



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

**Atividade fotoprotetora e análise da variação sazonal de *Plectranthus
amboinicus***

JOÃO PESSOA – PB

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

Atividade fotoprotetora e análise da variação sazonal de *Plectranthus
amboinicus*

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
da Universidade Federal da Paraíba
como requisito para a obtenção do título
de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

T332a Terto, Marcio Vinicius Cahino.
Atividade fotoprotetora e análise da variação sazonal
de plectranthus amboinicus / Marcio Vinicius Cahino
Terto. - João Pessoa, 2021.
220 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Radiação ultravioleta. 2. Fotoproteção. 3.
Plectranthus amboinicus. 4. FPS. I. Tavares, Josean
Fechine. II. Título.

UFPB/BC

CDU 66.085.3(043)

MÁRCIO VINÍCIUS CAHINO TERTO

Atividade fotoprotetora e análise da variação sazonal de *Plectranthus amboinicus*

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fchine Tavares

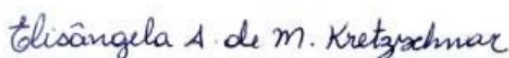
Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientador)

Prof. Dr^a. Luciana Scotti

Doutora em Cosmetologia e Modelagem Molecular
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti

Doutor em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)



Prof. Dr^a. Elisângela A. de Moura

Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Externo)



Prof. Dr. Jackson Roberto G. da S. Almeida

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Vale do São Francisco
(Examinador Externo)

Agradecimentos

À minha mãe **Walquíria Lima Cahino** por sempre estar presente me apoiando durante todos os momentos da minha vida, sendo a pessoa que mais acredita em mim, comemorando cada passo dado mesmo por mais simples que fosse e amor incondicional demonstrado a todo instante, me vendo sempre com orgulho.

Aos meus filhos **Kyra e Kael Alves Cahino** por me fazerem a cada dia uma pessoa, um pai e ser humano melhor, me dando forças para prosseguir adiante, sendo a tradução do verdadeiro amor existente. Papai amará vocês para sempre.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Josean Fachine Tavares**, pela visão e determinação em apostar em um projeto inovador e pioneiro no grupo de pesquisa, sempre encorajando e fornecendo um ambiente rico em soluções para os desafios dessa jornada.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Sobral** por abraçar a ideia e incentivar o desenvolvimento do projeto direta e indiretamente, sempre presente com sua paixão contagiante pela pesquisa.

À mestre, amiga e companheira de pesquisa, **Juliana Gomes**, sempre ao lado trabalhando, planejando, executando e fazendo com que o projeto a cada dia tomasse forma. Conquistando assim minha eterna gratidão por compartilhar momentos decisivos na minha vida acadêmica.

Ao amigo de longa data e **Prof. Dr. Sócrates Golzio** por ajudar no desenvolvimento do trabalho, análise de dados e ser um grande incentivador tanto na vida acadêmica como na vida pessoal, estando sempre presente nos momentos importantes.

Aos amigos que fiz na turma de doutorado de 2016, **Rose, Andreza, Laiane, Anderson, Yuri e Lucas**, pelos momentos compartilhados, companheirismo e agradável convívio.

Ao amigo e doutorando, **Diego Araújo** pela imprescindível ajuda na realização do projeto, pelos ensinamentos feitos, presença constante nos experimentos e momentos de descontração.

Ao amigo e doutor **Kaio Aragão**, por todo o apoio, conversas, incentivo, momentos importantes e de descontração compartilhados ao longo dos anos.

À doutoranda e amiga, **Joanda Paolla**, por seu importante papel no desenvolvimento desse trabalho, pelas risadas compartilhadas e colaboração durante esses anos.

A todos os alunos e às pessoas que fazem parte do laboratório LMCA pelo convívio, momentos compartilhados e ajuda mútua.

Aos doutores **Tainá Silva e João Jarllys** pela ajuda nas análises realizadas no laboratório LANANO – IFPB, que foram essenciais para o prosseguimento deste trabalho.

À minha amiga e mestre **Cris Husein e a GenusPharma®** por sempre incentivar e patrocinar parte da pesquisa, ajudando seu desenvolvimento e pelo apoio dado em diversos momentos.

Aos **técnicos Marcelo e Evandro** pelas ideias e experimentos feitos, momentos de descontração e risadas compartilhadas, pelo apoio com softwares entre outras coisas.

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa** pelo apoio, incentivo e fornecimento de material para a execução das análises necessárias.

A **Junior**, pela sua educação, conversas, descontração e também por sempre proporcionar um ambiente confortável para a realização de experimentos.

Aos meus familiares pelo carinho, palavras, elogios e muita união que completam e descreve o significado da palavra Família na sua amplitude.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao CNPq pela ajuda financeira em 4 anos de doutorado, onde foi muito gratificante e enriquecedor essa experiência.

À **Universidade Federal da Paraíba** por todas as oportunidades fornecidas, principalmente pelo apoio estrutural e científico.

A **Deus** por tudo! Obrigado pela sua presença ao meu lado me acalmando, direcionando e erguendo em todos os momentos.

Muito Obrigado!

“O que você sabe não tem valor; o valor está no que você faz com o que sabe”

Bruce Lee

Resumo

A exposição excessiva ao sol causa danos à pele, entre eles o fotoenvelhecimento e o câncer. Por isso, é preconizado a utilização de filtros solares como maneira preventiva de proteção cutânea. A utilização de produtos naturais, principalmente com a presença de compostos fenólicos vem agregando alto potencial na indústria de protetores pela sua capacidade de proteção, tolerabilidade e sustentabilidade. Dentro desse contexto, a família Lamiaceae é a família vegetal com maior quantidade de representantes utilizados na indústria cosmética, entre elas, as espécies do gênero *Plectranthus*. *Plectranthus amboinicus* é conhecida pela presença de compostos fenólicos e óleos voláteis, muito utilizada popularmente para diversas doenças, principalmente do trato respiratório e gastrointestinal. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante da espécie e a variação sazonal ocorrida no extrato, bem como as implicações da radiação solar e precipitação para o extrato estudado. Para isso, foi determinado o perfil fitoquímico do extrato etanólico bruto (EEB) através de CLAE-EMⁿ e foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD para a quantificação do composto majoritário, ácido rosmarínico. Para a avaliação da atividade fotoprotetora, foi determinado o fator de proteção de solar (FPS) pelo método *in vitro* de Mansur. A atividade antioxidante foi avaliada a partir do método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) e o teor de compostos fenólicos foi determinado seguindo o método de Folin-Ciocalteu. Também foi determinado o teor de flavonoides totais pelo método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio. Além disso, foram determinadas as variações sazonais no FPS e atividade antioxidante, do teor de fenólicos e flavonoides totais, bem como de ácido rosmarínico. Assim, através de análise de componentes principais (PCA) foi vista a correlação da incidência de radiação solar e precipitação com o teor de fenólicos e flavonoides totais, ácido rosmarínico, FPS e CE₅₀. Como resultados, detectou-se a presença de 31 compostos no extrato através de CLAE-EMⁿ, onde 18 foram reportados pela primeira vez na espécie. O método analítico desenvolvido por CLAE-DAD foi validado, apresentando especificidade, linearidade, precisão, precisão intermediária, exatidão e robustez de acordo com as especificações exigidas pela ANVISA (RE nº 166/2017). O EEB de *P. amboinicus* apresentou teor de fenólicos totais de $142,39 \pm 1,12$ mg EAG/g, teor de ácido rosmarínico igual a $22,48 \pm 0,07$ µg/mL, CE₅₀ igual a $112,39$ µg/mL e FPS = 12,63. Através da análise sazonal, foi visto que o melhor mês para a coleta do extrato é julho, que apresentou um FPS = 14,79. A radiação solar apresentou influência na atividade antioxidante, porém pouca influência para o aumento do FPS e a precipitação não teve influência sobre as atividades. Dessa forma, conclui-se que *P. amboinicus* tem grande potencial para o desenvolvimento de um protetor solar com características inovadoras, com um alto FPS e atividade antioxidante, abrangendo as duas linhas de defesa.

