüentemente, da pele. Esse processo de envelhecimento é estimulado por fatores externos, tal como a exposição à radiação UVA e UVB (Xiao et al., 2018). Para além disso, este tipo de radiação está associado ao dano indireto da pele. O dano indireto provoca alterações nas macromoléculas através da produção de espécies reativas de oxigénio (RS). A pele contém vários cromóforos com a capacidade de absorver radiação UVA, sendo alguns deles a melanina e precursores da melanina. Os cromóforos, ao absorverem a radiação, levam à formação de estados fotoexcitados, o que, por sua vez, induzem a formação de RS. O estado fotoexcitado intermediário pode interagir com moléculas do substrato e, através de dois tipos de mecanismo (tipo I e do tipo II), pode formar grandes quantidades de RS. O mecanismo do tipo I envolve uma cadeia complexa de eventos que começam com a transferência de energia de um fotossensibilizador num estado de energia triplo e que dá origem a radicais como o superóxido, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo. O mecanismo do tipo II, contrariamente, envolve a transferência direta de energia de um fotossensibilizador num estado de energia triplo para uma molécula de oxigénio que resulta na formação de oxigénio singlete (molécula de oxigénio eletronicamente excitada) e a subsequente oxidação de biomoléculas. Paralelamente, a radiação UVA pode ainda induzir RS através de atividades enzimáticas (Schuch et al., 2017).

Muitos RS participam em mecanismos de sinalização celular. Contudo, a produção excessiva dos mesmos interfere na integridade e função celular em biomoléculas suscetíveis à oxidação. A peroxidação de lípidos, conseqüência do excesso de RS, pode desestabilizar a membrana levando à mutagénese e à morte celular. Outra conseqüência do aumento de RS é a oxidação de proteínas,

fazendo com que estas percam ou ganhem funções no interior da célula ou que formem ligações cruzadas com o DNA e que impossibilitem a replicação e transcrição (Schuch et al., 2017).

Os processos oxidativos ocorrem a uma velocidade que aumenta num curto espaço de tempo e não podem ser evitados completamente, uma vez que as moléculas oxidadas não podem retornar ao seu estado original. Assim, o controlo deste processo apresenta um grau de dificuldade elevado (Schuch et al., 2017).

A radiação UVB atinge a epiderme. Nesta camada encontram-se células como os queratinócitos e os melanócitos, sendo que estas últimas se encontram na parte inferior da camada. Os melanócitos produzem melanina (responsável pela pigmentação da pele). Ao incidir radiação UVB neste tipo de células ocorre uma estimulação da produção de melanina (Hoerter et al., 2012; Priyanka et al., 2018; Xiao et al., 2018). Por outro lado, apesar da radiação UVA penetrar mais a pele, o comprimento de onda da radiação UVB está dentro do espectro de absorção do DNA e, por isso, consegue provocar diretamente danos no mesmo. As pirimidinas, essencialmente as da posição 5-6 da ligação dupla, são vulneráveis ao dano direto por parte da radiação, e quando esta incide há a quebra da ligação, podendo resultar na formação de interações covalentes anormais (Schuch et al., 2017) (**Figura 1**). Assim, a radiação UV consegue provocar danos de forma direta ou indireta no DNA e consequentemente a mutagénese das células da pele.

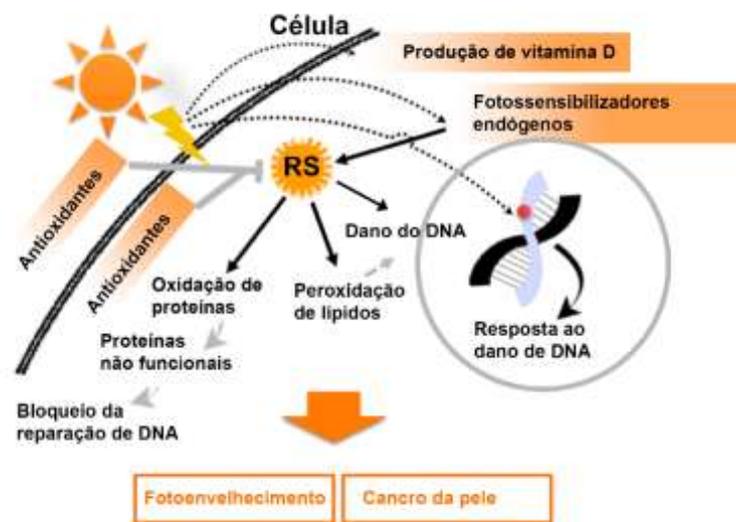


Figura 1 – Danos causados na pele devido à radiação solar (imagem adaptada de Schuch et al., 2017).

Embora a radiação UVA esteja mais associada ao método de dano indireto, este tipo de radiação não é completamente inócuo no dano direto, assim como, a radiação UVB também consegue atingir a camada intermédia da pele e provocar danos indiretos. Estes efeitos justificam-se devido ao espectro de comprimento de onda que cada tipo de radiação pode adquirir (Schuch et al., 2017; Xiao et al., 2018).

As lesões induzidas direta ou indiretamente pela radiação solar, tal como dito anteriormente, estão essencialmente associadas ao melanoma (tipo mais agressivo de cancro da pele) e ao fotoenvelhecimento. No entanto, não se cingem apenas estes problemas, estando ainda associadas a queimaduras solares e problemas oculares (Amaro-Ortiz et al., 2014) (Figura 2).

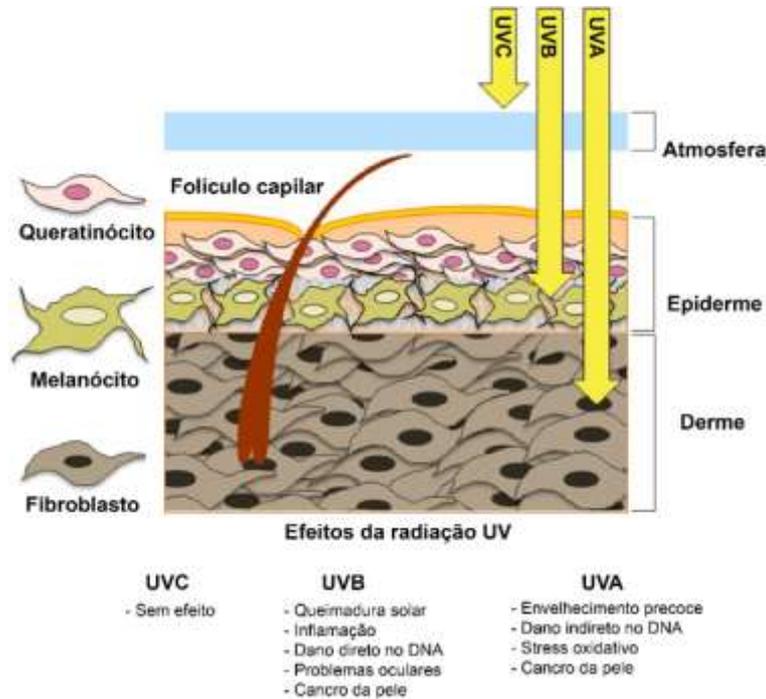


Figura 2 - Penetração da radiação solar na pele e os seus danos (imagem adaptada de Amaro-Ortiz et al., 2014).

Assim, face aos problemas que a radiação provoca aquando a pele está exposta excessivamente, é necessário utilizar formas de proteção. O organismo apresenta três sistemas de proteção: o espessamento da camada córnea, o suor e a melanina. No entanto, esses sistemas não são suficientes, visto que apresentam limitações, dado a exposição excessiva a que os indivíduos se colocam. Para tal, recorre-se a protetores solares. Estes são utilizados para proteger e minimizar os danos a que a pele está exposta e existem dois tipos de protetores solares: os protetores inorgânicos (também denominados filtros físicos) e os filtros químicos. Os protetores solares inorgânicos são inertes e incluem os óxidos metálicos, sendo o dióxido de titânio e o óxido de zinco os mais utilizados, e que geralmente refletem a radiação solar. Contudo, apresentam um efeito protetor de pequena extensão devido à sua absorção pela pele. No que diz respeito aos filtros químicos, estes são compostos orgânicos e geralmente protegem a pele absorvendo a radiação e emitindo-a sob a forma de calor ou fluorescência. Este tipo de filtros abrange um maior grupo de compostos, tais como: ácido *p*-aminobenzóico e seus derivados, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, derivados da cânfora, derivados do dibenzoilmetano e antranilatos. No entanto, este tipo de filtros também apresenta limitações. Apesar de serem encontrados em muitos produtos de cuidado pessoal, eles têm

sido considerados como contaminantes emergentes com possíveis efeitos deletérios a longo prazo (Ao et al., 2018; Nunes et al., 2018). Idealmente, os protetores solares não devem ser tóxicos, sistemicamente absorvidos e causar reações alérgicas. Contudo, existem preocupações acerca da sua segurança, nomeadamente, os efeitos adversos, como fototoxicidade e ocorrência de reações alérgicas (Cefali et al., 2019). Como indicador da eficácia destes protetores em bloquear a radiação UVB, é utilizado o fator de proteção solar (FPS).

1.1. Fototipos de pele

A pele é um órgão multifuncional, que tem a capacidade de se adaptar às variações de ambiente e às necessidades do organismo, cobrindo-o na sua totalidade (Ribeiro, 2010).

A coloração da pele depende de diversos fatores, mas principalmente da produção de melanina. Trata-se de um cromóforo, que dá pigmentação à pele e ao cabelo e é produzida pelos melanócitos, os quais se localizam na camada basal da epiderme. Este cromóforo pode ser de três tipos: eumelanina (cor castanha escura), feomelanina (cor vermelha) e a tricocromo (cor amarela) (Ribeiro, 2010).

A coloração da pele não está diretamente associada ao número de melanócitos, mas sim à atividade destes, uma vez que independentemente da etnia, o número médio destas células é de 1500 por mm². Por outro lado, a atividade dos melanócitos é estimulada pela radiação solar e simultaneamente, o aumento da produção de melanina tem como objetivo a proteção da pele, refletindo a radiação solar e promovendo a absorção dos RS produzidos no citoplasma dos queratinócitos. No caso da feomelanina, com a incidência da radiação UV, esta sofre degradação e diminui a capacidade de absorver RS, levando a alterações no DNA (Ribeiro, 2010).

Numa perspetiva genérica e bioquímica, a produção de melanina consiste na oxidação da tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), que conseqüentemente é oxidada em dopaquinona, sendo ambas as reações catalisadas pela enzima tirosinase. A atividade da tirosinase, assim como a melanina, aumenta com a incidência da radiação UV. Desse modo, a hipófise produz a hormona estimulante dos melanócitos (MSH), com a capacidade de provocar alterações na morfologia dos melanócitos e aumentar a síntese de tirosinase. Esta hormona liga-se a recetores de melanocortina 1 (MC1R) na membrana dos melanócitos e estimula o aumento do monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), por sua vez, aumenta a produção de tirosinase e a captação de tirosina (Ribeiro, 2010) (Figura3).

