

Karollina Chaves Ferreira<sup>1</sup>  
Laura Morais de Oliveira<sup>1</sup>  
Priscila de Lima Paula<sup>1</sup>  
Rodrigo Luiz Fabri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil.

## RESUMO

**Introdução:** A exposição solar excessiva pode ocasionar lesões cutâneas, principalmente devido à presença dos raios ultravioletas (UVs). A incidência de lesões na pele pode ser reduzida através do uso de filtro solares. Nos últimos anos, têm-se notado diversos estudos que investigam o potencial antioxidante e fotoprotetor de espécies vegetais.

**Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor in vitro das partições hexânica (PHC), diclorometânica (PDC), acetato de etila (PAC) e hidroalcoólica (PAGC) do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (Rubiaceae). **Material e Métodos:** O extrato metanólico de *M. frigidus* (MFM) foi submetido a uma partição líquido-líquido a partir dos solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, restando ao final do processo à partição hidroalcoólica. Posteriormente, avaliou-se o doseamento de flavonoides totais e a capacidade antioxidante e fotoprotetora das partições, a partir dos ensaios de DPPH: método de sequestro de radical livre, método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio, ensaio do sistema  $\alpha$ -caroteno/ácido linoleico; determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) e dos espectros de absorção UVA, UVB e UVC. **Resultados:** A partição PAC foi a mais promissora quanto às atividades antioxidante (IC<sub>50</sub> 2,15 ± 0,20 µg/mL; %AAR 312 ± 25,59 e 120 ± 9,85 equivalentes a quercetina e rutina, respectivamente e %I 70,31 ± 0,48) e fotoprotetora (FPS 12,11 ± 0,02) e, isso possivelmente se deve ao maior teor de flavonoides encontrados na amostra (336,91 ± 1,89 mg/g). **Conclusão:** A busca por produtos naturais com atividade biológica têm-se tornado tendência mundial. Diante disso, é possível afirmar que a PAC pode atuar como coadjuvante em filtros solares.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Antioxidantes; Raios Ultravioleta; Flavonoides.

## ABSTRACT

**Introduction:** The excessive exposure to solar light can cause skin lesions, mainly due to ultraviolet (UVs) rays. The incidence of skin lesions may be reduced by the use of sunscreens. In the last years, several researches were reported based on the investigation of the antioxidant and photoprotective potential of different plant species. **Objective:** The study aimed to evaluate in vitro antioxidant and photoprotective potential of hexane partition (PHC), dichloromethane partition (PDC), ethyl acetate partition (PAC) and hydroalcoholic partition (PAGC) of methanolic extract from *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (Rubiaceae) aerial parts. **Material and Methods:** The methanolic extract of *M. frigidus* (MFM) was submitted to a liquid-liquid partition from the solvents hexane, dichloromethane, and ethyl acetate, remaining a hydroalcoholic partition at the end of the process. Then, the total flavonoid content was dosed and the antioxidant and photoprotective capacity of the partitions were evaluated based on DPPH test: free radical scavenging method, method of reducing the phosphomolybdenum complex, assay of the  $\alpha$ -carotene/linoleic acid system; determination of the Sun Protection Factor (SPF) and the UVA, UVB and UVC absorption spectra. **Results:** Only the ACP was promising for antioxidant (IC<sub>50</sub> 2.15 ± 0.20 µg/mL; %RAA 312 ± 25.59 e 120 ± 9.85 compared to rutin and quercetin, respectively, and %I 70.31 ± 0.48) and photoprotective (SPF 12.11 ± 0.02) activities, it might be due to the great content of flavonoid compounds found in the sample (336.91 ± 1.89 mg/g). **Conclusion:** The search for natural products with biological activity has become a worldwide trend. Therefore, it is possible to affirm that the ACP can act as an adjuvant in sunscreens.

Key-words: Medicinal Plants; Antioxidants; Ultraviolet Rays; Flavonoids.

✉ **Rodrigo Luiz Fabri**

R. José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro,  
Juiz de Fora, Minas Gerais  
CEP: 36036-900  
✉ rodrigo.fabri@ufjf.edu.br

Submetido: 04/11/2020

Aceito: 22/04/2021



## INTRODUÇÃO

O sol é essencial ao ser humano, pois é responsável pela ativação da produção endógena de vitamina D, produção de melanina com consequente bronzeamento da pele, além de oferecer sensação de bem estar físico. Contudo, a exposição excessiva à radiação solar pode ocasionar diversas doenças de pele, como o câncer e o fotoenvelhecimento precoce.<sup>1,2</sup> Os raios ultravioletas (UVs) emitidos pelo sol são os responsáveis por causar a maioria das alterações fotocutanêneas.<sup>3</sup> Os danos causados à pele ocorrem devido à formação de radicais livres, como consequência da interação entre a radiação UV e espécies reativas de oxigênio (EROs).

A radiação UV pode ser dividida em três partes, de acordo com a região do espectro de ondas em que se encontra. A primeira delas é a UVA (400-320 nm), que apresenta quase totalidade dos raios UV, sendo responsável pela indução da pigmentação da pele por meio do escurecimento da melanina, podendo induzir o câncer de pele (carcinoma de células basais e escamosas e melanoma maligno) e a formação de radicais livres. Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos de câncer de pele não melanoma são superiores aos de câncer de próstata e também de câncer de mama. Portanto, o câncer de pele não melanoma é o mais incidente, sendo assim, um problema de saúde pública, e é de extrema importância a conscientização da população em relação à prevenção e cuidados.<sup>4</sup>