Palavras chave: *Plectranthus amboinicus*; fotoproteção; radiação ultravioleta; FPS

Abstract

Excessive exposure to the sun causes damage to the skin and ultimately cancer. Therefore, it is recommended to use sunscreens as a preventive way of skin protection. The use of natural products, mainly with the presence of phenolic compounds, has added high potential in the protective industry due to its capacity for protection, tolerability and sustainability. Thus, Lamiaceae family is the plant family with the largest number of representatives used in the cosmetic industry, among them, the species of the genus *Plectranthus*. *Plectranthus amboinicus* is known for the presence of phenolic compounds and volatile oils, widely used for several diseases, mainly of the respiratory and gastrointestinal tracts. Thus, the aim of this study was to determine the photoprotective and antioxidant activities of the species and the seasonal variation occurred in the extract, as well as the implications of solar radiation and precipitation for the extract. For this, the profile of the crude ethanolic extract (CEE) was determined by HPLC-MSⁿ and an analytical method by HPLC-DAD was developed and validated for quantification of the major compound, rosmarinic acid. For the determination of photoprotective activity, the sun protection factor (SPF) was determined by Mansur's *in vitro* method. The antioxidant activity was assessed using the DPPH method and the content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu method. The content of total flavonoids was also determined by the colorimetric method using Aluminum Chloride. In addition, seasonal variations in SPF and antioxidant activity, the content of total phenolics and flavonoids, as well as rosmarinic acid, were determined. So, through principal component analysis (PCA), correlations of the incidence of solar radiation and precipitation with the components described above was seen. As a result, the presence of 31 phenolic compounds in the extract was identified through HPLC-MSⁿ, where 18 were reported for the first time in the species. The analytical method developed by HPLC-DAD was validated, showing specificity, linearity, precision, intermediate precision, accuracy and robustness according to the specifications required by ANVISA (RE n° 166/2017). The *P. amboinicus* CEE had a total phenolic content of 142.39 ± 1.12 mg GAE/g, a rosmarinic acid content of 22.48 ± 0.07 µg/ml, EC₅₀ equal to 112.39 µg/ml and SPF = 12.63. Through the seasonal analysis, it was seen that the best month for harvesting the plant is July, which presented an SPF = 14.79. Solar radiation had an influence on antioxidant activity, but little influence on the increase in SPF and precipitation had no influence on both activities. Thus, it is concluded that *P. amboinicus* has great potential for the development of a sunscreen with innovative characteristics, with a high SPF and antioxidant activity, covering both lines of defense.

Key-words: *Plectranthus amboinicus*; photoprotection; ultravioleta radiation, SPF

Figuras

Figura 1. Mapa da distribuição mundial de espécies da família Lamiaceae.....	23
Figura 2. Principais monoterpenos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae.	26
Figura 3. Exemplos de polifenóis encontrados na família Lamiaceae.....	27
Figura 4. Imagem da espécie <i>Plectranthus amboinicus</i>	31
Figura 5. Principais compostos químicos encontrados nos óleos essenciais de <i>P. amboinicus</i>	33
Figura 6. Compostos fenólicos encontrados em <i>P. amboinicus</i>	34
Figura 7. Índice ultravioleta.	38
Figura 8. IUV máximo do hemisfério Sul, mostrando valores extremos de radiação UV para o Brasil.	39
Figura 9. Mecanismos de ação das EROs após indução pela Radiação UV. .	43
Figura 10. Intensidade do efeito protetor de alguns antioxidantes.	46
Figura 11. Escala de Fitzpatrick de fototipos de pele.	47
Figura 12. Mecanismo de ação da quercetina contra o dano oxidativo do DNA.	56
Figura 13. Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários pelas plantas.	58
Figura 14. Cromatógrafo líquido utilizado.	66
Figura 15. Exemplos de cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método.	67
Figura 16. Reação envolvida na neutralização do radical DPPH por um antioxidante.	76
Figura 17. Cromatograma do pico base do extrato de <i>P. amboinicus</i> avaliado por CLAE-IES-EM ⁿ	83
Figura 18. Estrutura das agliconas de flavonas estudadas e representação da reação de (RDA).	87
Figura 19. Estrutura da taxifolina e representação da proposta de fragmentação do anel C.	89
Figura 20. Estrutura da eriodictiol e representação da proposta de fragmentação do anel C.	90
Figura 21. Representação da estrutura do Camferol dimetil éter.	90
Figura 22. Estrutura das agliconas dos derivados do ácido cinâmico observados.	91
Figura 23. Estrutura do ácido siríngico.	92
Figura 24. Estrutura do ácido cítrico.	92
Figura 25. Estrutura do ácido tuberônico hexosídeo.	92
Figura 26. Estrutura do ácido rosmarínico.	93
Figura 27. Estrutura dos derivados do ácido rosmarínico observados.	94
Figura 28. Estrutura do siringaresinol.	95
Figura 29. Teor de fenólicos totais de <i>P. amboinicus</i> em 12 meses.	146
Figura 30. Teor de flavonoides totais de <i>P. amboinicus</i> em 12 meses.	147