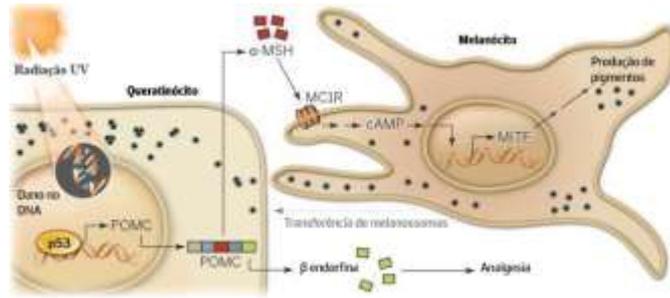


Figura 3 - Resposta cutânea à radiação UV (imagem adaptada de Lo & Fisher, 2014)

A conversão da tirosina em DOPA é decisiva neste processo da melanogénese, considerando que as reações seguintes ocorrem de maneira fisiológica espontânea. Uma vez obtida a dopaquinona, esta poderá reagir com oxigénio ou enxofre (cisteína). Quando a reação ocorre com oxigénio, dá-se uma ciclização interna da molécula resultando num dopacromo que, por conseguinte, poderá sofrer dois tipos de reações, ambas espontâneas e no final, forma-se a eumelanina. Caso a reação da dopaquinona ocorra com a cisteína, originam-se cisteinildopas, que são oxidadas a metabólitos benzotiazina formando no final a feomelanina (Ribeiro, 2010) (Figura 4).

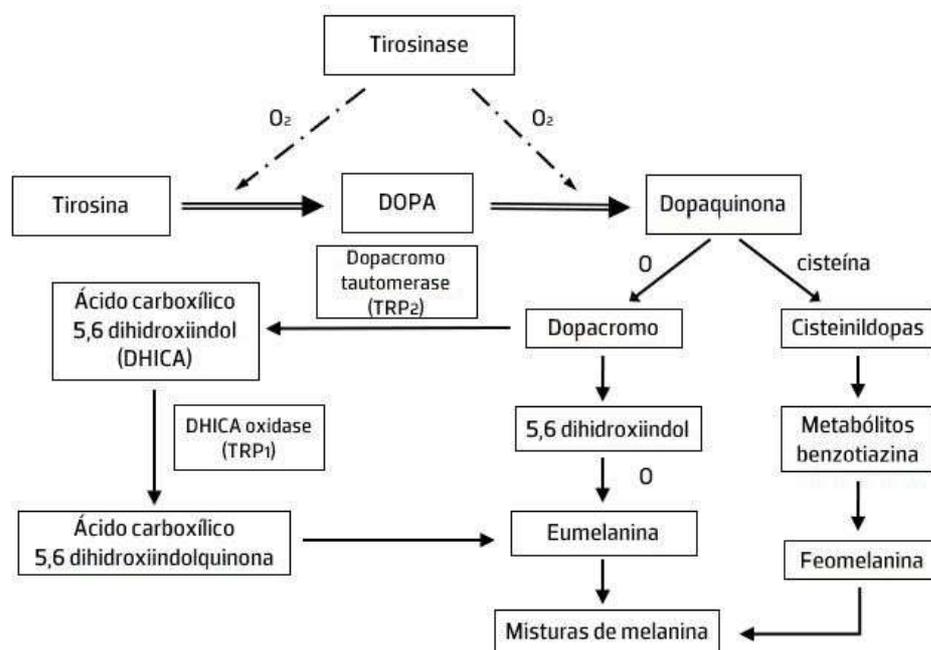


Figura 4 - Síntese das melaninas (Ribeiro, 2010)

No interior dos melanócitos, existem organelos denominados por melanossomas, os quais contêm a tirosinase. Os melanossomas com melanina, dependendo do tamanho ou da forma, são transferidos para os queratinócitos e degradados pelos fagolisossomas, eliminando posteriormente a melanina na

superfície cutânea e na derme. Este processo está relacionado diretamente com a intensidade da pigmentação da pele (Ribeiro, 2010).

A pele pode ser classificada em fototipos segundo Fitzpatrick (**Tabela 1**). A escala de Fitzpatrick é uma escala semi-quantitativa composta por seis fototipos que descrevem a cor da pele, a quantidade de melanina, a resposta inflamatória à radiação solar e o risco de cancro. Adicionalmente, existe um método quantitativo, a dose eritematosa mínima (DEM), para determinar a quantidade de radiação UV (particularmente UVB) necessária para provocar eritema e edema. Assim, quanto mais clara a pele, mais fácil é a radiação causar inflamação cutânea (D’Orazio et al., 2013).

Tabela 1 – Escala de Fitzpatrick, pigmentação da pele e risco da radiação UV (adaptada de D’Orazio et al., 2013).

Fototipo Fitzpatrick	Fenótipo	Melanina Epidérmica	Resposta cutânea à radiação	DEM*	Risco de cancro
I	A pele não exposta é branca e brilhante Olhos azuis/verdes Frequentemente com sardas Norte da Europa/Britânico	+ / -	Queima sempre Descama Nunca bronzeia	15-30	++++
II	A pele não exposta é branca Olhos azuis, cor de avelã ou castanhos Cabelo ruivo, loiro ou castanho Europeu ou Escandinavo	+	Queima facilmente Descama Bronzeia minimamente	25-40	+++ /++++
III	A pele não exposta é clara Olhos escuros Cabelo escuro Europa central ou sul	++	Queima moderadamente Capacidade média de bronzeamento	30-50	+++
IV	A pele não exposta é castanha clara Olhos escuros Cabelo escuro Mediterrâneo, Asiático ou Latino	+++	Queima pouco Bronzeia facilmente	40-60	++
V	A pele não exposta é castanha Olhos escuros Cabelo escuro Índio oriental, Americano nativo, latino ou Africano	++++	Raramente queima Bronzeia facilmente e substancialmente	60-90	+
IV	A pele não exposta é escura Olhos escuros Cabelo escuro Ascendência americana ou Aborígene	+++++	Quase nunca queima Bronzeia facilmente e de forma intensa	90-150	+/-

* (mJ/cm²)

– menor quantidade de melanina / menor risco de cancro; +++++ maior quantidade de melanina/maior risco de cancro

A uma pele escura está associada um maior número de melanossomas, com um tamanho superior e individualizados, comparativamente a uma pele clara. Contudo, a exposição à radiação solar provoca o aumento do tamanho dos melanossomas e a sua distribuição na epiderme (Ribeiro, 2010).

1.2. Cancro da Pele

A radiação solar ao incidir na pele pode provocar alterações na molécula de DNA, levando assim ao aparecimento de células anormais. Assim, as células ao replicarem-se irão formar clones atípicos e caso este processo não seja travado continuarão a proliferar acabando por formar um tumor (Corrêa, 2012).

1.2.1. Epidemiologia

A incidência de cancro da pele nas últimas décadas tem aumentado. Anualmente, a nível global ocorrem entre 2 e 3 milhões de casos de cancro da pele do tipo carcinoma e cerca de 132 000 do tipo melanoma. Cerca de um em cada três cancros diagnosticados corresponde a cancro da pele (WHO, 2017). Este cancro tem uma maior prevalência no sexo masculino e em indivíduos de raça branca. Geralmente, a doença é diagnosticada em indivíduos com idade compreendida entre os 65 e os 74 anos, sendo a idade média de diagnóstico os 65 anos. A maior taxa de mortalidade ocorre, também, entre os 65 e os 74 anos, sendo a idade média dos óbitos 71 anos (National Cancer Institute, 2018).

Em Portugal, estima-se que o aparecimento de novos casos de carcinomas seja mais de 100.000 por ano. No caso do melanoma, a estimativa de incidência é de 1000 novos casos por ano (Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo, 2012).

1.2.2. Tipos de Cancro

O cancro da pele pode ser dividido em três tipos principais, dependendo das características de exposição e da frequência de queimaduras solares, o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma (Ribeiro, 2010).

O carcinoma basocelular é o mais comum e tem origem na camada mais profunda da epiderme. Apresenta um crescimento lento e as lesões aparecem nas áreas mais expostas, como a cabeça e o pescoço. A recorrência do carcinoma basocelular é frequente devido à destruição local do tecido e o seu surgimento está relacionado com a exposição acumulativa da pele à radiação UV. Apesar de ser o mais comum, este tipo de cancro raramente metastiza (Ribeiro, 2010).

No caso do carcinoma espinocelular, é mais agressivo que o anterior e pode metastizar para os gânglios linfáticos e atingir outros órgãos. Tem origem na camada média da epiderme e geralmente aparece nas áreas expostas à radiação. Contudo, pode desenvolver-se em qualquer região da pele. A exposição cumulativa à radiação solar ao longo da vida é apontada como o precedente deste tipo de cancro (Ribeiro, 2010).

O melanoma é o tipo mais agressivo de cancro da pele, tem tendência a metastizar precocemente e origem na transformação maligna dos melanócitos. Neste caso, o aparecimento pode iniciar-se como

um pequeno tumor cutâneo pigmentado sobre a pele ou a partir de nevos pigmentados pré-existentes. Este tipo de cancro está associado a uma exposição excessiva e breve à radiação UV e a um histórico de queimaduras solares. Contudo, este último é o menos frequente, correspondendo acerca de 10% dos casos (Ribeiro, 2010).

1.2.3. Fatores de Risco

Segundo a Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo (APCC), o principal risco para o aparecimento do cancro da pele é a exposição solar. No entanto, existem outros fatores de risco, tais como, o número e distribuição de nevos, suscetibilidade genética, a idade e o número de queimaduras solares (Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo, 2012).

Os nevos são tumores melanocíticos benignos e podem ser adquiridos ou congénitos. O desenrolar dos anos, faz com que o aparecimento de nevos aumente, assim como, quanto maior a suscetibilidade genética. O aumento do número de queimaduras solares, faz com que a aparecimento de nevos atípicos e de lesões pré-malignas também aumente (Carvalho, 2012).

Deste modo, é importante avaliar as lesões pigmentadas e fazer o rastreio de melanoma para que a deteção de anomalias seja realizada num estado precoce. Assim, utiliza-se a regra ABCDE, não só pela comunidade médica, mas também de modo a que seja possível um autorastreio. A regra ABCDE consta numa mnemónica, no qual a letra "A" corresponde à assimetria do nevo, a letra "B" ao bordo irregular, a letra "C" à evidência de várias cores, a letra "D" ao diâmetro, o qual não deve superar os 5mm e a letra "E" que diz respeito à evolução das características do nevo. Qualquer alteração num dos parâmetros poderá ser indicativo de cancro (Cunha, 2012).

1.3. Fator de Proteção Solar

O FPS é um valor laboratorial utilizado nos protetores solares como representação da proteção destes contra as queimaduras solares, indicando quanto tempo um indivíduo pode ficar exposto à radiação UV usando um filtro solar sem desenvolver eritema. Contudo, este valor não pode ser diretamente traduzido numa estimativa de proteção ou comportamento seguro. O FPS é calculado através da DEM, ou seja, é a relação entre a dose de energia UV necessária para obter um eritema mínimo com um filtro solar e a dose de energia UV necessária para obter um eritema mínimo sem filtro. Deste modo, quanto maior o FPS utilizado, maior será o tempo a que a pele poderá estar exposta à radiação solar (Ribeiro, 2010).

Equação 1 – Cálculo do Fator de Proteção Solar segundo a dose eritematosa mínima

$$FPS = \frac{DEMp}{DEMs/p}$$

FPS: Fator de Proteção Solar; **DEMp**: Dose eritematosa mínima com proteção; **DEMs/p**: Dose eritematosa mínima sem proteção.