Em seguida, encontra-se a UVB (320-280 nm), que causa o envelhecimento precoce das células, podendo lesionar o DNA e suprimir a resposta imunológica da pele, além de ocasionar queimaduras solares (radiação eritematógena). A radiação UVA (90-95%) incide mais fortemente que a UVB (5-10%) sobre a superfície terrestre. Sendo a UVB mais nociva de ambas as radiações por apresentar uma maior frequência e um menor comprimento de onda, assim, consequentemente libera mais energia na superfície terrestre.<sup>4</sup> Por último, a UVC (280-100 nm), que por possuir energias elevadas torna-se extremamente lesiva aos seres vivos, mas na estratosfera é absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio, assim quase nenhuma radiação UVC chega à superfície da Terra.<sup>2</sup>

Os filtros solares são substâncias químicas com propriedades de absorver, refletir e dispersar a radiação que incide sobre a pele.<sup>5</sup> Segundo Godinho et al<sup>6</sup>, o uso de filtros solares tem-se tornado hábito crescente nas últimas décadas e alguns itens são requeridos nas formulações atuais, como não possuir potencial alergênico, adição de antioxidantes e oferecer um efeito estético aceitável. Os consumidores buscam por produtos que lhes proporcionem qualidade, eficácia e segurança, além de serem sustentáveis e de origem natural. Dessa forma, uma das tendências promissoras do mercado é

a aplicação de matérias-primas de origem vegetal em cosméticos,<sup>7</sup> uma vez que, comprovada sua eficácia, podem potencializar a fotoproteção da formulação.

A espécie *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. pertence à família Rubiaceae, distribuída na América Tropical e Antilhas, sendo encontrada no Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul.<sup>8-10</sup> O estudo do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFM) realizado por Fabri et al<sup>11</sup>, relatou que a espécie apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório. Além disso, Cunha também demonstrou que a espécie possui potencial terapêutico promissor para a atividade antioxidante e fotoprotetora,<sup>12</sup> podendo ser uma alternativa para produção como coadjuvantes em filtros solares. Os resultados apresentaram uma correlação positiva dos constituintes fenólicos e flavonoides com a atividade antioxidante da planta. De antemão, a espécie pode ser uma alternativa para a produção de filtros solares.

Dessa forma, este estudo tem por objetivo avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor das partições do extrato metanólico de *M. frigidus*, visando selecionar a melhor partição para uma futura formulação farmacêutica fotoprotetora.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material vegetal

As partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (Rubiaceae) foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em maio de 2011, nas coordenadas geográficas -43.38223, -21.78073. A excisada foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ 46076) da Universidade Federal de Juiz de Fora e de acordo com o número de licença A032F41-23 SISGEN/BRASIL.

### Preparo do extrato metanólico e participações de *Mitracarpus frigidus*

As partes aéreas de *M. frigidus* desidratadas e pulverizadas (1,0 kg) foram maceradas estaticamente em metanol, à temperatura ambiente, até completa exaustão. Em seguida, todas as soluções filtradas foram concentradas à pressão reduzida em um evaporador rotatório a 45°C, produzindo 150 g de extrato bruto de *M. frigidus* em metanol (MFM), mantido sob refrigeração a 4°C para a realização dos ensaios. O rendimento final da extração foi de 15%.

A partir de 10 g de MFM suspenso em 200 mL de metanol:água (1:1) procedeu-se à partição líquido-líquido com 60 mL de solventes orgânicos de polaridade crescente, como hexano (PHC), diclorometano (PDC) e acetato de etila (PAC), restando, ao final do processo, a partição hidroalcoólica (PAGC), repetindo esse processo três vezes. Em seguida, as partições PHC, PDC e PAC

foram concentradas em evaporador rotatório, nas temperaturas 40°C, 43°C e 50°C, respectivamente. Apenas a PAGC, que continha água em solução, foi liofilizada para preservar suas características ao longo dos testes. As amostras foram mantidas sob refrigeração (PHC, PDC e PAC a 4°C e PAGC a 20°C). O rendimento total do particionamento foi de aproximadamente 80%.

### Preparo do extrato metanólico de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa)

A *M. ilicifolia* Mart. ex Reissek (Florien Fitoativos LTDA – Lote: 18J23 – FL06 – 004187) foi utilizada com finalidade comparativa às atividades antioxidantes da *M. frigidus*, uma vez que, segundo dados reportados na literatura, trata-se de uma planta medicinal utilizada popularmente com elevada atividade antioxidante.<sup>13-15</sup>

As folhas de *M. ilicifolia* desidratadas e pulverizadas (21,84 g) foram maceradas estaticamente em 140 mL de metanol à temperatura ambiente, até a completa exaustão. As soluções filtradas foram concentradas em um evaporador rotatório a 45°C, produzindo 6,81 g de extrato bruto de *M. ilicifolia*, mantido sob refrigeração a 4°C para a realização dos ensaios. O rendimento da extração foi de aproximadamente 31,18%.

### Doseamento de flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonoides foi realizada a partir do método descrito por Miliuskas et al<sup>16</sup>, com pequenas modificações, e consiste no ensaio reativo com cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), a fim de se observar uma solução de coloração amarela, positiva para a formação do complexo flavonoide-Al<sup>3+</sup>.

Preparou-se uma solução amostra de 1 mg/mL em metanol de cada partição e, em seguida, transferiu-se, para tubos de ensaio, 200 µL dessa solução, 200 µL de solução de AlCl<sub>3</sub> a 2% e 4600 µL de metanol. O branco da amostra foi preparado a partir de 200 µL de amostra e 4800 µL de metanol. Para o branco do experimento, adicionou-se 200 µL de solução de AlCl<sub>3</sub> e 4800 µL de metanol. O volume de metanol equivale a q.s.p. 5 mL.

Após 40 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, prosseguiu-se o ensaio em microplaca de 96 poços, na qual foi adicionado 250 µL da reação amostra, 250 µL do branco da amostra e 250 µL do branco do experimento e, em seguida, registrou-se as absorbâncias em leitor de ELISA a 415 nm. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em mg/g das partições, em equivalentes de rutina, a partir da curva de calibração da rutina (R<sup>2</sup>= 0,9995). Os dados são apresentados como média e erro padrão médio (média ± e.p.m).