Figura 31. Teor de AR de <i>P. amboinicus</i> em 12 meses.	148
Figura 32. CE ₅₀ do extrato de <i>P. amboinicus</i> em 12 meses.	148
Figura 33. Variações do valor de FPS de <i>P. amboinicus</i> em 12 meses.	149
Figura 34. Análise de componentes principais mostrando os grupamentos de correlação de PC4 x PC1 usando os dados obtidos para o teor de fenólicos e flavonoides totais, teor de ácido rosmarínico, CE ₅₀ , FPS, incidência de radiação solar e nível de precipitação.	151
Figura 35. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides, ácido rosmarínico, CE ₅₀ de <i>P. amboinicus</i> pelos meses, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.	152
Figura 36. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de <i>P. amboinicus</i> pelos meses, com a radiação solar incidente, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.	153
Figura 37. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de <i>P. amboinicus</i> pelos meses, com a radiação solar incidente, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de CE ₅₀ encontrado.	155
Figura 38. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de <i>P. amboinicus</i> pelos meses, com a precipitação, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.	156
Figura 39. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de <i>P. amboinicus</i> pelos meses, com a precipitação, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de CE ₅₀ encontrado.	157

Tabelas

Tabela 1. Tipos de radicais livres e seus tempos de meia vida.....	40
Tabela 2. Exemplos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.	45
Tabela 3. Mecanismos de ação de antioxidantes.....	46
Tabela 4. Lista de filtros solares permitidos no Brasil.	50
Tabela 5. Estudos de fotoproteção com produtos naturais.	54
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos usados para análise do extrato de <i>P.amboinicus</i>	68
Tabela 7. Parâmetros alterados para a comprovação da robustez do método desenvolvido.	74
Tabela 8. Ponderação empregada no cálculo de FPS <i>in vitro</i>	78
Tabela 9. Quantidade de extrato obtida em cada mês do ano.	79
Tabela 10. Compostos identificados tentativamente de <i>P. amboinicus</i> por CLAE-IES-EM ⁿ no extrato de <i>P. amboinicus</i>	84

Equações

Equação 1. Fórmula para o cálculo do desvio padrão relativo.	71
Equação 2. Fórmula para o cálculo da exatidão.	72
Equação 3. Fórmula para o cálculo do limite de detecção.	73
Equação 4. Fórmula para o cálculo do limite de quantificação.....	74
Equação 5. Fórmula para cálculo da porcentagem de redução dos radicais DPPH.	76
Equação 6. Fórmula para o FPS <i>in vitro</i>	78
Equação 7. Fórmula da atividade sequestradora de radicais.....	143
Equação 8. Fórmula para o FPS <i>in vitro</i>	144

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Ácido ascórbico
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aos	Antioxidantes
AR	Ácido rosmarínico
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração eficaz de 50%
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector com arranjo de diodo
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CMD	Concentração média determinada
DP	Desvio padrão
DPC	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DPCE	Dímeros de pirimidina ciclobutano escuros
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
DPR	Desvio padrão relativo
EAG	Equivalente de ácido gálico
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Eletronspray
ET-1	Endotelina - 1
FDA	Food and drugs administration
FEC	Fator estimulador de colônia
FPS	Fator de proteção solar
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL-12	Interleucina 12
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPE	Instituto Nacional
IUV	Índice ultravioleta
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MMP	Metaloproteinases
NOS	Óxido nítrico sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pró análise
PCA	Análise de componentes principais
PGE ₂	Prostaglandina 2
PKC	Proteína cinase C
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RDA	Retro-Diels-Alder

RDC	Resolução de diretoria colegiada
RE	Resolução
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SBD	Sociedade brasileira de dermatologia
SOD	Superóxido dismutase
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
α -MSH	Hormônio estimulatório do tipo alfa

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	19
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Família Lamiaceae	23
2.2. Gênero <i>Plectranthus</i>	28
2.3. <i>Plectranthus amboinicus</i>	30
2.4. Radiação solar	34
2.5. Radicais livres e antioxidantes	40
2.6. Fotoproteção e filtros solares	46
2.7. Produtos naturais e fotoproteção	52
2.8. Sazonalidade	58
3 - Objetivos.....	62
3.1. Objetivo geral	62
3.2. Objetivos específicos	62
4 - Metodologia	64
4.1. Coleta do material e produção do extrato etanólico bruto de <i>Plectranthus amboinicus</i>	64
4.2. Determinação do perfil químico do extrato de <i>P. amboinicus</i> por CLAE-IES-EM ⁿ	64
4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de ácido rosmarínico em <i>P. amboinicus</i>	65
4.3.1. Substância química de referência (SQR).....	65
4.3.2. Solventes	65
4.3.3. Desenvolvimento do método analítico	65
4.3.4. Validação do método analítico desenvolvido	68
4.4. Quantificação de fenólicos totais.....	75
4.5. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	75
4.6. Determinação do fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	77
4.7. Estudo de sazonalidade do extrato de <i>P. amboinicus</i>	78
4.8. Coleta do material vegetal e produção dos extratos de <i>P. amboinicus</i> ..	79
4.9. Análise estatística	80
5 - Resultados e discussão	82
5.1. Determinação do perfil químico do extrato de <i>P. amboinicus</i> por CLAE-IES-EM ⁿ	82

5.1.1. Análise dos padrões de fragmentação das flavonas presentes no extrato.....	87
5.1.2. Análise dos padrões de fragmentação dos flavanonois presentes no extrato.....	89
5.1.3. Análise dos padrões de fragmentação da flavanona presente no extrato.....	89
5.1.4. Análise dos padrões de fragmentação do flavonol presente no extrato.....	90
5.1.5. Análise dos padrões de fragmentação dos ácidos fenólicos e orgânicos.....	91
5.1.6. Análise dos padrões de fragmentação do ácido rosmarínico e outros compostos.....	93
5.1.8. Análise dos padrões de fragmentação da lignana presente no extrato.....	95
5.1.9. Análise dos padrões de fragmentação do açúcar detectado no extrato.....	95
5.2. Manuscrito intitulado “Photoprotective activity of <i>Plectranthus amboinicus</i> extracts and HPLC quantification of rosmarinic acid” publicado em 2020 pela Revista Brasileira de Farmacognosia.....	97
5.3. Manuscrito intitulado “Seasonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species” publicado em 2021 pela Revista Pharmaceutics.....	134
6 - Conclusão.....	175
7 - Referências.....	178
8 – Apêndice A	199
9 – Apêndice B	206

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta emitida pelo sol pode ser dividida em UVC (100 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) e UVA (320 – 400 nm). Porém, devido à presença da camada de ozônio localizada na estratosfera, os raios UVC são absorvidos e, apenas os raios UVB (que são atenuados) e UVA atingem o solo terrestre. Quando existe a exposição prolongada a esses dois tipos de radiação, efeitos agudos e crônicos podem ser observados na pele, nos olhos e no sistema imunológico. Como efeitos agudos, têm-se as queimaduras e o bronzeamento cutâneo e, como efeitos crônicos, essa exposição pode induzir alterações celulares, degenerativas, envelhecimento acelerado e câncer de pele (PASSERON et al., 2019).