Existem metodologias *in vitro* e *in vivo* para determinar o FPS. A metodologia *in vitro* é utilizada no processo de desenvolvimento do protetor solar ou estudo da atividade biológica de compostos, e é realizada antes dos testes *in vivo*. No primeiro tipo de metodologia, são realizados ensaios que têm por base a análise espectrofotométrica, sendo que o ensaio mais utilizado é a determinação do FPS segundo a equação de Mansur et al., (1986). A equação estabelece a relação entre o efeito eritematogénico, a intensidade da radiação e a absorvância da amostra num determinado comprimento de onda (Alves et al., 2009; Secco et al., 2019).

Equação 2 – Equação de Mansur para a determinação do fator de proteção solar

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

CF: Fator de correção; **EE**(λ): Efeito erimatogénico no comprimento de onda λ ; **I**(λ): intensidade da radiação no comprimento de onda λ ; **Abs**(λ): absorvância no comprimento de onda λ .

Os ensaios *in vivo* utilizam voluntários humanos que diferem em alguns aspetos e existem duas metodologias utilizadas para a determinação do FPS, o método norte americano segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) e o método europeu COLIPA ou Internacional (Ribeiro, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 – Metodologia *in vivo* segundo a *Food and Drug Administration* e o método Europeu (adaptada de Schalka et al., 2011 e Ribeiro, 2010).

	FDA (1999)	Internacional (2006) CTFA, COLIPA e JCIA
Fonte de luz	Simulador solar com lâmpada de arco xenônico	Simulador solar com lâmpada de arco xenônico
Voluntários	Máximo de 25 incluídos ≥ 20 para dados válidos	Máximo de 20 incluídos ≥ 10 para dados válidos
Fototipos dos voluntários (Fitzpatrick)	I a III	I a III
Região de Aplicação	Região dorsal inferior	Região dorsal inferior
Padrão	FPS 4,47 ± 1,279	4,2 ± 0,2 12,7 ± 1,2 15,5 ± 1,5
Quantidade de Aplicação	2mg/cm ² ou 2μL/cm ²	2mg/cm ² ± 2,5%
Período de espera	≥ 15 minutos	15 a 30 minutos
Fator entre estágios simples (aumento da intensidade de radiação na determinação da DEM)	FPS < 8 : 0,64X; 0,80X; 0,90X; 1X; 1,10X; 1,25X; 1,56X 8 ≤ FPS ≤ 15 : 0,69X; 0,83X; 0,91X; 1X; 1,09X; 1,20X; 1,44X FPS > 15 : 0,76X; 0,87X; 0,93X; 1X; 1,07X; 1,15X; 1,32X	FPS > 25 : 12%
Leitura da DEM	22 a 24 horas	16 a 24 horas
Determinação do FPS final	Valor do FPS médio do grupo-IC95%	Valor do FPS médio do grupo
Critério Estatístico de aceitação	-	IC 95% dentro do intervalo ± 17% do FPS médio

A determinação do valor foi padronizada para os protetores solares a um nível de aplicação de 2mg/cm². Todavia, o nível aplicado pelos indivíduos é bastante inferior o que faz com que o FPS real seja inferior ao FPS apresentado na rotulagem (Ribeiro, 2010).

1.4. Agentes antioxidantes

De modo a contornar as limitações dos protetores solares, vários compostos naturais têm sido utilizados como modo de proteção. Os antioxidantes são substâncias que inibem ou bloqueiam os processos oxidativos através de diversos métodos, impedindo o aparecimento de doenças (Corrêa, 2012).

O tipo de oxidação mais comum é a oxidação lipídica. Este processo não pode ser evitado ou bloqueado completamente. Contudo, pode ser diminuído de modo a obter estabilidade. Posto isto, o conhecimento de moléculas antioxidantes capazes de retardar estes processos é importante para manter a integridade cutânea (Corrêa, 2012).

Os antioxidantes podem ser classificados como naturais ou sintéticos, consoante a sua origem. Inerente à necessidade de se obter uma proteção mais efetiva e económica, foram desenvolvidos os antioxidantes sintéticos, sendo os mais utilizados o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o galato de propilo e o *tert*-butilhidroquinona (TBHQ). Todavia, estes antioxidantes apresentam limitações. Devido à sua alta volatilidade, o BHT não pode ser exposto a temperaturas altas; no caso do BHA, este é associado a uma alta instabilidade. O galato de propilo tem como desvantagem a produção de compostos coloridos na presença de iões metálicos. Na presença de algumas proteínas e sais de sódio o TBHQ é capaz de formar complexos (Corrêa, 2012). Além das desvantagens que cada antioxidante sintético apresenta, a toxicidade tem sido apresentada como um problema comum, tornando-os prejudiciais à saúde. Como alternativa aos antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais têm sido alvo de estudo, pois estão associados a um efeito benéfico superior (Del Ré et al., 2012; Priyanka et al., 2018).

Na natureza, a radiação UV induz a acumulação de flavonóides e outros compostos fenólicos nas plantas, para que estas os utilizem como proteção contra os danos provocados pela radiação. Estes compostos para além da capacidade absorptiva perante a radiação UV, atuam também como antioxidantes e agentes anti-inflamatórios, fornecendo assim uma proteção adicional. Além dos compostos fenólicos, os organosulfurados e os terpenóides estão, também, associados à capacidade antioxidante. Este tipo de compostos neutraliza RS, tem a capacidade de quelar metais e bloquear a ação de espécies reativas. Assim, devido à variada atividade biológica e menos efeitos adversos provocados no organismo, as substâncias naturais têm sido alvo de atenção quanto à proteção solar nos últimos anos (Nunes et al., 2018; Priyanka et al., 2018).

1.5. Plantas Medicinais e Proteção Solar

As plantas têm capacidade de sintetizar metabolitos secundários. Essa capacidade é ainda mais comum nas plantas selvagens, uma vez que desenvolvem mecanismos de sobrevivência e adaptação para competir com outras e contornar as advertências do meio em que se desenvolvem (Rodrigues et al., 2009).

Uma vez que a exposição à radiação é influenciada pela altitude, plantas que crescem em ecossistemas com altitudes elevadas, tendem a estar expostas a altos níveis de radiação solar e a baixas temperaturas. Como forma de proteção, estas plantas produzem compostos para se defenderem contra o stress oxidativo e de forma a absorverem a radiação UV. Os grupos de compostos mais comuns neste tipo de plantas são os polifenóis e os terpenos (Puertas-Mejía et al., 2018).

Os polifenóis pertencem ao grupo de compostos fenólicos. No entanto, são designados deste modo devido à sua estrutura (Cheynier, 2012). Este tipo de compostos inclui outras subclasses como é o caso

dos flavonóides e taninos. De um modo generalizado, este grupo de compostos apresenta capacidade antioxidante e conseqüentemente um potencial na prevenção de doenças relacionadas com a produção de radicais oxidativos livres (Georgé et al., 2005). Os flavonóides, por sua vez, têm como principal função a proteção dos tecidos das plantas contra a radiação UV, tornando-se num grupo importante quanto à proteção solar. Este tipo de compostos apresenta capacidade quelante de iões metálicos e capacidade de eliminar radicais livres (Cheynier, 2012; Kwon et al., 2019).

Os terpenóides são o grupo de compostos naturais mais numeroso e estruturalmente diverso encontrado nas plantas. Este grupo de compostos está associado a várias atividades biológicas, ao aroma da planta e apresenta subclasses como é o caso dos diterpenóides e dos triterpenóides (Ludwiczuk et al., 2017). Os diterpenóides compreendem um grupo de compostos quimicamente heterogéneo e são uma classe importante de metabolitos secundários, estando associados à atividade antimicrobiana (ex: capacidade antifúngica). Contudo, ainda não há evidências científicas suficientes dessa capacidade nos dermatófitos que os seres humanos apresentam (Ludwiczuk et al., 2017; Pasdaran & Hamed, 2017). Os triterpenóides são descritos como anti-inflamatórios, antivirais e antimicrobianos (Ríos, 2010).

Devido às substâncias químicas ativas presentes nas plantas, estas produzem um determinado efeito biológico, e por isso, são utilizadas na medicina e na dermocosmética. Assim, plantas com capacidade antioxidante e capacidade de absorção da radiação solar são alvo de estudo, com o objetivo de utilizar os compostos naturais presentes nestas como filtros solares (Puertas-Mejía et al., 2018).

De salientar que a concentração de compostos pode variar nas plantas, incluindo na mesma espécie, devendo-se tal à fase vegetativa que a planta se encontra no processo de colheita e à produção de mecanismos que estas produzem contra as adversidades do meio em crescerem (Gonçalves et al., 2018).

Portugal apresenta uma flora diversificada, rica em plantas endémicas e autóctones, sendo importante aproveitar o potencial natural existente e, por isso, as plantas utilizadas no estudo crescem em território continental.

1.5.1. *Pterospartum tridentatum*

Pterospartum tridentatum (L.) Willk. (um sinónimo de *Genista tridentata* L.) pertence à família Fabaceae e é habitualmente conhecido por “carqueja” ou “carqueija”. Esta planta cresce em áreas montanhosas ou em terrenos abandonados com solos ácidos e atinge aproximadamente os 100cm de altura. Visualmente, apresenta flores amarelas, ramos alternados e caules coriáceos (Grosso et al., 2007; Coelho et al., 2011) (Figura 5).

Trata-se de uma planta comum na Península Ibérica e no Norte de África devido às condições termo-Mediterrânicas. Em Portugal, é bastante comum no Norte e Centro (Coelho et al., 2011; Roriz et

al., 2014). Tradicionalmente, é utilizada para vários distúrbios como a diabetes tipo II, doenças do trato digestivo, a hipertensão, pneumonia, bronquite, dores de cabeça, gripe, problemas de fígado, de rins e de bexiga (Coelho et al., 2011).

O extrato aquoso da planta *P. tridentatum* contém terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos, incluindo flavonóides (Coelho et al., 2011). Para além disso, foram identificados compostos como, taxifolina, miricetina, ginestina, ginesteína e derivados de ginesteína no extrato metanólico (70% V/V) da planta. Estes compostos estão associados a atividade anti-radical (Aires et al., 2016). O extrato aquoso da flor do *P. tridentatum*, demonstrou efeito protetor, a concentrações ≥ 0.3 mg/mL, em células endoteliais contra lesões oxidativas induzidas por H_2O_2 (Vitor et al., 2004).

Por sua vez, Coelho et al., (2011) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais (TFT) no extrato aquoso da planta *P. tridentatum* e a sua atividade antioxidante. Para tal, colheram a planta de três localizações diferentes e durante duas fases vegetativas distintas (período de dormência e período de floração). Os resultados obtidos indicaram que a planta no período de dormência apresentava um maior TFT, mas por sua vez, os resultados relativos à capacidade antioxidante foram semelhantes em ambas as fases vegetativas.



Figura 5 -Planta *Pterospartum tridentatum* (Sociedade Portuguesa de Botânica, 2012b).

1.5.2. *Melilotus indicus*

A planta *Melilotus indicus* (L.) All. pertence à família Fabaceae e é comum em vários países da Ásia e Europa, incluindo Portugal. Várias espécies do género *Melilotus* têm demonstrado atividade antibacteriana, anticoagulante, anti-inflamatória, antioxidante e laxante (Stefanović et al., 2015). O género contém cerca de 25 espécies, que utilizadas em grandes quantidades, são consideradas venenosas (Abd El-Hafeez et al., 2018; Ahmed et al., 2012) (**Figura 6**). A planta *M. indicus* é uma planta anual, pequena (50 cm), com flores de cor amarelo claro. Tradicionalmente, é utilizada como antioxidante, analgésica e inseticida em doenças inflamatórias, no tratamento da psoríase, feridas e gastrites (Saleem et al., 2020).