### DPPH: métodos de sequestro de radical livre para determinação da atividade antioxidante

O método de sequestro de radical livre foi realizado a partir do ensaio descrito por Blois,<sup>17</sup> que consiste na redução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) à hidrazina (DPPH-H) ao entrar em contato com uma substância doadora de prótons, promovendo uma mudança de coloração de roxo para amarelo.

Preparou-se uma solução padrão de 1 mg/mL em metanol de cada partição. Prosseguiu o ensaio em microplaca de 96 poços, na qual, adicionou-se 100 µL da amostra em quatro poços na primeira coluna vertical e, em seguida realizou-se nove microdiluições sucessivas com 50 µL de metanol, obtendo-se dez concentrações das partições, de 250 a 0,49 µg/mL. Logo após, adicionou-se a cada um dos poços 150 µL de solução de DPPH 20 µg/mL, exceto na quarta fileira que representa o branco das amostras, substituído por 150 µL de metanol. A absorbância do DPPH foi determinada em triplicata com 50 µL de metanol e 150 µL de solução de DPPH. O experimento foi realizado em triplicata.

Após 30 minutos de incubação, ao abrigo de luz em temperatura ambiente, os valores de absorbância foram mensurados a 517 nm em leitor de ELISA. Os controles positivos *M. ilicifolia*, rutina e quercetina foram testados nas mesmas condições das amostras. Os resultados foram expressos em média e erro padrão médio (média ± e.p.m) referente ao CI<sub>50</sub> (concentração inibitória média).

### Método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio para a determinação da capacidade antioxidante total

O método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio proposto por Prieto et al<sup>18</sup>, consiste na redução do ácido molibdofosfórico por substâncias antioxidantes, resultando no complexo de fosfomolibdênio, o que pode ser observado pela mudança de coloração amarela para verde/azul.

Preparou-se o complexo fosfomolibdênico (reagente teste) a partir da reação entre a solução de fosfato de sódio (28 mL de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1 mol/L), a solução de molibdato de amônio [12 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O a 0,03 mol/L] e a solução de ácido sulfúrico (20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3 mol/L) em meio aquoso, nesta ordem. O volume final foi ajustado com água destilada para 100 mL em um balão volumétrico. Em seguida, as partições foram solubilizadas em metanol:água (1:1), obtendo-se a concentração de 200 µg/mL.

Posteriormente, adicionou-se aos tubos de ensaio, 2 mL do reagente teste e 300 µL da amostra cada. Para o branco do experimento, adicionou-se 2 mL do reagente teste e 300 µL de solvente metanol:água (1:1). E para o branco da amostra adicionou-se 2 mL de água destilada e 300 µL de amostra. O experimento foi realizado em triplicata.

Os tubos foram fechados com papel alumínio e levados em banho-maria a 95°C por 90 minutos.

Após o resfriamento em banho de gelo, pipetou-se, em uma microplaca de 96 poços, 200 µL de cada tubo e mensurou a absorbância em leitor de ELISA a 695 nm. Os controles positivos ácido ascórbico, quercetina, rutina e *M. ilicifolia*, foram testados nas mesmas condições das amostras.

Os resultados foram expressos em média e erro padrão médio (média ± e.p.m) da porcentagem de atividade antioxidante relativa (%AAR) em relação ao ácido ascórbico, quercetina e rutina (atividade antioxidante considerada como 100%).

### Ensaio do sistema -caroteno/ácido linoleico para a determinação da atividade antioxidante

O método fundamenta-se na medida espectrofotométrica da descoloração (oxidação) do β-caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico.<sup>19</sup>

Preparou-se uma solução padrão de 1 mg/mL em metanol de cada partição. Logo após, as amostras foram diluídas para obter as concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL.

A emulsão contendo o β-caroteno e o ácido linoleico foi preparada, utilizando-se 30 µL de ácido linoleico, 265 µL de Tween 40, 500 µL de diclorometano e 100 µL da solução β-caroteno a 10 mg/mL em diclorometano. A emulsão foi submetida à completa evaporação do diclorometano com gás inerte (nitrogênio). Em seguida, adicionou-se água, previamente saturada com oxigênio, à emulsão até se obter a leitura da absorbância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Todo o processo foi realizado em baixa luminosidade e a emulsão foi armazenada em recipiente revestido com papel alumínio para evitar o processo de degradação.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços e baseou-se no método descrito por Melo e Mancini Filho, com modificações.<sup>20</sup> Foram adicionados 250 µL da emulsão e 10 µL de amostra, em diferentes concentrações a serem testadas, nos poços da microplaca. O controle negativo foi realizado com 250 µL da emulsão e 10 µL de metanol para determinar 100% de oxidação. O teste foi realizado em triplicata.

A placa foi incubada a 45°C no leitor de ELISA para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β-caroteno. As absorbâncias também foram medidas no leitor de ELISA a 470 nm. As leituras foram obtidas em tempo zero e intervalos de 15 minutos até completar 120 minutos de reação, totalizando assim nove leituras. Os controles positivos *M. ilicifolia*, rutina, quercetina e foram testados nas mesmas condições das amostras.

Os resultados foram mensurados por meio do cálculo de porcentagem de inibição do sistema β-caroteno/ácido linoleico. Avaliou-se a curva de oxidação utilizando o cálculo de tangente para encontrar os valores de F1 (capacidade de bloqueio da formação de

peróxidos) entre 15 e 45 minutos após o início da reação e F2 (capacidade de inibir outras reações durante o processo oxidativo, que produzem espécies radiculares, como os produtos da decomposição dos peróxidos, que aceleram a oxidação) entre 75 e 90 minutos após início da reação.<sup>19</sup> Os dados são apresentados como média e erro padrão médio (média ± e.p.m).

### Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e determinação dos espectros de absorção UVA, UVB e UVC

O fator de proteção solar (FPS) foi determinado a partir do método Mansur et al<sup>21</sup>, com algumas modificações. Consiste no emprego da espectrofotometria na região do UV para a avaliação das formulações, medindo-se a absorbância de uma solução em uma faixa de comprimento de onda entre 290-320 nm, realizando leituras em intervalos de 5 nm.

Diluiu-se as partições e o filtro solar de referência hidrossolúvel (Ácido-2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido-2-hidróxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico)<sup>22</sup> (Deg - Lote: PROD015080) em metanol 95%, obtendo-se soluções com concentração de 10, 50 e 100 µg/mL.

Proseguiu-se o ensaio em microplaca de 96 poços, adicionando 200 µL de amostra de cada concentração, em triplicata. Para o branco da amostra utilizou-se metanol e pipetou-se o mesmo volume. Por fim, as soluções foram analisadas no leitor de ELISA nos comprimentos de ondas entre 290-320 nm, e posteriormente, aplicou-se a fórmula abaixo (equação 1), que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação (EE x I) descrita na tabela 1. Os dados são apresentados como média e erro padrão médio (média ± e.p.m).

Para determinar o comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), as partições e o filtro

**Equação 1:** Cálculo do FPS *in vitro* por espectrofotometria por absorbância no UV pelo método Mansur.<sup>21</sup>

$$FPS = FC \times \left[ \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \right]$$

Legenda: FC= fator de correção (igual a 10); EE(λ)= efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda; I(λ)= intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ); Abs(λ)= leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

solar de referência hidrossolúvel foram analisadas no espectrofotômetro nas mesmas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, a partir da utilização de uma cubeta de quartzo, obtendo-se a varredura da absorbância entre 200-400 nm, em triplicata.

**Tabela 1:** Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.<sup>21</sup>

$\lambda$ (nm)	EE( $\lambda$ ) x I( $\lambda$ )
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

## Análise estatística

As análises estatísticas, para todos os experimentos, foram realizadas pelo teste de ANOVA seguido de teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) por meio do programa GraphPad Prism 8.

## RESULTADOS

### Teor de flavonoides e o potencial antioxidante

De acordo com a tabela 2, observou-se que a partição acetato de etila (PAC) ( $336,91 \pm 1,89$  mg/g)

apresentou maior teor de flavonoides, seguido da partição hidroalcoólica (PAGC) ( $140,70 \pm 1,91$  mg/g) ( $p < 0,05$ ).

A análise quantitativa da atividade antioxidante das partições revelou que a  $CI_{50}$  de todas as partições foi maior que a dos padrões, quercetina e rutina (tabela 2). PAC e PAGC foram as partições que apresentaram melhor atividade na redução de radical livre ( $CI_{50} = 2,15 \pm 0,20$  e  $6,90 \pm 0,75$   $\mu$ g/mL, respectivamente). Além disso, a PAC apresentou resultado muito semelhante a *M. ilicifolia* ( $CI_{50} = 2,20 \pm 0,09$   $\mu$ g/mL), não havendo diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ).

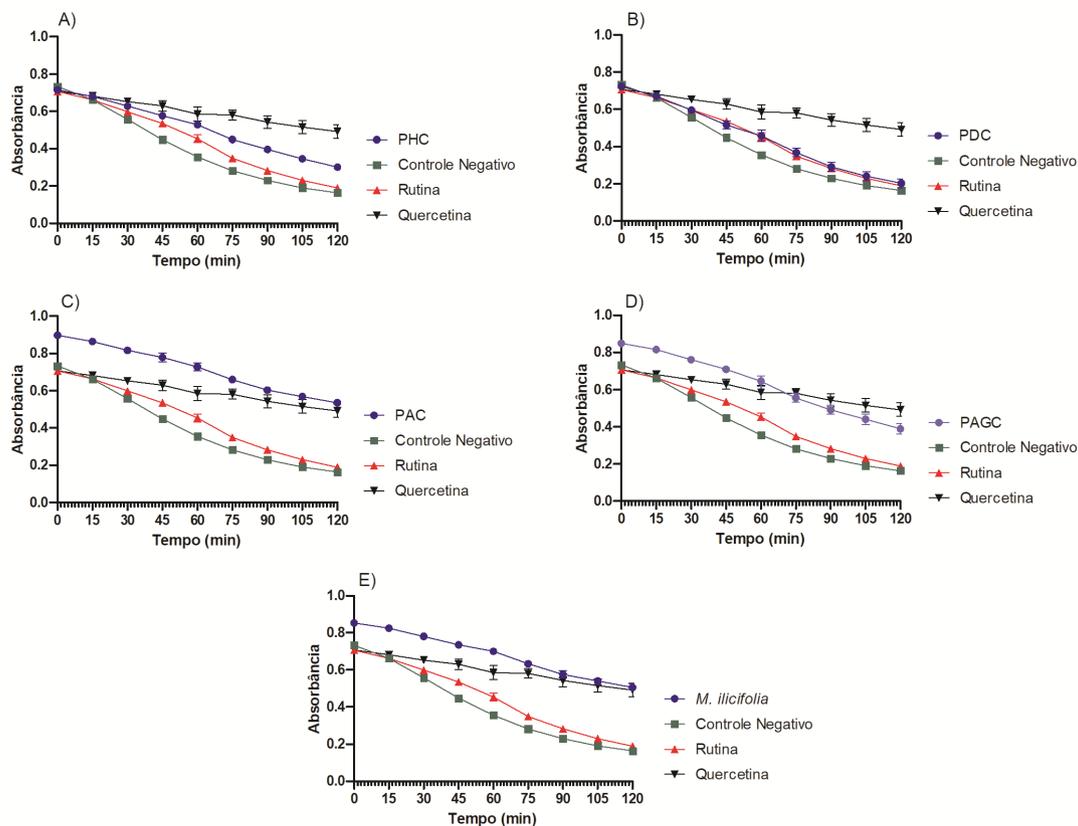
No método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio, a PAC apresentou alta capacidade antioxidante (%AAR ácido ascórbico =  $45,71 \pm 3,74$ ; %AAR quercetina =  $312,72 \pm 25,59$ ; %AAR rutina =  $120,35 \pm 9,85$ ), superando a atividade antioxidante da *M. ilicifolia* (%AAR ácido ascórbico =  $37,23 \pm 7,46$ ; %AAR quercetina =  $254,71 \pm 51,04$ ; %AAR rutina =  $98,03 \pm 19,64$ ) ( $p < 0,05$ ). A PAGC também obteve capacidade antioxidante total significativa com %AAR de  $85,50 \pm 3,01$ ;  $222,16 \pm 7,82$  e  $32,47 \pm 1,14$  em relação ao ácido ascórbico, quercetina e rutina, respectivamente.