No Brasil e no mundo, o tipo de câncer mais frequente encontrado é o de pele, onde no nosso país ele corresponde a um total 27% de todos os tumores malignos registrados, como reporta o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2020. Segundo o Instituto, durante os anos de 2020 a 2022 são esperados para 83.770 casos em homens e 93.170 casos de câncer de pele em mulheres, por ano. As regiões Norte e Nordeste ocupam o segundo lugar no surgimento de novos casos. Entre os dois tipos de câncer de pele, o não melanoma, embora apresente baixa mortalidade, tem maior frequência e é responsável por 177 mil novos casos por ano e, o melanoma, é o tipo mais agressivo, porém menos frequente, tem uma taxa de 8,4 mil novos casos por ano. Esses dois tipos de câncer podem apresentar a mesma origem, vinda da exposição excessiva ao sol e pessoas com tons de pele mais claros ou com histórico na família estão mais susceptíveis ao seu desenvolvimento (BRASIL, 2020).

Dessa forma, é necessária a utilização de medidas preventivas para a proteção solar, evitando os danos da exposição excessiva. Exemplos de medidas preventivas são o uso de roupas próprias para proteção solar, óculos de sol adequados, protetor solar via oral e via tópica, onde os protetores de via tópica podem apresentar filtros químicos e/ou físicos, somados a compostos que tenham atividade antioxidante (WANG; LIM, 2016).

Dentro desse contexto, a incorporação de extratos vegetais com estas características em formulações fitocosméticas, pode resultar em produtos com atividade fotoprotetora e capacidade de neutralizar os radicais livres produzidos na pele após exposição ao sol, responsável por alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce, com alto valor agregado (BATISTA et al., 2018; TOMAZELLI et al., 2018)

Sendo assim, a busca por produtos com maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional as propriedades intrínsecas dos metabólitos da biodiversidade brasileira é uma das tendências do mercado e da Ciência Cosmética. Esta é vista, com muito interesse pelo mercado internacional, principalmente se a matéria-prima apresenta estudos científicos comprovando a segurança e atividade, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (FACCIO, 2020; NUNES et al., 2018; THIBANE et al., 2019; TOMAZELLI et al., 2018).

Muitas formulações contendo filtros químicos não proporcionam proteção total, principalmente quando são considerados efeitos crônicos como: fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (GALANAKIS; TSATALAS; GALANAKIS, 2018). Assim, extratos vegetais ricos em constituintes fenólicos, como flavonoides, vêm sendo empregados em formulações fotoprotetoras associadas aos filtros UV. Uma vez que, comprovada sua capacidade de absorver a radiação solar e antioxidante podem intensificar a proteção final do produto (EL AANACHI et al., 2020; FACCIO, 2020).

Dessa forma, considerando a importância medicinal do gênero *Plenctranthus*, que apresenta espécies contempladas até na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), essa tese teve o intuito de determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante de *Plectranthus amboinicus*, conhecida popularmente, como “hortelã da folha grossa” e que possui ação contra doenças do trato respiratório, gastrointestinal, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (ARUMUGAM; SWAMY; SINNIHA, 2016; GURGEL et al., 2009a; OLSZEWSKA; GEÇDAS; SIMÕES, 2020; YULIANTO et al., 2017). Além de realizar o estudo

sazonal dessa espécie, averiguando como isso poderia interferir tanto na sua atividade fotoprotetora quanto antioxidante.

Fundamentação teórica

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Família Lamiaceae

A família Lamiaceae ou Labiatae é a sexta maior família de vegetais existentes, apresentando mais de 200 gêneros e 7000 espécies (BRIDI et al., 2020; BEKUT et al., 2018; LI et al., 2016). Essa família é próxima da família Verbenaceae e por isso muito se discute sobre os gêneros pertencentes às duas famílias, dessa forma, cerca de 50 gêneros já foram transferidos de Verbenaceae para Lamiaceae (LI et al., 2016; LAWRENCE, 2007). Esta mesma família, atualmente, possui 12 subfamílias, sendo elas: Ajugoideae, Callicarpoideae, Cymaroideae, Lamioideae, Nepetoideae, Peronematoideae, Premnoideae, Prostantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae, Tectonoideae, and Viticoideae (FREZZA et al., 2019).

Suas espécies podem ser encontradas em todo mundo, dando a essa família uma distribuição cosmopolita (Figura 1), embora seu local típico de desenvolvimento seja em climas tropicais e temperados (FREZZA et al., 2019). No Brasil, existem 46 gêneros e 524 espécies que se distribuem por todo o país e se apresentam nas formas de arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira e subarbusto (HARLEY et al., 2015).

Figura 1. Mapa da distribuição mundial de espécies da família Lamiaceae.



(Fonte: <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000291&tab=maps>)

A maioria das plantas dessa família é aromática e ela tem uma grande variedade de espécies importantes para o ser humano nas mais diversas áreas, como por exemplo, na culinária, já que várias delas são espécies hortícolas bastante utilizadas, são importantes também na área da saúde e indústria de cosméticos. Muitas dessas plantas são utilizadas pela medicina popular em todo o mundo há longos anos, devido aos efeitos terapêuticos de muitas delas (LEE et al., 2011; SKENDI; IRAKLI; CHATZOPOULOU, 2017; VENKATESHAPPA; SREENATH, 2013) sendo bastante conhecidas principalmente por suas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias já comprovadas, mostrando sua importância na área da saúde (BEKUT et al., 2018; TRIVELLINI et al., 2016).

A importância dessa família na área da saúde é tamanha que muitas espécies são incorporadas inclusive na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), por possuírem atividades biológicas muito relevantes, como antimicrobiana e anti-inflamatória já citada acima, mas também hipoglicemiante, antihipertensiva e atividade hepatoprotetora que é o caso da espécie *Ocimum gratissimum*, que apresenta monografia extensa ao seu respeito e sobre sua utilização. Outras espécies como *Mentha pulegium* e outras espécies do gênero *Mentha*, *Plectranthus barbatus*, *Lamium album* entre outras, também estão presentes na lista, mostrando o poder terapêutico da família (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em suas utilizações como nutracêuticas, muitas são usadas na forma de chás, decocções, cervejas e os próprios vegetais crus, as quais em sua maioria pertencem à subfamília Nepetoideae. Os usos dessas plantas para esse fim são os mais diversos, como por exemplo, tempero, na preparação de bebidas, como aditivo no chá mate, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, antimicrobianas, infecções respiratórias, calmantes, antioxidantes, aromatizantes, etc (FREZZA et al., 2019).