Estudos realizados ao nível fitoquímico demonstraram a presença de compostos terpenóides, esteróis, flavonóides glicosídeos e cumarinas no *M. indicus*. Deste modo, a planta é apresentada com

capacidade antioxidante, anti-inflamatória e elevada capacidade citotóxica em células cancerígenas (Abd El-Hafeez et al., 2018; Saleem et al., 2020). No entanto são ainda escassos os estudos que avaliam as atividades biológicas da planta.

Por sua vez, Ahmed et al., (2012) avaliaram o TFT, o teor de flavonóides e a atividade antioxidante num extrato metanólico e nas suas sub-frações. Para tal, colheram a planta em duas fases vegetativas distintas (período de floração e período de frutificação) e utilizaram as partes aéreas durante o processo extrativo. Os resultados, demonstraram que a planta apresentava um maior TFT, maior teor de flavonóides e melhores valores para a capacidade antioxidante no período de frutificação. Como conclusão, os autores defendem a necessidade de avaliar a fase vegetativa em que a planta se encontra aquando a colheita, de modo a que esta tenha uma maior concentração compostos antioxidantes.



Figura 6 – Planta *Melilotus indicus* (Sociedade Portuguesa de Botânica, 2012a)

Sendo as plantas uma fonte ilimitada de moléculas bioativas e com estruturas químicas muito diversificadas é importante o estudo do potencial de proteção solar de fontes vegetais, de forma a tornar possível a utilização das mesmas para combater/minimizar os problemas associados à exposição solar excessiva. Ademais, aumenta-se o conhecimento das plantas existentes em Portugal, visto que os estudos científicos acerca das mesmas são ainda escassos.

1.6. Objetivos do Estudo

O trabalho apresenta como principais objetivos:

- Identificar os principais grupos de compostos bioativos presentes nas espécies vegetais *Pterospartum tridentatum* e *Melilotus indicus*, recorrendo a um *screening* fitoquímico;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de extratos de *Pterospartum tridentatum* e *Melilotus indicus*, recorrendo ao ensaio do radical DPPH e da quelação do ferro;
- Determinar a capacidade de absorção ultravioleta e o fator de proteção solar de extratos de *Pterospartum tridentatum* e *Melilotus indicus*.

2. Métodos

2.1. Reagentes

O metanol, etanol, ácido sulfúrico e clorofórmio foram fornecidos pela Fisher Chemical (St. Louis, EUA). O cloreto férrico, carbonato de sódio, reagente Folin-Ciocalteu, sulfato de ferro (II) heptahidratado, reagente de Dragendorff, sulfóxido de dimetilo (DMSO) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) foram obtidos pela VWR Chemicals™ (Radnor, EUA). A quercetina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido gálico e ferrozina foram fornecido pela SIGMA-Aldrich® (St. Louis, EUA). O acetato de chumbo (II) tri-hidratado foi fornecido pela Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Por fim, o acetato de cobre foi obtido pela Dr. Paul Lohmann® (Emmerthal, Alemanha).

2.2. Material Vegetal e Preparação dos Extratos

As espécies vegetais utilizadas no estudo (*M. indicuse* e *P. tridentatum*) foram obtidas nos meses de junho e julho de 2019, em Esmoriz (Ovar, Portugal) e Valongo (Porto, Portugal), respetivamente. As plantas foram depois identificadas por especialistas da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto com base na literatura e por comparação com outras amostras de herbário. Após a identificação botânica, as plantas foram limpas e secas em estufa, por 48h, a 40 °C, para posterior preparação dos extratos (aquoso e metanólico).

O processo de extração da espécie *P. tridentatum* baseou-se no método descrito por Kenny et al., (2014) com pequenas alterações. Os extratos foram preparados por maceração de 15 g das partes aéreas secas e contundidas com 150 mL de água ou metanol 80% (V/V) (extrato aquoso e metanólico, respetivamente), com agitação, protegidos da luz, durante 3h, à temperatura ambiente.

O processo de extração da espécie *M. indicus* foi realizado segundo o descrito por Stefanović et al., (2015) com algumas adaptações. Os extratos foram preparados por maceração de 15g das partes aéreas secas e contundidas com 75 mL de água destilada ou metanol 80% (V/V) (extrato aquoso e metanólico, respetivamente), durante 24h, protegidos da luz e à temperatura ambiente.

No final, todas as soluções foram filtradas (papel de filtro nº 1 Whatman), concentradas em evaporador rotativo (VWR, IkaRV8) (extratos metanólicos) e liofilizadas (extratos aquosos e metanólicos) (LABCONCO FreeZone series). As amostras obtidas foram armazenadas a -80 °C para análises posteriores.

2.3. Screening Fitoquímico

O *screening* fitoquímico foi realizado para identificação dos compostos fenólicos, flavonóides, polifenóis, diterpenóides, terpenóides, taninos, triterpenóides e alcalóides.

2.3.1. Compostos Fenólicos

Pipetou-se 2,5 mL de extrato para um tubo de ensaio e adicionou-se 5-10 gotas de cloreto férrico (5%) para a identificação de compostos fenólicos. O aparecimento de uma coloração azul escura indica a presença deste grupo de compostos (Kushwaha, 2019).

2.3.2. Polifenóis

Para a identificação dos polifenóis, pipetou-se 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 400 µL de solução de carbonato de sódio, e 100 µL de extrato. Por fim, incubou-se a temperatura ambiente durante 2h (Georgé et al., 2005). O aparecimento de uma coloração azul escura identifica a presença de polifenóis.

2.3.3. Flavonóides

Adicionou-se algumas gotas de acetato de chumbo (5%) (não ultrapassando os 2 mL) a 2,5 mL de extrato (Joshi et al., 2013). A presença de flavonóides é identificada através da formação de um precipitado de cor branco-amarelado.

2.3.4. Taninos

Para determinar a presença de taninos adicionou-se 5-10 gotas de cloreto férrico (1%), a 2,5mL de extrato. A presença de taninos é identificada através do aparecimento de uma coloração verde-acastanhada (Aziz, 2015).

2.3.5. Diterpenóides

Na identificação de diterpenóides, adicionou-se 4-10 gotas de acetato de cobre (5%) a 1 mL de extrato. A presença destes compostos é confirmada pelo aparecimento de uma coloração verde-esmeralda (Yadav et al., 2017).

2.3.6. Terpenóides e Triterpenóides

Para a identificação de terpenóides, a 1 mL de clorofórmio adicionou-se 3 mL de extrato. Lentamente, adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico (até um máximo de 1,5 mL). A formação de um anel vermelho-acastanhado é indicativo da presença de terpenóides e a formação de uma camada de cor amarela indica a presença de triterpenóides (Joshi et al., 2013).

2.3.7. Alcalóides

Para a identificação de alcalóides, acrescentou-se 2 gotas do reagente de Dragendroff a 2,5 mL de extrato. A presença de alcalóides pode ser confirmada pelo aparecimento de um precipitado vermelho (Aziz, 2015; Joshi et al., 2013).

2.4. Ensaio para determinação do potencial antioxidante

2.4.1. Ensaio do radical DPPH

O ensaio realizado foi adaptado do método descrito por Ahn et al. (2018). Diferentes concentrações dos extratos foram testadas (extrato metanólico de *P. tridentatum*: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 1250 µg/mL; extrato aquoso de *P. tridentatum*: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 700 µg/mL; extrato metanólico e aquoso de *M. indicus*: 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL). De seguida, às diferentes concentrações dos extratos adicionou-se a solução de DPPH (90 µM) em etanol absoluto e a percentagem do radical DPPH por reagir foi determinada a diferentes tempos, a um comprimento de onda de 515 nm, medido num leitor de microplacas (Dynex Technologies MRX II Microplate Reader). O etanol absoluto foi utilizado como controlo negativo e a quercetina como controlo positivo. A percentagem de inibição do radical DPPH calculou-se pela seguinte fórmula: % inibição DPPH = $[(Ac - As)/Ac] \times 100$, em que Ac = absorvância do controlo, e As = absorvância da amostra. A capacidade antioxidante foi expressa em IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH).

2.4.2. Determinação da Capacidade Quelante do Ferro

O ensaio de determinação da capacidade quelante do ferro foi realizado segundo o referido por Canabady-Rochelle et al. (2015). Analisaram-se diferentes concentrações dos extratos (25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL e 1500 µg/mL). Resumidamente adicionou-se 50 µL de amostra a 50 µL de sulfato de ferro (0,12 mM) e 50 µL de ferrozina (0,6 mM). Incubou-se a placa, protegida da luz e à temperatura ambiente, por 10 minutos. A leitura da absorvância foi feita em leitor de microplacas, a um comprimento de onda de 562 nm. O EDTA foi utilizado como controlo positivo. A capacidade quelante do ferro, em percentagem (%) foi calculada através da seguinte fórmula: $[(Ac - As)/Ac] \times 100$, em que Ac é a absorvância do controlo e As a absorvância da amostra. A capacidade antioxidante foi expressa em IC₅₀ (concentração necessária para quelar 50% do ferro).

2.4.3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Este ensaio foi adaptado dos métodos descritos por Xie et al. (2014) e Kupina et al. (2018). A quantificação do teor de compostos fenólicos totais (TPT) foi feita por espectrofotometria recorrendo ao reagente de Folin–Ciocalteu. Para cada amostra a analisar, misturou-se 250 µL (0,5mg/mL) de extrato com 1,25 mL de reagente Folin (1:10) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (7,5%), incubando-se depois a placa durante 1h. Para o branco, misturou-se 250 µL de água (extrato aquoso) ou metanol 80:20 (V/V) (extrato metanólico) com 1,25 mL de reagente Folin (1:10) e 2 mL de solução de Na₂CO₃ (7,5%). A absorvância foi medida usando um espectrofotómetro (Jenway 6300) a 765 nm. A determinação do TPT foi feita tendo por base a equação da curva do ácido gálico. Assim, o TPT foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por cem gramas de extrato seco, através da seguinte fórmula: $C = (c \times V/m)$; em que C corresponde ao conteúdo de fenólicos totais (µg/g extrato em GAE), c é a concentração de ácido gálico estabelecida pela curva de calibração (µg/mL), V é o volume de extrato em mL e m é a massa do extrato da planta em mg.

2.5. Ensaio de determinação do potencial do fator de proteção solar

2.5.1. Determinação da capacidade de absorção ultravioleta

O ensaio realizado foi adaptado dos métodos descritos por Puertas-Mejía et al. (2018) e Priyanka et al. (2018). Para tal, preparou-se a solução de extrato (1 mg/mL), com os solventes utilizados previamente na técnica extrativa. O ensaio foi feito recorrendo a um leitor de microplacas (Synergy, HTX), com leituras de 50 em 50nm, desde os 200 nm até os 450 nm. Utilizou-se um protetor solar comercial com FPS 50+ como controlo positivo. A preparação da amostra controlo (1 mg/mL) foi realizada segundo o que está descrito por Dutra et al. (2004). O coeficiente de absorção foi calculado segundo a equação: $CA = Abs/(m \times v)$; em que Abs corresponde à absorvância, m é a massa em mg e v é volume em mL.