No ensaio de co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, apenas a PAC ( $70,31 \pm 0,48\%$ ) e PDC ( $57,06 \pm 6,74\%$ ) exibiram equivalência de inibição aos padrões rutina ( $53,47 \pm 1,07\%$ ) e quercetina ( $57,51$

**Tabela 2:** Doseamento de flavonoides e atividade antioxidante das partições do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*.

Amostras	Flavonoides totais (mg/g equivalente em rutina)	DPPH $CI_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	Complexo fosfomolibdênio			$\beta$ -caroteno/ácido linoleico (38,46 $\mu$ g/mL)		
			%AAR Ác.	%AAR	%AAR Rutina	Inibição (%)	F1	F2
PHC	$52,86 \pm 3,43^{e,f,g}$	$> 250^{a,b,e,f,g,h}$	$17,77 \pm 3,01^{e,f,h}$	$121,56 \pm 20,6^{e,f,h}$	$46,78 \pm 7,93^{e,f,h}$	$29,47 \pm 7,89^{a,b,e,g}$	$0,51 \pm 0,18$	$0,72 \pm 0,59$
	$84,55 \pm 5,59^{d,e,f}$		$73,91 \pm 22,65^d$	$16,79 \pm 3,25^{e,f,h}$	$114,89 \pm 22,26^{e,f,h}$	$44,22 \pm 8,57^{e,f,h}$	$57,06 \pm 6,74^{d,f,h}$	$0,63 \pm 0,09^b$
PAC	$336,91 \pm 1,89^{d,f,g}$	$2,15 \pm 0,20^d$	$45,71 \pm 3,74^{d,f,g,h}$	$312,72 \pm 25,59^{d,f,g,h}$	$120,35 \pm 9,85^{d,f,g,h}$	$70,31 \pm 0,48^{d,f,h}$	$0,58 \pm 0,09^b$	$0,93 \pm 0,22$
	$140,70 \pm 1,91^{d,e,g}$		$6,90 \pm 0,75^d$	$85,50 \pm 3,01^{d,e,g}$	$222,16 \pm 7,82^{d,e,g}$	$32,47 \pm 1,14^{d,e,g}$	$10,61 \pm 3,39^{a,b,e,g,h}$	$0,63 \pm 0,04^b$
<i>M. ilicifolia</i>	NR	$2,20 \pm 0,09^d$	$37,23 \pm 7,46^{d,e,g}$	$254,71 \pm 51,04^{d,e,g}$	$98,03 \pm 19,64^{d,e,g}$	$32,64 \pm 1,44^{a,b,e,f,g}$	$0,53 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,35$
Rutina	NR	$0,54 \pm 0,38^d$	NR	NR	NR	$53,47 \pm 1,07^{d,f,h}$	$0,52 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,02$
Quercetina	NR	$0,33 \pm 0,12^d$	NR	NR	NR	$57,51 \pm 2,45^{d,f,h}$	$0,32 \pm 0,17^{e,f,g}$	$0,67 \pm 0,48$

Legenda: PHC= partição hexânica; PDC= partição diclorometânica; PAC= partição acetato de etila; PAGC= partição hidroalcoólica (ambas do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*). *M. ilicifolia* – extrato metanólico das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Florien Fitoativos LTDA – Lote: 18J23 – FL06 – 004187). a) Diferença estatística em relação ao controle positivo rutina ( $p < 0,05$ ). b) Diferença estatística em relação ao controle positivo quercetina ( $p < 0,05$ ). c) Diferença estatística em relação ao controle positivo ácido ascórbico ( $p < 0,05$ ). d) Diferença estatística em relação à PHC ( $p < 0,05$ ). e) Diferença estatística em relação à PAC ( $p < 0,05$ ). f) Diferença estatística em relação à PAGC ( $p < 0,05$ ). g) Diferença estatística em relação à PDC ( $p < 0,05$ ). h) Diferença estatística



**Figura 1:** Perfil de decaimento da absorbância do  $\beta$ -caroteno (curva de oxidação), avaliada em 470 nm, das partições de *Mitracarpus frigidus*.

Legenda: a) PHC= partição hexânica; b) PDC= partição diclorometânica; c) PAC= partição acetato de etila; d) PAGC= partição hidroalcoólica (ambas do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*); e) Extrato metanólico das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Florien Fitoativos LTDA – Lote: 18J23 – FL06 – 004187). Controle negativo é o 100% de oxidação. Quercetina e rutina foram usadas como controle positivos.

$\pm 2,45\%$ ), não havendo diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ). Além disso, a PAC obteve uma inibição superior a *M. ilicifolia* ( $32,64 \pm 1,44\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Neste mesmo ensaio, a PAC revelou eficiência em bloquear a formação inicial de radicais peróxilas ( $F1 = 0,58 \pm 0,09$ ), contudo, para a fase de propagação, não apresentou eficiência antioxidante, pois atingiu valores próximos a  $1^{23}$  ( $F2 = 0,93 \pm 0,22$ ).