Na indústria de cosméticos, a família Lamiaceae se destaca sendo a principal fonte natural de produtos de cuidados com a pele, ativos antienvhecimento, anticelulite, antissépticos e anti-inflamatórios, entre outras inúmeras funções, devido à presença de polifenóis, terpenos e ácidos orgânicos. Várias espécies dessa família são usadas em formulações fotoprotetoras, como

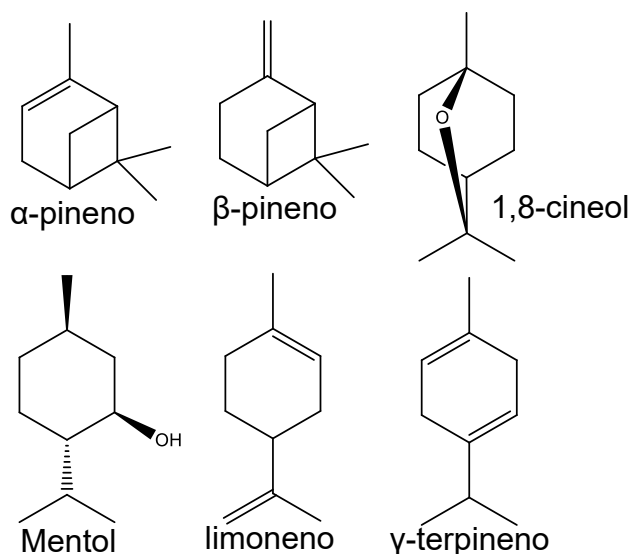
por exemplo, as raízes de *Coleus forskohlii*, que tem seu perfil químico alterado pela incidência de radiação UV e fornece um extrato rico em antioxidantes (flavonoides e fenólicos). Outras espécies como *Collinsonia canadenses*, *Lavendula angustifolia*, *Marrubium vulgare* e *Thymus vulgaris* também apresentam atividade fotoprotetora e são usadas como cosmeceuticos na indústria (CHARLES DORNI et al., 2017; LEE et al., 2011).

Fitoquimicamente, essa família é complexa, porque existem muitos grupos de espécies com características químicas mais específicas, mas basicamente, ela é dividida em dois grandes grupos, espécies produtoras principalmente de óleos essenciais e espécies produtoras de outros metabólitos não voláteis e que produzem quantidades mínimas de óleos essenciais (BRAMLEY; FOREST; DE KOK, 2009).

Dentro desse contexto, a família Lamiaceae é muito conhecida por seus óleos essenciais que economicamente movimentam as indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e até a agricultura como forma de controle de pragas ou doenças causadas por micro-organismos e helmintos, devido às suas propriedades antimicrobianas e inseticidas já conhecidas (LIMA; CARDOSO, 2007). Além disso, vários estudos também mostram suas atividades anti-inflamatórias, antitumorais (LUO et al., 2019) e antivirais (BEKUT et al., 2018).

Os óleos essenciais de Lamiaceae são caracterizados principalmente pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos voláteis. Os principais monoterpenos encontrados são: α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, mentol, limoneno, e γ -terpineno (Figura 2) (CAROVIĆ-STANKO et al., 2010; HUSSAIN et al., 2011; LONGARAY DELAMARE et al., 2007). Além disso, eles também são compostos por ácidos graxos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000; ESTÉVEZ et al., 2007; TAARIT et al., 2010).

Figura 2. Principais monoterpênos encontrados nos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae.



(Fonte: FREZZA et al., 2019)

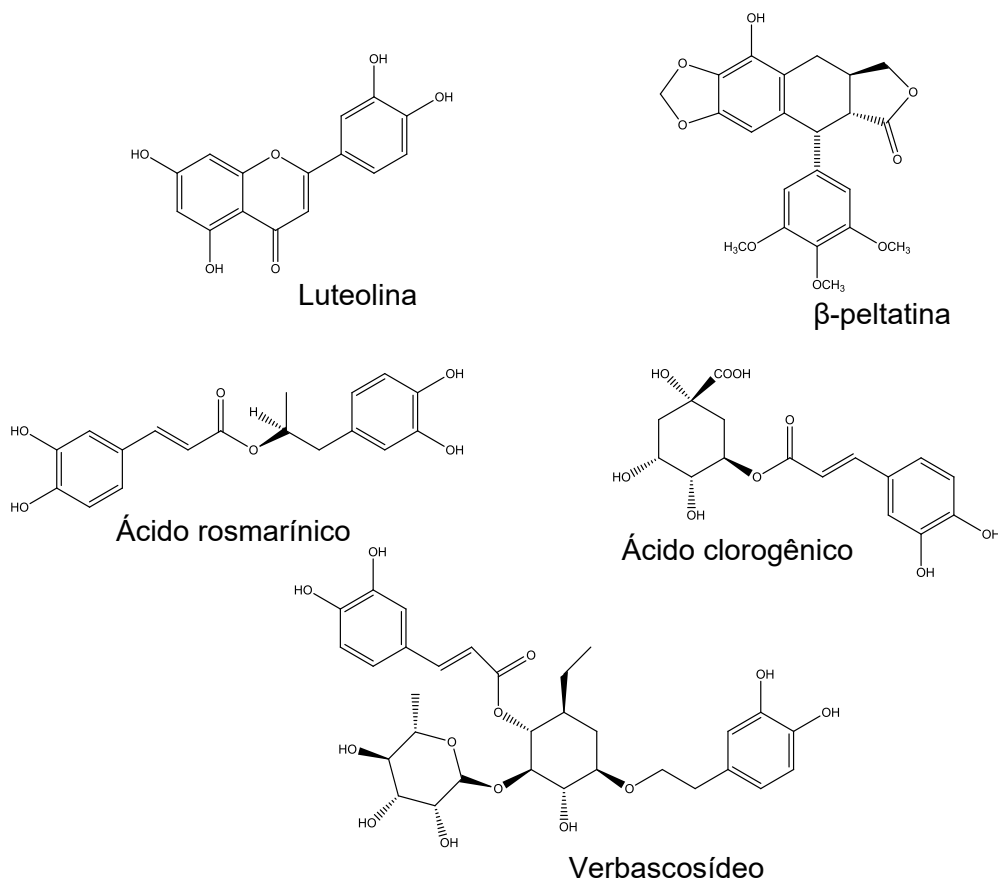
Muitos desses óleos também apresentam propriedades antioxidantes pela presença dos isômeros timol e carvacrol que são monoterpênos fenólicos e juntos aos outros componentes dos óleos, conferem a eles essa atividade. É importante destacar que quando testados separadamente, esses dois compostos apresentaram baixa atividade antioxidante, mostrando que o sinergismo com outras substâncias como os fenilpropanoides presentes e que também têm propriedades antioxidantes é importante para a atividade final (LIMA; CARDOSO, 2007).