2.5.2. Determinação do fator de proteção solar

A determinação do FPS foi realizada conforme o descrito por Oliveira et al. (2019); Dutra et al. (2004) e Priyanka et al. (2018) com ligeiras alterações. Para tal, preparou-se a solução stock de extrato (1mg/mL) e de seguida diluições de modo a obter as seguintes concentrações: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 250 µg/mL. O ensaio foi realizado num leitor de microplacas (Synergy, HTX), com leituras de 5 nm em 5 nm, desde os 290 nm até os 320 nm. O FPS foi calculado segundo a equação de Mansur, que estabelece a relação entre o efeito eritematogénico, a intensidade da radiação e a absorvância da amostra num determinado comprimento de onda: $FPS = (CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)) \times FD$; em

que : CF corresponde ao fator de correção; EE (λ) é o efeito erimatogénico no comprimento de onda λ ; I (λ) a intensidade da radiação no comprimento de onda λ ; Abs (λ) é absorvância no comprimento de onda λ e FD é o fator de diluição.

Neste ensaio, utilizou-se o mesmo controlo positivo que no ensaio anterior e a partir da concentração 1 mg/mL, diluiu-se até obtenção das concentrações de 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL, e 250 μ g/mL para este estudo.

2.6. Análise Estatística

Durante os procedimentos laboratoriais, para cada ensaio, foram realizados três ensaios independentes, estando os resultados apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão. Para a análise de dados, utilizou-se os *softwares* Microsoft Excel® 16 e GraphPad Prism® 8, com recurso ao teste ANOVA (Fator único) a um nível de significância de 0,05.

3. Resultados e Discussão

3.1. *Screening* Fitoquímico

Atividades biológicas, como a capacidade antioxidante e o potencial de proteção solar, estão associadas a diferentes grupos de compostos. Assim, foi efetuado o *screening* fitoquímico aos extratos das plantas *P. tridentatum* e *M. indicus* de modo a identificar a presença de grupos de compostos com algum efeito benéfico, capacidade antioxidante e possível efeito fotoprotetor (Priyanka et al., 2018; Stefanović et al., 2015).

O *screening* foi realizado segundo o método tradicional, tendo como objetivo a determinação e prospeção preliminar dos compostos através da aplicação de testes de coloração. Este método é meramente qualitativo e demonstra algumas limitações, tais como, a mistura de solvente utilizada na extração poder não ser a mais apropriada para alguns grupos de compostos, a especificidade de alguns reagentes utilizados ser diferente e a intensa mistura de compostos ou a baixa concentração dos mesmos indicarem resultados falsos. Como vantagens apresenta-se o facto de ser considerado um método rápido, de baixo custo e de fácil execução (Rodrigues et al., 2009).

Os resultados obtidos no *screening* fitoquímico para cada um dos extratos estão apresentados na (Tabela 3).

Tabela 3 - *Screening* fitoquímico para ambos os extratos de cada planta

Grupo de compostos	<i>Pterospartum tridentatum</i>		<i>Melilotus indicus</i>	
	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso
Compostos Fenólicos	+	+	+	+
Polifenóis	-	-	-	-
Flavonóides	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+
Terpenóides	-	-	+	-
Diterpenóides	+	+	+	+
Triterpenóides	-	-	-	+
Alcalóides	-	+	+	+

+ presença ; - ausência

Existem evidências de terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos, incluindo flavonóides, no extrato aquoso da planta *P. tridentatum* (Coelho et al., 2011) e a presença de terpenóides, esteróis, flavonóides glicosídeos e cumarinas no extrato etanólico da planta *M. indicus* (Abd El-Hafeez et al., 2018; Saleem et al., 2020), o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a presença de compostos fenólicos, incluindo flavonóides em ambos os extratos das plantas em estudo, o que vai de encontro ao referido por Ahmed et al., 2012; Aires et al., 2016; Coelho et al., 2011. Os polifenóis, que incluem os flavonóides e taninos apresentam capacidade antioxidante e potencial na prevenção de doenças relacionadas com a produção de RS (Georgé et al., 2005). Os flavonóides, por sua vez, têm como principal função a proteção dos tecidos das plantas contra a radiação UV, tornando-se num grupo importante quanto à proteção solar (Cheynier, 2012; Kwon et al., 2019).

No caso dos taninos, todos os extratos indicaram a presença dos mesmos. A presença destes compostos apenas se encontra documentada no extrato etanólico do *M. indicus* (Saleem et al., 2020). Os taninos são encontrados na maioria dos tecidos vegetais desde os estados de desenvolvimento inicial. Este grupo de compostos possui capacidade antioxidante, de bronzeamento e tem como principal função a proteção das plantas contra vírus, fungos e animais herbívoros (Cheynier, 2012; Gustavson, 1949).

Ahmed et al. (2012), mencionam, também, a presença de taninos e de terpenóides na planta. Não é mencionado, contudo, pelos autores, o tipo de solvente utilizado na extração. Deste modo, pode afirmar-se que o resultado obtido no extrato metanólico da planta *M. indicus* é expectável para os compostos terpenóides. Este extrato foi o único a demonstrar a presença deste grupo de compostos e o extrato aquoso da planta *M. indicus*, por outro lado, foi o único que indicou a presença de triterpenóides. A mistura de solventes utilizada na extração pode não ser a mais apropriada para alguns grupos de compostos e a especificidade de alguns reagentes utilizados ser diferente, o que poderá justificar estes resultados (Rodrigues et al., 2009). Não obstante, nenhuma referência bibliográfica acerca das plantas em estudo refere a presença de triterpenóides. A presença de diterpenóides e polifenóis, também não é referenciada. Todavia, todos os extratos indicaram um resultado positivo para o primeiro grupo de compostos e negativo para o segundo, respetivamente. A presença de diterpenóides poderá não estar referenciada, visto que é uma subclasse dos terpenos. Assim, os estudos poderão apenas averiguar a presença do grupo de compostos mais generalizado.

No caso dos polifenóis, é um grupo de compostos que apresenta como subclasses, tal como referido anteriormente, os flavonóides e taninos. Deste modo, visto que os resultados para estas subclasses deram positivo, seria expectável que para o grupo de polifenóis o resultado fosse semelhante. O resultado negativo obtido poderá ser justificado pela especificidade de alguns reagentes utilizados ser diferente e a intensa mistura de compostos ou a baixa concentração dos mesmos indicarem resultados falsos (Rodrigues et al., 2009).

Os terpenóides estão associados a várias atividades biológicas, ao aroma da planta e apresentam subclasses como é o caso dos diterpenóides e dos triterpenóides (Ludwiczuk et al., 2017). Os diterpenóides compreendem um grupo de compostos quimicamente heterogéneo e estão associados

à atividade antimicrobiana (ex: capacidade antifúngica) (Ludwiczuk et al., 2017; Pasdaran & Hamed, 2017). Os triterpenóides são descritos como anti-inflamatórios, antivirais e antimicrobianos (Ríos, 2010). Os alcalóides estão associados à defesa química de um organismo e são aplicados na medicina como analgésicos, antiarrítmicos, anti-hipertensivos, estimulantes e vasodilatadores (Soltani, 2016).

Para além destes grupos de compostos, todos os extratos à exceção do extrato metanólico de *P. tridentatum* obtiveram um resultado positivo para alcalóides. Contudo e segundo Aires et al. (2016), era expectável que o extrato metanólico desta planta também apresentasse um resultado positivo. A discordância neste resultado, pode dever-se à utilização de métodos fitoquímicos diferentes, visto que o método utilizado pelos autores referidos acima é quantitativo e o método neste estudo é qualitativo. Além disso, métodos qualitativos também poderão apresentar resultados diferentes consoante o reagente de revelação utilizado (Rodrigues et al., 2009).

3.2. Avaliação do Potencial Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante permite determinar a capacidade dos extratos em eliminar radicais livres e determinar a capacidade de quelar iões metálicos. Dessa forma, realizaram-se três ensaios: determinação de TFT, determinação da capacidade de eliminar radicais livres – DPPH e o ensaio de determinação da capacidade quelante do ferro (Nunes et al., 2018; Priyanka et al., 2018). Os resultados destes ensaios estão apresentados na (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação do Potencial Antioxidante

Ensaio	<i>Pterospartum tridentatum</i>		<i>Melilotus indicus</i>		Controlo Positivo
	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	
DPPH ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	169,89 \pm 9,00 ^a	310,33 \pm 27,42 ^b	292,13 \pm 28,81 ^b	316,27 \pm 29,90 ^b	1,85 \pm 0,18 ^c
Ferrozina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	378,75 \pm 24,59 ^a	77,01 \pm 3,58 ^b	160,48 \pm 5,18 ^c	83,15 \pm 6,36 ^b	1,18 \pm 0,01 ^d
TFT (mgGAE/100g)	389,68 \pm 43,94 ^a	615,28 \pm 21,28 ^b	451,2 \pm 48,95 ^a	386,31 \pm 10,77 ^a	-

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada amostra.

A determinação do TFT é um dos métodos mais antigos de quantificação de compostos fenólicos numa amostra e atualmente é utilizado para medir a capacidade antioxidante de uma amostra. Contudo, essa capacidade pode não estar refletida na sua característica de TFT (Tomei et al., 2005). Neste ensaio, os compostos fenólicos presentes nas amostras são oxidados, em meio básico, formando O^{2-} , que por sua vez, reage com o reagente Folin-Ciocalteu formando compostos com bastante absorção perto do comprimento de onda de 750nm (Tomei et al., 2005). Este ensaio tem por base calcular a concentração de compostos fenólicos no extrato através de equações já predefinidas (Kupina et al., 2018; Xie et al., 2014).

O maior TFT foi encontrado no extrato aquoso da planta *P. tridentatum*, sendo este valor significativamente maior, comparativamente com os restantes extratos ($p < 0,05$). O TFT nos extratos foi inferior ao referenciado noutros estudos (Ahmed et al., 2012; Coelho et al., 2011; Neves et al., 2020).

Ahmed et al., 2012, na extração de *M. indicus* utilizaram como solvente metanol e subfrações deste em diferentes solventes. O TFT obtido no extrato metanólico bruto foi de 25 $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$ de extrato, que corresponde a 2500 $\text{mgGAE}/100\text{g}$ de extrato, no período de floração e de 45 $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$, correspondente a 4500 $\text{mgGAE}/100\text{g}$, no período de frutificação. Na subfração aquosa obtiveram valores de 29 $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$ de extrato no período de floração e de 30 $\mu\text{gGAE}/\text{mg}$ de extrato no período de floração, o que corresponde a 2900 $\text{mgGAE}/100\text{g}$ de extrato e 3000 $\text{mgGAE}/100\text{g}$ de extrato, respetivamente. No caso de *P. tridentatum*, Coelho et al. (2011), demonstraram que o extrato aquoso apresenta um TFT superior a $270,7 \pm 70,80$ mgGAE/g no período de floração e superior a $331,7 \pm 35,05$ mgGAE/g no período de dormência. Relativamente ao extrato hidroalcoólico de *P. tridentatum*, o TFT apenas está referenciado para extrato etanólico da flor com 200 ± 8 mgGAE/g extrato (Neves et al., 2020).