Na curva de oxidação do  $\beta$ -caroteno (figura 1) observou-se que as partições PAC e PAGC apresentaram uma menor inclinação em sua curva quando comparadas ao controle negativo. Vale ressaltar que PAC que foi semelhante à quercetina e *M. ilicifolia*. PHC e PDC mostraram inclinação semelhante à rutina.

### Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro

De acordo com a tabela 3, somente a PAC apresentou atividade fotoprotetora, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , pois exibiu FPS acima de  $6^{24}$  ( $\text{FPS} = 12,11$

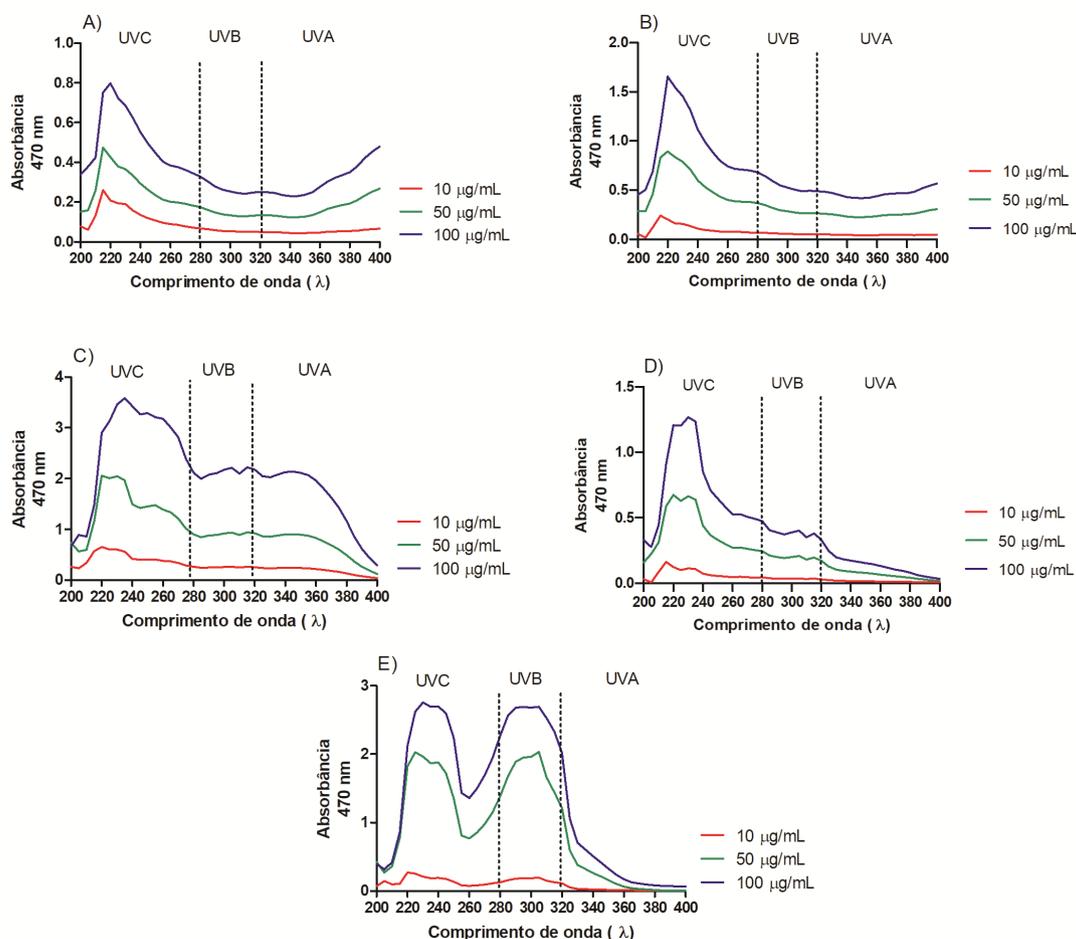
$\pm 0,020$ ), com diferença estatística em relação ao filtro solar de referência hidrossolúvel ( $\text{FPS} = 14,86 \pm 0,062$ ) ( $p < 0,05$ ) (tabela 3).

Considerando o espectro de absorção ultravioleta realizado, observou-se que a PAC (figura 2 (B)), principalmente na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou picos de intensidade de absorção nas regiões UVA (335 e 340 nm), UVB (305 e 315 nm), UVC (235 nm), diferentemente das outras partições, que exibiram picos de intensidade de absorção predominantemente na região UVC (280-100 nm). Além disso, o filtro solar de referência (figura 2 (C)) apresentou absorção somente nas regiões UVB e UVC na mesma concentração, mostrando ser menos eficiente que a PAC, a qual apresentou amplo espectro de absorção.

## DISCUSSÃO

### Teor de flavonoides e potencial antioxidante

O doseamento de flavonoides totais é um



**Figura 2:** Espectro de varredura das partições do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*.

Legenda: a) PHC= partição hexânica; b) PDC= partição diclorometânica; c) PAC= partição acetato de etila; d) PAGC= partição hidroalcoólica (ambas do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*); e) Filtro solar= filtro solar de referência hidrossolúvel (Deg - Lote: PROD015080).

método largamente empregado para avaliar o teor deste metabólito secundário em produtos vegetais, visto que se trata de um ensaio de fácil e rápida execução.<sup>12</sup> Além disso, o teor de flavonoides pode estar diretamente relacionado às atividades biológicas realizadas neste trabalho. Como visto anteriormente, a partição acetato de etila (PAC) apresentou maior teor de flavonoides em relação às outras partições, sugerindo que as substâncias flavonoídicas do material em estudo apresentam polaridade semelhante ao solvente acetato de etila.