Em Lamiaceae, além de óleos essenciais constituídos principalmente de terpenos voláteis, existem também terpenos não voláteis, como é o caso dos triterpenos e diterpenos, especialmente labdanos e abietanos (PETROVIĆ; STOJKOVIĆ; SOKOVIĆ, 2019; ZHOU et al., 2019).

Além disso, a família Lamiaceae também é conhecida quimicamente pela grande presença de compostos fenólicos em suas espécies, conferindo a elas, importantes propriedades principalmente antioxidantes (SKENDI; IRAKLI; CHATZOPOULOU, 2017), que contribuem na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce, entre outras (FUJIMOTO et al., 2010). As principais classes de polifenóis encontradas são: flavonoides, lignanas, ácidos fenólicos, ácidos clorogênicos e glicosídeos feniletanoides

(Figura 3) (AHN; ALFORD; NIEMEYER, 2020; DAVID et al., 2001; FREZZA et al., 2019; RAHIMMALEK et al., 2020; SIK et al., 2020).

Figura 3. Exemplos de polifenóis encontrados na família Lamiaceae.



(Fonte: PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Os polifenóis são também agentes muito importantes contra a radiação solar (LIM; ARELLANO-MENDOZA; STENGEL, 2017; RABINOVICH; KAZLOUSKAYA, 2018) e o estudo de extratos ricos neles tornam-se importantes alternativas para a produção de formulações fotoprotetoras seguras e eficazes, já tendo sido mencionado em parágrafos anteriores várias espécies da família Lamiaceae que são utilizadas para este fim em formulações cosméticas, mostrando sua importante contribuição nesta área industrial.

2.2. Gênero *Plectranthus*

Plectranthus é um dos maiores gêneros pertencentes à família Lamiaceae e inicialmente muitas de suas espécies estavam classificadas no gênero *Coleus*, porém após avaliações botânicas, *Coleus* foi classificado como *Plectranthus*, fato que também ocorreu com outros gêneros menores, como é o caso do gênero *Solenostemon*, ainda assim, a classificação de uma espécie dentro do gênero *Plectranthus* se torna difícil, pois certas características morfológicas específicas não são muito claras (GRAYER et al., 2010).

Esse gênero possui cerca de 300 espécies, que são principalmente encontradas na África, Ásia e Austrália (CAMELO et al., 2019; TSOPMEJIO et al., 2019; CRETTON et al., 2018) e se apresentam nas formas de ervas e subarbustos (PATON et al., 2019). No Brasil, são encontradas 4 espécies, principalmente na Bahia, Minas Gerais e São Paulo (ANTAR, 2020). Popularmente, muitas espécies desse gênero são utilizadas na culinária, mas também para o tratamento de resfriados, desordens gastrintestinais e respiratórias, infecções de pele, cura de feridas, além de serem usadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias (CRETTON et al., 2018; MAREE et al., 2014; TSOPMEJIO et al., 2019). A espécie mais utilizada desse gênero, *P. barbatus*, por exemplo, é empregada na medicina popular para tratar desordens digestivas, hepáticas e do sistema nervoso central (BRITO et al., 2018).

Cientificamente, vários estudos *in vitro* demonstram suas atividades antimicrobianas (MOTHANA et al., 2019; MAREE et al., 2014) antioxidantes (TSOPMEJIO et al., 2019; BRITO et al., 2018), anti-inflamatórias (CRETTON et al., 2018; NAPAGODA et al., 2016), antitumorais moderada (CAMELO et al., 2019; MATIAS et al., 2019), inibidores da enzima acetilcolinesterase (BRITO et al., 2018) e até no reparo e na regeneração cutânea (ALKAFIFY et al., 2014).

Fitoquimicamente, espécies desse gênero são geralmente plantas aromáticas, produtoras de óleos essenciais, ricos em terpenos com grande potencial bioativo. A exemplo disso, têm-se a espécie *P. madagascariensis*, a qual produz um óleo com altas concentrações do diterpeno 6 α ,7 β -dehidroroileanona, que já foi caracterizado como um potente antioxidante. Na

espécie *P. neochilus* foram observadas as atividades antimicrobianas e antiesquistossomal de seu óleo essencial que demonstrou maior predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpenos como o β -cariofileno (GARCIA et al., 2019). Este composto também é um dos principais metabólitos encontrados em óleos de outras espécies desse gênero, como: *P. tenuiflorus*, *P. incanus*, *P. fruticosus*, *P. rugosus* e *P. coleoides*, e é o principal responsável pela utilização dessas espécies para o tratamento de dores estomacais (BANDEIRA et al., 2011).

O eugenol foi visto como principal componente do óleo essencial tanto de *P. ornatos* quanto de *P. barbatus*, onde foi visto que o efeito sinérgico dos seus respectivos óleos com aminoglicosídeos foi capaz de inibir o crescimento de uma série de espécies bacterianas patogênicas, mostrando-se como alternativas eficazes para o problema da resistência bacteriana aos antibióticos (GALVÃO RODRIGUES et al., 2013). Dessa forma, é possível observar a importante contribuição dos óleos essenciais desse gênero.

Plectranthus apresenta como principais metabólitos secundários não voláteis diterpenos abietanos e labdanos, onde muitas de suas atividades biológicas são atribuídas à presença de tais compostos, além da presença também de compostos fenólicos (GARCIA et al., 2019; CRETTON et al., 2018).

Os polifenóis também estão presentes em grande quantidade nesse gênero, conferindo às suas espécies atividades biológicas principalmente antioxidantes, como foi visto em um estudo feito por Porfírio et al., 2010 que demonstrou a atividade antioxidante *in vitro* do chá de *P. barbatus* mesmo após o processo de metabolismo gastrointestinal, principalmente devido ao ácido rosmarínico presente como majoritário nesse extrato, mas também pela presença de outros compostos fenólicos como: acacetina 7-O-glucuronídeo, apigenina 7-O-glucuronídeo, luteolina 7-O-glucuronídeo.