Os resultados obtidos no presente estudo são inferiores, o que poderá dever-se à fase vegetativa que as plantas se encontravam no processo de colheita e ao meio em que se encontravam durante o seu desenvolvimento (Gonçalves et al., 2018).

Os compostos fenólicos são descritos com capacidade antioxidante, devido à sua estrutura química ideal para doação de eletrões e capacidade de quelar iões metálicos. O ensaio de determinação de eliminação de radicais livres demonstra a capacidade dos extratos de *P. tridentatum* e *M. indicus* em doar o hidrogénio e reduzir o DPPH. Este método tem por base a capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogénio. Na presença de substâncias antioxidantes, o radical DPPH recebe o ião H^+ , sendo então reduzido. A redução é facilmente detetada por espectroscopia, uma vez que o radical inicialmente apresenta uma coloração púrpura e aquando reduzido passa a exibir uma coloração amarela. A capacidade da amostra em reduzir o radical é demonstrada pela percentagem de DPPH restante no meio (Tomei et al., 2005). O ensaio da capacidade quelante do ferro indica o potencial dos extratos em inibir a formação do complexo Ferrozina- Fe^{2+} . A formação deste complexo, apresenta uma cor rosa, cuja absorvância pode ser determinada a um comprimento de onda de 562nm. Quanto menor a absorvância, maior o potencial antioxidante. O método determina a quantidade restante de iões ferro não quelados na mistura de reação (Harb et al., 2016).

Assim, Ahmed et al. (2012); Coelho et al. (2011) e Neves et al. (2020), nos seus resultados, apresentam valores de TFT superiores aos extratos do presente estudo e, também, uma maior capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante, neste estudo, é apresentada através do IC_{50} , ou seja, a concentração de extrato mínima para que haja 50% de eliminação de radicais livres, no caso do

ensaio de DPPH, e a concentração de extrato mínima para que haja 50% de inibição do complexo Ferrozina-Fe²⁺, no ensaio de capacidade quelante do ferro (Stefanović et al., 2015).

Em ambos os ensaios, eliminação de radicais livres e capacidade quelante do ferro, verificou-se que todos os extratos apresentaram uma diferença significativa relativamente aos controlos positivos utilizados, quercetina e EDTA, respetivamente. Porém, era previsto valores superiores comparativamente ao controlo, visto que os extratos contêm vários compostos, que causam sinergia entre si e os controlos utilizados correspondem a um único composto. A sinergia entre os compostos fenólicos faz com a capacidade antioxidante dependa da concentração, da estrutura e da interação entre os compostos (Stefanović et al., 2015).

Ahmed et al. (2012); Coelho et al. (2011) e Neves et al. (2020), associam uma boa capacidade antioxidante a um maior TFT. No ensaio de DPPH realizado neste estudo, o menor valor de IC₅₀ (169,89± 9,00 µg/mL) observado para o extrato metanólico de *P. tridentatum*, não correspondeu ao maior valor de TFT (389,68±43,94 mgGAE/100g). Pelo contrário, no ensaio da ferrozina, o menor valor de IC₅₀ (77,01±3,58 µg/mL) observado para o extrato aquoso de *P. tridentatum*, correspondeu ao maior valor de TFT (615,28±21,28 mgGAE/100g). Stefanović et al., (2015) demonstraram que a capacidade de eliminação de radicais livres, está relacionada não só com o TFT, mas também com o teor de flavonóides e taninos. A presença do maior TFT não se reflete na obrigatoriedade de conter o maior teor de flavonóides e taninos. Stefanović et al., (2015) observaram para o extrato acetónico um TFT de 31,34±0,10 mgGAE/g e um teor de flavonóides totais de 231,75±1,23 mg equivalentes de rutina por grama de extrato (mg RUE/g); e para o extrato etanólico um TFT de 75,77±0,42 mgGAE/g e um teor de flavonóides totais de 110,07±0,58 mgRUE/g. Deste modo, os resultados deste estudo poderão corroborar que a capacidade de eliminação não está apenas correlacionada com o TFT mas também com outro tipo de compostos, como o teor de flavonóides totais, como é mencionado por Stefanović et al., (2015).

Segundo Kuete et al. (2010), extratos com boa capacidade antioxidante apresentam IC₅₀<50µg/mL, atividade moderada a um 50 < IC₅₀< 100µg/mL e baixa atividade a um IC₅₀>100µg/mL. Assim e comparando com o descrito pelos autores, todos os extratos neste trabalho apresentam uma baixa capacidade de eliminação de eliminação do radical DPPH; os extratos aquosos demonstram uma capacidade moderada na quelação do ferro; e os extratos metanólicos uma baixa capacidade quelante.

Ahmed et al. (2012) apresentam resultados para a capacidade quelante do ferro e obtiveram, para o extrato metanólico bruto de *M. indicus*, um IC₅₀ de 17,30µg/mL e para a subfração aquosa um IC₅₀ de 2,30µg/mL. Deste modo, os valores obtidos, no presente trabalho, para os extratos desta planta foram superiores ao mencionado. Esta diferença de resultados poderá ser justificada pelo método extrativo e os solventes utilizados serem diferentes; à fase vegetativa que a planta se encontrava no processo de colheita; e ao meio em cresceu (Gonçalves et al., 2018; Stefanović et al., 2015). Neste ensaio, os

extratos aquosos apresentaram, sem diferenças significativas entre eles, o menor IC₅₀ (77,01±3,58µg/mL para *P. tridentatum* e 83,15±6,36µg/mL para *M. indicus*) isto é, a melhor capacidade de inibir o complexo Ferrozina-Fe²⁺. Stefanović et al. (2015) correlacionam a capacidade redutora com o TFT e com o teor de taninos. Deste modo, um extrato com um elevado TFT e um baixo teor de taninos, não demonstraram uma boa capacidade redutora. Tal como no ensaio de eliminação de radicais livres, o maior TFT não reflete o maior teor de taninos. Stefanović et al. (2015) exibiram resultados em que um extrato demonstra um TFT de 31,34±0,10mgGAE/g e um teor de taninos de 29,68±0,83mgGAE/g, e um outro extrato com um TFT de 50,33±0,27mgGAE/g e um teor de taninos de 26,81±0,03mgGAE/g.

Desta forma, a diferença entre os extratos com melhor capacidade antioxidante e os extratos com maior capacidade quelante, poderá ser justificada, pelo facto dos ensaios estarem correlacionados a grupo de compostos diferentes e de os mesmos terem mecanismos diferentes de atuação (Stefanović et al., 2015).

3.3. Capacidade de Absorção de radiação Ultravioleta

Os protetores solares são utilizados com o intuito de proteger a pele das radiações UV e essa função é baseada na capacidade de absorver, refletir e espalhar a radiação. Para que o protetor seja eficaz, o produto tem que ter uma larga capacidade absorptiva entre os 290nm e os 400nm (More et al., 2013). Para tal, determinou-se a capacidade de absorção de radiação UV dos extratos e de um protetor solar existente comercialmente com FPS +50, controlo positivo, através do cálculo do coeficiente de absorção. Os resultados obtidos estão apresentados na (Tabela 5) e poderão indicar o desempenho dos extratos no ensaio de determinação do FPS.

Tabela 5 - Capacidade de Absorção de radiação UV

Comprimento de onda	<i>Pterospartum tridentatum</i>		<i>Melilotus indicus</i>		Controlo Positivo
	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	
200	0,80 ^a	1,17 ^b	1,02 ^c	0,86 ^d	0,95 ^c
250	SD	SD	SD	SD	SD
300	11,11 ^a	10,98 ^a	10,08 ^b	8,17 ^c	19,53 ^d
350	3,58 ^a	4,41 ^b	5,61 ^c	5,12 ^d	14,82 ^c
400	0,72 ^a	1,65 ^b	1,08 ^c	1,00 ^c	0,20 ^d
450	0,21 ^a	0,53 ^b	0,32 ^c	0,33 ^c	0,04 ^d

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada amostra.

SD: Sem Dados (não foi possível a leitura da absorvância neste comprimento de onda)

Os extratos em estudo demonstraram resultados de absorção de radiação UVA e UVB significativamente diferentes de controlo positivo. Contudo, o controlo positivo apresenta menor

coeficiente de absorção que os extratos a partir do comprimento de onda de 400nm. Estes resultados poderão ser justificados, visto que os protetores comerciais apresentam, geralmente, mais do que um filtro solar de modo a potencializar o FPS, como é o caso da benzofenona-3 e o octil metoxicinamato, e por vezes conjugam filtros químicos e filtros físicos, de modo a ampliar o espectro de proteção (Ribeiro, 2010; Ruszkiewicz et al., 2017). A benzofenona-3 é um filtro químico de amplo espectro UV, aprovada até uma concentração máxima de 6% nos Estados Unidos da América (EUA). No entanto, quando um protetor solar contém este composto a uma concentração de 4% e é aplicado durante cinco dias consecutivos, é detetado benzofenona-3 no sangue e na urina, podendo ainda, ser detetado no tecido adiposo aquando concentrações elevadas. O octil metoxicinamato é, também, um filtro UVB químico, aprovado como um ingrediente cosmético em concentrações de 7,5-10% nos EUA e na União Europeia (UE). Contudo, em concentrações de 10% é detetado no sangue e na urina. Por vezes, são utilizados concomitantemente filtros físicos, como o óxido de zinco e o dióxido de titânio, de forma a refletir a radiação UV. As nanopartículas de óxido de zinco para além de serem utilizadas como filtro solar, são também utilizadas como bronzeadores. A aplicação de um protetor com este tipo de filtro, durante cinco dias, demonstrou um pequeno aumento de iões zinco no sangue e na urina. No caso das nanopartículas de dióxido de titânio, estas podem ser utilizadas até uma concentração de 25%. Segundo a FDA, o dióxido de titânio é considerado um composto seguro. Porém, quando é reduzido a um tamanho nanométrico, as propriedades físico-químicas e a sua bioatividade são diferentes (Ruszkiewicz et al., 2017).

Dutra et al. (2004), determinaram o FPS de diferentes protetores solares comercializados e verificou-se que, de um modo geral, os protetores solares comercializados continham benzofenona-3, octil metoxicinamato e dióxido zinco, existindo ainda protetores solares, que utilizam mais do que estes três filtros solares em simultâneo, de modo a potencializar o FPS.

Além disso, o protetor comercial apresenta uma capacidade de absorção inferior a partir dos 400nm, uma vez que apenas são produzidos com o intuito de proteger contra a radiação UV e esta somente compreende os comprimentos de onda de 200nm até os 400nm, o que faz com que o comprimento de onda de 450nm esteja fora do espectro deste tipo de radiação (Amaro-Ortiz et al., 2014; Ribeiro, 2010).

Devido aos efeitos secundários que os filtros solares sintéticos podem apresentar, os estudos com extratos de plantas têm aumentado, tendo em conta a sua eficácia e a menos efeitos secundários associados. As plantas são, ademais, uma fonte variada de compostos, com potencial para a prevenção e tratamento de disfunções causadas pelo excesso de RS (More et al., 2013).

Puertas-Mejía et al. (2018), avaliaram a capacidade de absorção UV de extratos metanólicos de diferentes partes (frutos e folhas) de *Morella parvifolia* e concluíram que os extratos apresentavam

capacidade de fotoproteção, sendo que o valor de coeficiente de absorção mais elevado (4,0) verificou-se no extrato metanólico de folhas, a um comprimento de onda de 290nm.