O método de sequestro de radical livre (DPPH) é o ensaio mais amplamente relatado para a triagem de atividade antioxidante de muitos fármacos de origem vegetal.<sup>25</sup> Embora todas as partições apresentarem  $CI_{50}$  maiores que os padrões quercetina e rutina, PAC e PAGC foram as partições que se mostraram promissoras na redução de radical livre, sendo a atividade de PAC foi equivalente a *M. ilicifolia*. Essas amostras foram as que apresentaram maiores teores de flavonoides, como dito

anteriormente, demonstrando assim uma correlação dessa classe de compostos fenólicos com este ensaio antioxidante.

O método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio além de ser simples e de baixo custo, possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto hidrofílicos.<sup>12</sup> Conforme nossos resultados, a PAC expressou uma elevada porcentagem de atividade antioxidante relativa em relação aos padrões ácido ascórbico, quercetina e rutina, logo, a PAC possui alta capacidade antioxidante, superando a atividade antioxidante da *M. ilicifolia*. A PAGC também apresentou uma considerável capacidade antioxidante total, já que teve resultados significativos em relação ao ácido ascórbico e quercetina.

A atividade antioxidante das partições avaliada pelo método de co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, aponta que somente PAC e PDC apresentaram equivalência de inibição aos padrões rutina e quercetina. Além disso, apenas a PAC superou

**Tabela 3:** Fator de Proteção Solar das partições do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus*.

Amostras	Concentração (µg/mL)		
	10	50	100
PHC	0,31 ± 0,005 <sup>b,e</sup>	0,99 ± 0,007 <sup>b,e</sup>	1,44 ± 0,009 <sup>b,d,e</sup>
PDC	0,21 ± 0,030 <sup>b,e</sup>	1,62 ± 0,040 <sup>b,e</sup>	2,04 ± 0,030 <sup>b,e</sup>
PAC	1,15 ± 0,010 <sup>a,c,d</sup>	5,36 ± 0,020 <sup>a,c,d,e</sup>	12,11 ± 0,020 <sup>a,c,d,e</sup>
PAGC	0,32 ± 0,019 <sup>b,e</sup>	1,44 ± 0,021 <sup>b,e</sup>	2,26 ± 0,008 <sup>a,b,e</sup>
Filtro solar	0,84 ± 0,027 <sup>a,c,d</sup>	9,46 ± 0,019 <sup>a,b,c,d</sup>	14,86 ± 0,062 <sup>a,b,c,d</sup>

Legenda: PHC= partição hexânica; PDC= partição diclorometânica; PAC= partição acetato de etila; PAGC= partição hidroalcoólica (ambas do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus*). Filtro solar – filtro solar de referência hidrossolúvel (Deg – Lote: PROD015080). a) Diferença estatística em relação à PHC (p<0,05). b) Diferença estatística em relação à PAC (p<0,05). c) Diferença estatística em relação à PAGC (p<0,05). d) Diferença estatística em relação à PDC (p<0,05). e) Diferença estatística em relação ao filtro solar (p<0,05). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

a inibição da *M. ilicifolia*.

Neste mesmo ensaio, avaliou-se a eficiência antioxidante a partir da relação entre a tangente das curvas cinéticas de oxidação do extrato e do controle negativo (100% de oxidação), de acordo com Yanishlieva e Marinova<sup>26</sup>. Na primeira parte da curva, verificou-se a eficiência das partições em bloquear a reação em cadeia por meio da interação com os radicais peróxilas (F1), já na segunda parte, a possibilidade das partições participarem de outras reações durante o processo oxidativo (F2) (produtos de decomposição dos peróxidos). Segundo Nascimento et al<sup>23</sup>, para um desempenho antioxidante satisfatório, os valores de F1 e F2 devem ser menores que 1 e mais próximos de 0. Diante dos nossos resultados, todas as partições revelaram eficiência em bloquear a formação inicial de radicais peróxilas, destacando-se a PAC, porém, para a fase de propagação, não apresentaram eficiência antioxidante. Dessa forma, a PAC agiu somente no início da oxidação, bloqueando a reação em cadeia, assim como os padrões rutina e *M. ilicifolia*.

A curva de oxidação representa uma curva de decoloramento do β-caroteno ao longo de 120 minutos de reação do controle negativo (100% de oxidação), do controle positivo e das partições. Notou-se que a PAGC, e principalmente a PAC, apresentaram uma menor inclinação em sua curva quando comparada ao controle negativo, mostrando serem capazes de bloquear a oxidação do ácido linoleico e, conseqüentemente, preservar a coloração do β-caroteno.

Todos os resultados encontrados nos testes antioxidantes para as amostras analisadas confirmaram a potencial atividade biológica das partições, como relatado na literatura para MFM e *M. ilicifolia*,<sup>11-14</sup> com destaque para PAC, a qual possui maior teor de flavonoides, os quais podem estar associados às suas propriedades antioxidantes.<sup>27</sup> As partições podem ter se sobressaído quanto à atividade antioxidante em relação aos estudos descritos de MFM e *M. ilicifolia*,<sup>11-14</sup> devido ao processo de partição, que separa substâncias com polaridades diferentes presentes nos extratos, concentrando àquelas que possuem um resultado mais promissor.

### Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro

Segundo a Anvisa,<sup>24</sup> um fotoprotetor aceitável deve ter um FPS maior que 6. A partir dessa legislação, observou-se que a PAC foi a única partição a apresentar atividade fotoprotetora, na concentração de 100 µg/mL, com FPS= 12,11. Esse resultado é confirmado através dos espectros de absorção ultravioleta, que foi realizado para avaliar a eficácia das partições como fotoprotetoras, a partir da sua capacidade de absorção da energia radiante. Diante disso, observou-se que a PAC, na mesma concentração, apresentou picos de intensidade de absorção nas regiões UVA (400-320 nm), UVB (320-280 nm) e UVC (280-100 nm), diferentemente das outras partições, que exibiram picos de intensidade de absorção somente na região UVC. Além disso, sugere-se que a PAC, por ser capaz de absorver na região UVA, poderia potencializar a fotoproteção do filtro solar referência hidrossolúvel, se incorporada na formulação do mesmo, o qual possui uma intensidade de absorção maior nas regiões UVB e UVC, na concentração de 100 µg/mL, produzindo, assim, uma fotoproteção de amplo espectro. Com isso, a PAC tem potencial para compor, como coadjuvante, em uma formulação com atividade fotoprotetora.