Em outro estudo feito por Ji et al., 2019, foi visto que os extratos etanólicos das folhas e caules de *Plectranthus hadiensis* var. *tomentosus* apresentaram altos teores de fenólicos totais e flavonoides, sendo isolados: luteolina 7-O-glucuronídeo, chrisosplenol D, quercetina 3,7-dimetil éter, casticina, ayanina e ácido rosmarínico, o que proporcionou a esses extratos potentes atividades

antioxidantes de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e sequestradora de radicais livres. Assim, pode-se observar a importância desse gênero do ponto de vista terapêutico, pois hoje em dia sabe-se que muitas doenças causam ou são impulsionadas pelo estresse oxidativo e a atividade antioxidante vem se mostrando bastante necessária contra cânceres, viroses, doenças cardiovasculares, neurológicas, etc (LI et al., 2020).

Já no estudo feito por Kubínová et al., 2019, com as partes aéreas de *Plectranthus scutellarioides* foram isolados 5 polifenóis, sendo eles: apigenina 7-O-(3"-O-acetil)- β -D-glucuronídeo, apigenina 5-O-(3"-O-acetil)- β -D-glucuronídeo, ácido cafeico, luteolina 5-O- β -D-glucosídeo e ácido rosmarínico, onde foi visto que as apigeninas demonstraram uma atividade butirilcolinesterase melhor até que o padrão utilizado.

Além de antioxidantes, compostos fenólicos podem atuar como fotoprotetores e são a principal classe de metabólitos secundários para este fim, e alguns estudos com o gênero *Plectranthus* mostram esse potencial entre suas espécies, como foi o caso do estudo feito por Napagoda et al., 2014, onde foi observado que a espécie *P. zeylanicus* apresentou um fator de proteção solar de 11 sem adição de nenhum filtro químico, o que é bastante relevante já que a grande maioria das espécies vegetais não atingem esses valores. Outros estudos com a espécie *Coleus forskohlii* (*P. barbatus*) têm se mostrado bastante promissores, pois demonstraram que a suplementação de radiação UVB nessa espécie causa um aumento na produção de metabólitos provenientes da via biossintética dos fenilpropanoides (BURGER; EDWARDS, 1996; TAKSHAK; AGRAWAL, 2015; TAKSHAK; BHUSHAN AGRAWAL, 2018).

2.3. *Plectranthus amboinicus*

P. amboinicus é pertencente à família Lamiaceae e tem como sinônimos *P. aromaticus*, *Coleus aromaticus* e *C. amboinicus*. Essa espécie não tem uma origem muito bem definida, embora provavelmente tenha vindo da África e Índia, sendo hoje cultivada em todas as regiões tropicais do planeta. Botanicamente, ela é definida como um arbusto suculento e muito aromático, que pode chegar

até 1 m de altura e ainda mais de largura; possui caules carnudos que crescem de 30 a 90 cm, com pelos longos e rígidos ou tomentosos; suas folhas são indivisas, geralmente ovadas a suborbiculares com uma ponta afunilada e muito grossas, pubescentes; as flores têm um cálice em forma de sino e a garganta é lisa por dentro com dois lábios; corola arroxeadada pálida e cinco vezes mais longa que o cálice, com tubo curto, garganta inflada e lábios curtos (Figura 4) (ARUMUGAM; SWAMY; SINNIHA, 2016).

Figura 4. Imagem da espécie *Plectranthus amboinicus*.



(Fonte: TERTO, 2018)

No Brasil, ela é popularmente conhecida como “hortelã da folha grossa”, “hortelã da folha graúda” e “malvariço” (GURGEL, 2007; GURGEL et al., 2009a; NOGUEIRA; DINIZ; LIMA, 2008). Todavia, como essa espécie é cultivada em vários outros países, também recebe outros nomes populares, por exemplo, na Índia, ela é chamada de “indian borage” (MURTHY; RAMALAKSHMI; SRINIVAS, 2009; OLSZEWSKA; GEDAS; SIMÕES, 2020; SHUBHA; BHATT, 2015) e na indonésia ela é conhecida como “torbangun” (YULIANTO et al., 2017).

Assim como vários membros da família Lamiaceae, essa espécie é utilizada popularmente para diversos fins, entre eles, na culinária como aromatizante, devido aos seus óleos essenciais, bem como também é incorporada no preparo de vários pratos e suas folhas são até comidas cruas (CHEN et al., 2014; SHUBHA; BHATT, 2015; ZHANG et al., 2017).

Na medicina popular, ela é bastante utilizada para o tratamento de resfriados, tosse, asma (doenças do trato respiratório), dores de cabeça, constipação, febre, doenças de pele e várias desordens gastrintestinais (HSU;

HO, 2019; MANJAMALAI; ALEXANDER; BERLIN GRACE, 2012; SHUBHA; BHATT, 2015).

Dessa forma, por ser uma espécie bastante conhecida e utilizada pela população, existem muitos estudos científicos na literatura para tentar provar o que é visto na etnofarmacologia. Através deles, é visto principalmente que o extrato das partes aéreas da planta tem atividade antimicrobiana e antiviral *in vitro* (GURGEL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2006). É visto também que *P. amboinicus* apresenta realmente efeitos positivos para o tratamento de desordens respiratórias e gastrintestinais, além de atividade anticonvulsivante *in vivo*, antitumoral *in vivo* e *in vitro* (YULIANTO et al., 2017; GURGEL et al., 2009a), anti-inflamatória e analgésica, cura de feridas e doenças de pele e várias outras (ARUMUGAM; SWAMY; SINNIHA, 2016; OLSZEWSKA; GEÇDAS; SIMÕES, 2020; SWAMY et al., 2017). Além disso, sua atividade antioxidante tem sido relatada em vários estudos e, essa atividade somada às outras, como antibacteriana, antiproliferativa (no caso de câncer) e até antiplaquetária, mostra que ela tem potencial para ser utilizada até com nutracêutica (BHATT et al., 2013; KUMAR; SINGH; KUMAR, 2020; MANURUNG et al., 2020; NGUYEN et al., 2020).

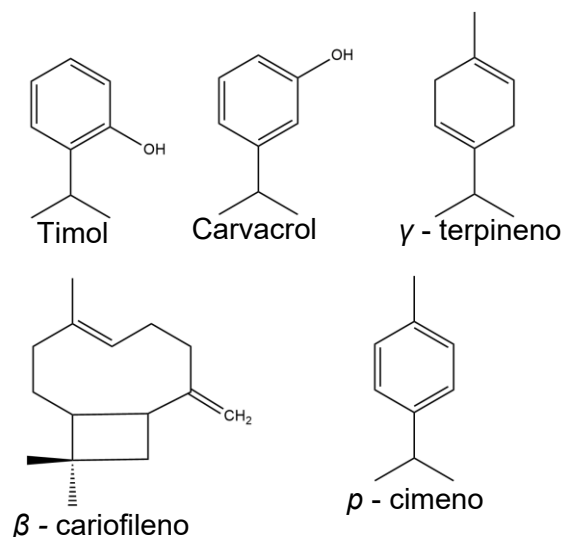
P. amboinicus já foi incluída inclusive em um fitoterápico em associação com mais duas espécies, *Schinus terebinthifolius* e *Eucalyptus globulus* e vem sendo utilizado há mais de 100 anos principalmente nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará para o tratamento de várias infecções do trato respiratório, úlceras, furúnculos, varicosas, acne, entre outros (PAULO et al., 2009).