Por sua vez, Priyanka et al. (2018) determinaram a capacidade de absorção UV e o FPS de extractos metanólicos e aquosos de *Datura metel*, *Loranthus longiflorus* e *Eucalyptus* sp. tendo observado que os extratos com uma boa capacidade de absorção UV, exibindo máxima absorção nos comprimentos de onda de 200nm e 250nm, sendo que o extrato aquoso de *L. longiflorus* demonstrou o maior coeficiente de absorção (10).

Os resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro ao que é referenciado por Puertas-Mejía et al. (2018) e Priyanka et al. (2018). Os extratos apresentam, igualmente, uma boa capacidade de absorção de radiação UV entre os 200nm e os 450nm, sendo que apresentaram a maior capacidade absorptiva no comprimento de onda de 300nm, salientando-se o extrato metanólico e o extrato aquoso de *P. tridentatum* (11,11 e 10,98), respetivamente. Tendo em conta os estudos de Cefali et al. (2019) e Priyanka et al. (2018), que indicam que o teor de flavonóides totais está associado a uma boa capacidade antioxidante e a uma boa capacidade absorptiva de radiação UV, podemos dizer que este trabalho vai de encontro aos referidos autores, face à presença destes compostos nos extratos estudados.

3.4. Determinação do Fator de Proteção Solar

A determinação do FPS permite avaliar a eficácia de um protetor solar contra a radiação UV, indicando quantas vezes o tempo de exposição ao sol pode ser aumentado com a utilização do protetor solar, sem o risco de causar eritema (Ribeiro, 2010).

O FPS foi calculado segundo a equação de Mansur após a leitura da absorvância dos extratos, a diferentes concentrações, entre os 290nm e os 320nm, com um intervalo de 5nm entre cada leitura (Priyanka et al., 2018). Os resultados obtidos nas amostras em estudo estão apresentados na (Tabela 6).

Tabela 6 - Fator de Proteção Solar

<i>Pterospartum tridentatum</i>		<i>Melilotus indicus</i>		Controlo Positivo
Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	Ext. Metanólico	Ext. Aquoso	
30,80 ± 2,18 ^a	20,15 ± 3,17 ^b	22,59 ± 2,83 ^b	15,03 ± 1,80 ^c	332,32 ± 33,82 ^d

As médias com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada amostra.

Todos os extratos apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo positivo. Isto poderá ter acontecido, uma vez que o controlo positivo é um protetor solar existente comercialmente, e por isso conter mais do que um filtro solar em simultâneo, de modo a potencializar o FPS. Além disso,

a determinação da absorção máxima em extratos vegetais é mais difícil, por serem uma mistura complexa de moléculas mais ou menos ativas (Violante et al., 2009).

Os extratos aferiram valores de FPS entre os 15 e os 30, com diferenças significativas entre eles (à exceção do extrato aquoso de *P. tridentatum* e do extrato metanólico de *M. indicus*). O extrato aquoso de *M. indicus* demonstrou o resultado mais baixo ($15,03 \pm 1,08$) e o extrato metanólico de *P. tridentatum* o valor mais elevado ($30,80 \pm 2,18$). De acordo com Mapoung et al. (2020), extratos de plantas com FPS 15 ou superior, oferecem proteção contra a radiação UV. Assim, todos os extratos apresentam bons resultados quanto ao potencial fotoprotetor e poderão ser utilizados para esse efeito. Extratos de plantas também podem ser associados com filtros sintéticos de modo a potencializar o FPS, já que estão associados a menos efeitos adversos (Saewan & Jimtaisong, 2015; Violante et al., 2009).

Priyanka et al. (2018) mencionam que extratos com maior teor de flavonóides e compostos fenólicos demonstram um maior FPS, o que poderá justificar estes resultados. Do mesmo modo, dado que os resultados do ensaio da capacidade de eliminação de radicais livres também se correlacionam com os mesmos grupos de compostos, e dado que os valores em ambos os ensaios são concordantes, corrobora com o que é referido pelos autores Priyanka et al. (2018).

Porém, os ensaios realizados ao longo deste estudo apresentam limitações. Os ensaios de avaliação da capacidade antioxidante utilizados correspondem a métodos indiretos, isto é, ensaios mediados pela transferência de eletrões. Assim sendo, poderá não ser direta a transposição para informação quantitativa. Outra limitação deste tipo de métodos é a sua baixa reprodutibilidade, já que os resultados são dependentes da concentração de reagentes e do tempo de incubação. Quanto ao ensaio de determinação do TFT, é utilizado frequentemente para aferir a capacidade antioxidante de extrato. Contudo, essa relação pode não estar refletida no TFT (Tomei et al., 2005). Nos ensaios para a determinação da capacidade absorptiva da radiação UV e para a determinação do FPS, a principal desvantagem da utilização destes métodos em extratos de plantas é a dificuldade em aferir a capacidade de absorção máxima e o FPS máximo, uma vez que são uma mistura complexa de compostos (Violante et al., 2009). Quando se pretende aplicar estes métodos a produtos comercializados, são apresentadas limitações na determinação do FPS, como por exemplo, o uso de diferentes solventes em que os filtros solares são dissolvidos, o tipo de emulsão, a concentração e combinação do protetor. Excipientes ou filtros solares físicos também podem interferir, visto que, também podem produzir bandas de absorção de radiação UV interferindo com as do protetor. Isto pode ocorrer quando as formulações dos protetores têm presente compostos como dióxido de titânio ou óxido de zinco, filtros solares físicos. Neste caso, os resultados obtidos na determinação do FPS por este método, não correspondem ao FPS real (Dutra et al., 2004; Santos et al., 1999).

4. Conclusão

Neste estudo, foram identificados os grupos de compostos presentes em extratos de *P. tridentatum* e *M. indicus*, assim como determinado o teor de compostos fenólicos, a capacidade antioxidante, a capacidade de absorção UV e o fator de proteção solar das mesmas.

Ambas as plantas demonstraram a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, diterpenóides e alcalóides. Além destes grupos de compostos, foi identificada a presença de terpenóides e triterpenóides em *M. indicus*.

Ambas as plantas apresentam um baixo TFT face a outros estudos. Em relação à atividade antioxidante, mais especificamente relacionada com capacidade radicalar (ensaio DPPH), os extratos apresentam uma capacidade baixa, uma vez que têm um IC_{50} superior a 100 $\mu\text{g/mL}$. No que diz respeito à capacidade quelante de ferro, os extratos metanólicos também apresentam uma atividade baixa, enquanto os aquosos possuem uma ação moderada ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). A atividade antioxidante destes extratos poderá estar relacionada, tal como corroborado pela literatura, não apenas com TFT, mas também com a presença de diversos compostos, como flavonóides e taninos.

Todos os extratos das plantas demonstram uma forte capacidade de absorção UV e de proteção solar, podendo assim ser utilizados para esse efeito ou serem conjugados com filtros sintéticos de modo a potencializar o FPS. Do mesmo modo que com a atividade antioxidante, a capacidade de absorção UV e o FPS poderão estar correlacionados não só ao TFT, mas também à presença de diversos compostos, entre estes os flavonóides, presentes nos extratos.

Como perspetivas futuras, refere-se a necessidade de identificação dos compostos presentes nos extratos das plantas estudadas, por exemplo recorrendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o que permite correlacionar melhor as propriedades biológicas da planta com os compostos que dela fazem parte. Poder-se-iam, também, realizar ensaios para determinação de toxicidade cutânea, em linhagens celulares de, por exemplo, queratinócitos e fibroblastos e de permeabilidade da pele *in vitro* com o intuito de utilizar estes extratos em cosméticos ou como aditivos em protetores solares.

Portugal apresenta uma flora diversificada, onde as plantas representam uma importante fonte de compostos com atividade biológica e que poderão ser aplicados em várias áreas da saúde. No entanto, os estudos com espécies vegetativas de origem portuguesa são escassos. Como tal, este estudo poderá abrir portas nesse sentido, além de que aumenta o conhecimento sobre as duas plantas existentes em território nacional.

Referências Bibliográficas

- Abd El-Hafeez, A. A., Khalifa, H. O., Elgawish, R. A., Shouman, S. A., Abd El-Twab, M. H., & Kawamoto, S. (2018). Melilotus indicus extract induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving mitochondria-mediated pathways. *Cytotechnology*, *70*(2), 831–842. doi:10.1007/s10616-018-0195-7
- Ahmed, D., Baig, H., & Zara, S. (2012). Seasonal variation of phenolics, flavonoids, antioxidant and lipid peroxidation inhibitory activity of methanolic extract of Melilotus indicus and its sub-fractions in different solvents. *International Journal of Phytomedicine*, *4*(3), 326–332.
- Ahn, J. H., Jo, Y. H., Kim, S. B., Turk, A., Oh, K.-E., Hwang, B. Y., Lee, k. Y., Lee, M. K. (2018). Identification of antioxidant constituents of the aerial part of Plantago asiatica using LC–MS/MS coupled DPPH assay. *Phytochemistry Letters*, *26*, 20–24. doi:10.1016/j.phytol.2018.05.006
- Aires, A., Marrinhas, E., Carvalho, R., Dias, C., & Saavedra, M. J. (2016). *Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extracts of Pterospartum tridentatum and Mentha pulegium against Staphylococcus aureus Isolates*. doi: 10.1155/2016/5201879
- Alves, L., Aegerter, M., & Hata, K. (2009). Determinação in vitro do fator de proteção solar (FPS) de moderadores solares. *In Vitro*, (January).
- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D’Orazio, J. (2014). Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, *19*(5), 6202–6219. doi:10.3390/molecules19056202
- Ao, J., Yuan, T., Gao, L., Yu, X., Zhao, X., Tian, Y., Ding, W., Ma, Y., Shen, Z. (2018). Organic UV filters exposure induces the production of inflammatory cytokines in human macrophages. *Science of The Total Environment*, *635*, 926–935. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.217
- Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo - Agressão solar da pele., from website: <http://www.apcancrocuteano.pt/index.php/saiba-mais/artigos-de-opinioao/28-agressao-solar-da-pele-por-osvaldo-correia> acedido a 15 de Abril de 2020
- Aziz, M. A. (2015). Qualitative phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of Microcos paniculata barks and fruits. *Journal of Integrative Medicine*, *13*(3), 173–184. doi:10.1016/S2095-4964(15)60179-0
- Canabady-Rochelle, L. L. S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., & Girardet, J.-M. (2015). Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*, *183*, 129–135. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.147
- Carvalho, R. A. (2012), Lesões Benignas e Pré-Malignas. from *Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo* website: <http://www.apcancrocuteano.pt/index.php/saiba-mais/textos-cientificos> acedido a 15 de Abril de 2020