Diante dos resultados encontrados nesse estudo, percebemos que as atividades antioxidantes podem prever o potencial das partições diante das atividades biológicas, e que a composição de cada partição, destacando a presença dos flavonoides, favoreceu para os melhores resultados antioxidantes e fotoprotetores.

### CONCLUSÃO

O presente estudo revela que *Mitracarpus frigidus* apresenta grande potencial antioxidante e fotoprotetor, devido ao seu conteúdo flavonoídico. A PAC foi a partição que expressou melhores resultados, obtendo maior concentração de compostos, como os flavonoides, e tais resultados promissores podem estar relacionados às atividades dessa partição. Diante

disso, devido a sua capacidade de potencializar a ação de um produto com a função de proteção solar, mais pesquisas serão realizadas com a PAC, para que futuramente possamos incorporá-la como coadjuvante em uma formulação farmacêutica fotoprotetora, uma vez que, um produto natural com atividade biológica, antioxidante e fotoprotetora, tem-se tornando tendência mundial em formulações dermocosméticas, o que agrega valor ao mesmo, devido à boa aceitação por parte dos consumidores.

## FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado por doações da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (número da concessão: APQ-01059-14 para Rodrigo L. Fabri). As bolsas foram concedidas pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF/Brasil e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich, do Departamento de Botânica/ Universidade Federal de Juiz de Fora, pela identificação botânica das espécies.

## CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum declarado.

## REFERÊNCIAS

- Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 55(8):566-75. doi: 10.1590/S0004-27302011000800010
- Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetores solares. *Quim Nova.* 2006; 30(1):153-8. doi: 10.1590/S0100-40422007000100027
- Khury E, Sousa EB. Protetores solares. *Cosmetics & Toiletries.* 2010; 22: 66-78.
- Chiari-Andréo BG. Fotoproteção: conceitos básicos e atualização. I Congresso de Ciências Aplicadas à Farmácia Online [evento na internet]; 2020 set 15-18; Curitiba, Brasil [acesso em 20 out 2020]. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=7637qrnff3I>.
- Ribeiro CJ. *Cosmetologia aplicada a dermoestética.* 2. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2006. p. 83-99.
- Godinho MM, Hossy BH, Niemeyer-Corbellini JP, Silva MR. Photoprotectors profile in Brazilian sunscreens. *Surg Cosmet Dermatol.* 2017; 9(3):243-6. doi: 10.5935/scd1984-8773.20179305
- Souza FP, Campos GR, Packer JF. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – acerola. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013; 1(34):69-77.
- Anderson LA. A Provisional checklist of Neotropical Rubiaceae. 1. ed. Meise: National Botanic Garden of Belgium; 1992. p. 199.
- Kissmann KG, Groth D. *Plantas infestantes e nocivas.* 2. ed. São Paulo: BASF; 2000. p. 722.
- Pereira ZV, Carvalho-Okano RM, Garcia FCP. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata de Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. *Acta Bot Bras.* 2006; 20(10):207-24. doi: 10.1590/S0102-33062006000100020
- Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES, Scio E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology.* 2009; 100:428-33. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.053
- Cunha PS. Avaliação do potencial antioxidante, anti-inflamatório e fotoprotetor *in vitro* do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) [monografia]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2017.
- Santos-Oliveira R, Coulaud-Cunha S, Colaço W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae: contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2009; 19(2):650-659. doi: 10.1590/S0102-695X2009000400025
- Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2009; 19(2B):553-56. doi: 10.1590/S0102-695X2009000400007
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). *Farmacopeia brasileira: monografias plantas medicinais.* 6. ed. Brasília: ANVISA; 2019. v. 2, p. 225-232.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry.* 2004; 85(2):231-37. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.05.007
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958; 181(4617):1199-1200. doi: 10.1038/1811199a0
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry.* 1999;

269(2):337-41. doi: 10.1006/abio.1999.4019

19. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. Ciênc Tecnol Aliment. 2006; 26(2):446-52. doi: 10.1590/S0101-20612006000200031

20. Melo MSOM, Mancini-Filho J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo. 1989; 25(2):147-57.

21. Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulary RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. An Bras de Dermatol. 1986; 61(4):121-24.

22. Teixeira MSM. Avaliação da atividade fotoprotetora de formulação cosmética contendo a associação entre fração em clorofórmio de *Guarcinia cambogia* DESR. (Clusiaceae) e filtro sintético de amplo espectro [monografia]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2016.

23. Nascimento RJ, Araújo CR, Melo EA. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). Alimentos e Nutrição. 2010; 21(2):209-16.

24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Aprova o regulamento técnico "Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências". 2012.

25. Onkar P, Bangar J, Karodi R. Evaluation of antioxidant activity of traditional formulation *Giloy satva* and hydroalcoholic extract of the *Curculigo orchioides* gaertn. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2012; 2(6):209-13. doi: 10.7324/japs.2012.2733

26. Yanishlieva NVI, Marinova EM. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. Food Chemistry. 1995; 54(4):377-82. doi: 10.1016/0308-8146(95)00061-M

27. Lima FO, Bezerra AS. Flavonoides e radicais livres. Ciências Naturais e Tecnológicas. 2012; 13(1):111-24. doi: 10.37779/nt.v13i1.1298