- Cefali, L. C., Ataíde, J. A., Fernandes, A. R., Sanchez-Lopez, E., Sousa, I. M. O., Figueiredo, M. C., Ruiz, A. L. T. G., Foglio, M. A., Mazzola, P. G., Souto, E. B. (2019). 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*, *8*(11), 1–13. doi:10.3390/plants8110453
- Cheyrier, V. (2012, June 30). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, Vol. 11, pp. 153–177. doi:10.1007/s11101-012-9242-8
- Coelho, M. T., Gonçalves, J. C., Alves, V., & Martins, M. M.-. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, *1*, 1454–1458. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.215
- Corrêa, M. A. (2012). *COSMETOLOGIA Ciência e Técnica* (1ª; L. e E. MEDFARMA, Ed.). São Paulo.
- Cunha, D. (2012). As regras do ABCDE. from *Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo* website: <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=http://www.apcancrocutaneo.pt/images/textoscientificos/AsregrasdoABCDEporDanielaCunha.pdf> acessado a 15 de Abril de 2020
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12222–12248. doi:10.3390/ijms140612222
- Del Ré, P. V., & Jorge, N. (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: Aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Vol. 14, pp. 389–399. doi:10.1590/S1516-05722012000200021
- Dutra, E. A., Da Costa E Oliveira, D. A. G., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Miritello Santoro, M. I. R. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *40*(3), 381–385. doi:10.1590/S1516-93322004000300014
- Felton, S. J., Cooke, M. S., Kift, R., Berry, J. L., Webb, A. R., Lam, P. M. W., Gruijl, F. R., Vail, R., Rhodes, L. E. (2016). Concurrent beneficial (vitamin D production) and hazardous (cutaneous DNA damage) impact of repeated low-level summer sunlight exposures. *British Journal of Dermatology*, *175*(6), 1320–1328. doi:10.1111/bjd.14863
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1370–1373. doi:10.1021/jf048396b
- Gonçalves, J. C., Coelho, M. T., Diogo, M. da G., Alves, V. D., Bronze, M. R., Coimbra, M. A., Martins, V. M., Moldão-Martins, M. (2018). In vitro shoot cultures of *pterospartum tridentatum* as an alternative to wild plants as a source of bioactive compounds. *Natural Product Communications*, *13*(4), 439–442. doi:10.1177/1934578x1801300415
- Grosso, A. C., Costa, M. M., Ganço, L., Pereira, A. L., Teixeira, G., Lavado, J. M. G., Figueiredo, A. C., Barroso,

- J. G., Pedro, L. G. (2007). Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*, 102(4), 1083–1088. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.049
- Gustavson, K. H. (1949). Some Protein-Chemical Aspects of Tanning Processes. *Advances in Protein Chemistry*, 5(C), 353–421. doi:10.1016/S0065-3233(08)60589-6
- Harb, T. B., Torres, P. B., Pires, J. S., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2016). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. *Instituto de Biociências Da Universidade de São Paulo*, (April 2018), 2–6.
- Hoerter, J. D., Bradley, P., Casillas, A., Chambers, D., Weiswasser, B., Clements, L., Gilbert, S., Jiao, A. (2012). Does Melanoma Begin in a Melanocyte Stem Cell? *Journal of Skin Cancer*, 2012, 1–9. doi:10.1155/2012/571087
- Joshi, A., Bhoje, M., & Sattarkar, A. (2013). Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcosm* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(7), 80–87.
- Kuete, V., Efferth, T., & Gunatilaka, L. (2010). Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Article*, 1(1). doi:10.3389/fphar.2010.00123
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 101(5), 1466–1472. doi:10.5740/jaoacint.18-0031
- Kushwaha, U. (2019). Evaluation of qualitative phytochemical analysis of water extract of *Achyranthes aspera* and *Achyranthes aspera* 30. *Indian Journal of Research in Homoeopathy*, 13(1), 37. doi:10.4103/ijrh.ijrh_30_18
- Kwon, M., Ko, S. K., Jang, M., Kim, G. H., Ryoo, I. J., Son, S., Ryu, H. W., Oh, S., Lee, w., Kim, B. Y., Jang, J., Ahn, J. S. (2019). Inhibitory effects of flavonoids isolated from *Sophora flavescens* on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1481–1488. doi:10.1080/14756366.2019.1640218
- Lo, J. A., & Fisher, D. E. (2014, November 21). The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*, Vol. 346, pp. 945–949. doi:10.1126/science.1253735
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (pp. 233–266). doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1
- Mapoung, S., Arjsri, P., Thippraphan, P., Semmarath, W., Yodkeeree, S., Chiewchanvit, S., Piyamongkol, W., Limtrakul, P. (2020). Photochemoprotective effects of *Spirulina platensis* extract against UVB irradiated human skin fibroblasts. *South African Journal of Botany*, 130, 198–207. doi:10.1016/j.sajb.2020.01.001
- More, B. H., Sakharwade, S. N., Tembhurne, S. V., & Sakarkar, D. M. (2013). Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application.

International Journal of Research in Cosmetic Science, 3(1), 1–6.

- National Cancer Institute. (2018). Melanoma of the Skin – Cancer Stat Facts. *National Cancer Institute*, 21–22. from website: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> acedido a 2 de Maio de 2020
- Neves, M., Miranda, A., Lemos, M. F. L., Silva, S., & Tecelão, C. (2020). Enhancing oxidative stability of sunflower oil by supplementation with prickled broom (*Pterospartum tridentatum*) ethanolic extract. *Journal of Food Science*, 85(9), 2812–2821. doi:10.1111/1750-3841.15378
- Nunes, A. R., Vieira, Í. G. P., Queiroz, D. B., Leal, A. L. A. B., Maia Morais, S., Muniz, D. F., Calixto-Junior, J. T., Coutinho, H. D. M. (2018). Use of Flavonoids and Cinnamates, the Main Photoprotectors with Natural Origin. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 1–9. doi:10.1155/2018/5341487
- Oliveira, F. G. da S., de LIMA-SARAIVA, S. R. G., de MÉLO, B. C. A., Silva, R. A., Dos Santos, M. A. B., Félix, W. P., & Almeida, J. R. G. da S. (2019). Phytochemical screening, sun protection factor (Spf) and sugar analysis of jatobá fruits (*hymenaea martiana hayne*): A native medicinal plant from the san francisco valley. *Food Science and Technology*, 39, 551–555. doi:10.1590/fst.18718
- Pasdaran, A., & Hamedí, A. (2017). Natural Products as Source of New Antimicrobial Compounds for Skin Infections. In *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* (pp. 223–253). doi:10.1016/b978-0-12-811079-9.00014-8
- Priyanka, S., Mary, I. R. S., Nandini, HS., Kutty A.V.M., Kiranmayee, P. (2018). A PILOT STUDY ON SUN PROTECTION FACTOR OF PLANT EXTRACTS: AN OBSERVATIONAL STUDY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(4), 67. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i4.23671
- Puertas-Mejía, M. A., Gutierrez-Villegas, M. I., Mejía-Giraldo, J. C., Winkler, R., & Rojano, B. (2018). In vitro UV absorption properties and radical scavenging capacity of *Morella parvifolia* (Benth.) Parra-Os. extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(3). doi:10.1590/s2175-97902018000317498
- Ribeiro, C. (2010). *Cosmetologia Aplicada a Dermoestética* (2ª; P. Muñoz, Ed.). São Paulo: Pharmabooks Editora.
- Ríos, J. L. (2010, March). Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 128, pp. 1–14. doi:10.1016/j.jep.2009.12.045
- Rodrigues, I. M. C., Souza Filho, A. P. S., & Ferreira, F. A. (2009). Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*, 27(3), 507–513. doi:10.1590/s0100-83582009000300011
- Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62, 684–693. doi:10.1016/j.foodres.2014.04.036

- Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., & Aschner, M. (2017). Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports*, Vol. 4, pp. 245–259. doi:10.1016/j.toxrep.2017.05.006
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 47–63. doi: 10.1111/jocd.12123
- Saleem, M., Asif, M., Parveen, A., Yaseen, H. S., Saadullah, M., Bashir, A., Asif, J., Arif, M., Khan, I. U., Khan, R. U. (2020). Investigation of in vivo anti-inflammatory and anti-angiogenic attributes of coumarin-rich ethanolic extract of *Melilotus indicus*. *Inflammopharmacology*. doi:10.1007/s10787-020-00703-9
- Santos, E. P., Freitas, Z. M., Souza, K. R., Garcia, S., & Vergnanini, A. (1999). In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octyl methoxycinnamate. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(1), 1–5. doi:10.1046/j.1467-2494.1999.181658.x
- Schalka, S., & dos Reis, V. M. S. (2011, May). Fator de proteção solar: Significado e controvérsia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol. 86, pp. 507–515. doi:10.1590/S0365-05962011000300013
- Schuch, A. P., Moreno, N. C., Schuch, N. J., Menck, C. F. M., & Garcia, C. C. M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 110–124. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029
- Schwalfenberg, G. K. (2012). Solar radiation and vitamin D: Mitigating environmental factors in autoimmune disease. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. doi:10.1155/2012/619381
- Secco, G. G., Beltrame, B. M., & Schwanz, M. (2019). Avaliação in vitro do fator de proteção solar (FPS) de cosméticos fotoprotetores manipulados. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, 30(4), 242. doi:10.14450/2318-9312.v30.e4.a2018.pp242-249
- Sociedade Portuguesa de Botânica. (2012a). *Melilotus indicus* | Flora-On. from *Flora-On* website: <https://flora-on.pt/index.php#/hkkYO> acessado a 2 de Maio de 2020
- Sociedade Portuguesa de Botânica. (2012b). *Pterospartum tridentatum* | Flora-On. from *Flora-On* website: <https://flora-on.pt/index.php#/hooW9> acessado a 2 de Maio de 2020
- Soltani, J. (2016). Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications* (pp. 275–292). doi:10.1016/B978-0-444-63505-1.00035-X
- Stefanović, O. D., Tešić, J. D., & Čomić, L. R. (2015). *Melilotus albus* and *Dorycnium herbaceum* extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potentials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 417–424. doi:10.1016/j.jfda.2015.01.003
- Steinbrecht, W., Hegglin, M. I., Harris, N., & Weber, M. (2018). Is global ozone recovering? *Comptes Rendus Geoscience*, 350(7), 368–375. doi:10.1016/j.crte.2018.07.012

- Tomei, R R; Salvador, M. J. (2005). Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica*, 1963–1967.
- Vilarta, C. F., Unger, M. D., Dos Reis, L. M., Wagner, I., Dominguez, V., David-Neto, E., Moysés, R. M., Titan, S., Custodio, M. R., Hernandez, M. J., Jorgetti, V. (2017). Hypovitaminosis D in patients undergoing kidney transplant: the importance of sunlight exposure. *Clinics*, 72(7), 415–421. doi:10.6061/clinics/2017(07)05
- Violante, I. M. P., Souza, I. M., Venturini, C. L., Ramalho, A. F. S., Santos, R. A. N., & Ferrari, M. (2009). In vitro sunscreen activity evaluation of plants extracts from Mato Grosso cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(2 A), 452–457. doi:10.1590/S0102-695X2009000300020
- Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A., & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 363–370. doi:10.1016/j.jep.2004.04.003
- WHO. (2017). WHO | Skin cancers. Retrieved May 2, 2020, from <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
- Xiao, X., Huang, M., Fan, C., & Zuo, F. (2018). Research on the senescence of human skin fibroblasts induced by ultraviolet b and its mechanism. *Biomedical Research (India)*, 29(2), 313–316. doi:10.4066/biomedicalresearch.29-17-3130
- Xie, M., Hu, B., Wang, Y., & Zeng, X. (2014). Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities and Alters Rheological Properties of the Copolymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(37), 9128–9136. doi:10.1021/jf503207s
- Yadav, R., Khare, R. K., & Singhal, A. (2017). Qualitative Phytochemical Screening of Some Selected Medicinal Plants of Shivpuri District. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res*, 3(1), 844–847. doi:10.21276/ijlssr.2017.3.1.16