Além disso, outros estudos vêm sendo feitos, como por exemplo, desenvolvimento de nanopartículas provenientes de *P. amboinicus*, como o estudo feito por Vijayakumar et al., 2015 que através da síntese de nanopartículas de óxido de zinco a partir do extrato das folhas de *P. amboinicus*, demonstrou sua atividade antimicrobiana eficaz no controle da formação de biofilmes de *S. aureus* resistente à meticilina e larvas de mosquito, danificando células do intestino médio desses insetos. Nanopartículas de prata também já foram sintetizadas a partir do extrato das folhas de *P. amboinicus* e

demonstraram potente efeito antimicrobiano contra *E. coli* e *Penicillium spp* (AJITHA; ASHOK KUMAR REDDY; SREEDHARA REDDY, 2014).

Todo esse potencial terapêutico pode ser justificado pela presença de classes de metabólitos secundários bastante importantes nessa planta, principalmente terpenos, polifenóis e seus derivados glicosilados (KAMRA et al., 2019). Seu óleo essencial é bastante utilizado e estudado, sendo visto que os principais componentes presentes são: carvacrol (50%), timol (18%), γ -terpineno (13%), β -cariofileno (11,3%) e *p*-cimeno (7,8%) (HSU; HO, 2019) Figura 5, porém mais de 70 compostos já foram identificados nessa espécie (EL-HAWARY et al., 2013).

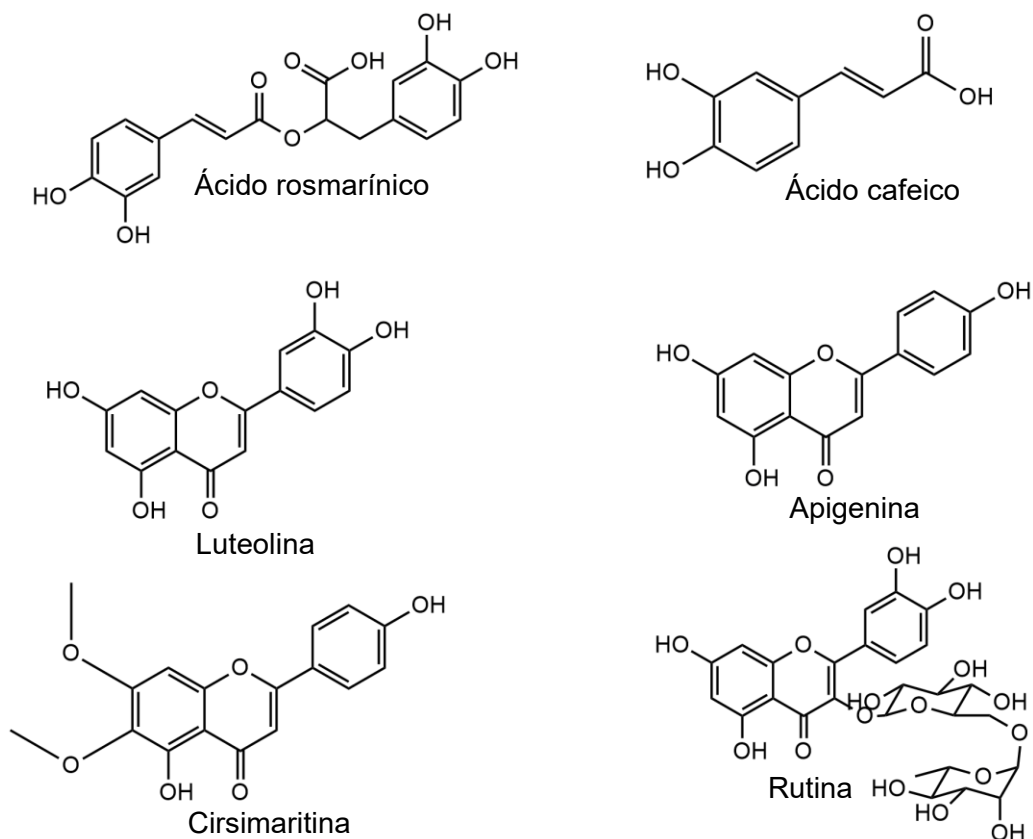
Figura 5. Principais compostos químicos encontrados nos óleos essenciais de *P. amboinicus*.



(Fonte: HSU; HO, 2019)

Já os polifenóis, estão representados pela presença principalmente de ácidos fenólicos e flavonoides, como: ácido quínico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido cafeoilquínico, galocatequina, ácido elágico, vicenina 1, ácido sinápico hexosídeo e ácido salicílico-glicosídeo (SULAIMAN; DEEPAK; BALACHANDRAN, 2018), ácido rosmarínico, rutina, quercetina, ácido gálico, ácido *p*-cumárico (BHATT et al., 2013), luteolina (JANAKIRAMAN; SOMASUNDARAM, 2017), apigenina (SILITONGA et al., 2014), cirsimaritina, eriodictiol (MANURUNG et al., 2020) Figura 6, entre vários outros.

Figura 6. Compostos fenólicos encontrados em *P. amboinicus*.



(Fonte: JANAKIRAMAN; SOMASUNDARAM, 2017; MANURUNG et al., 2020; SHUBHA; BHATT, 2015; SILITONGA et al., 2014)

Assim, tendo em vista todas as propriedades terapêuticas e sua rica composição química, *P. amboinicus* é uma espécie que merece atenção, principalmente naquelas áreas nas quais ela ainda não é bem explorada, como no caso da fotoproteção, já que membros do mesmo gênero demonstram atividades promissoras nessa área, como é o caso de *Coleus forskohlii* já descrito.

2.4. Radiação solar

O sol é uma grande fonte de energia que torna possível a vida na Terra. É o Centro de várias reações termonucleares, está a 149 milhões de km e o tempo que a Luz leva para percorrer a distância entre o sol e a Terra é de 8 minutos e uns 20 segundos. Ele emite um amplo espectro de radiação

eletromagnética que é desviado ou atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra. As radiações que chegam à superfície e atingem o solo são classificadas como não-ionizantes e subdivididas em infravermelho (~50%), visível (~40%) e ultravioleta (UV) (~10%) (EDDY; NASA, 2009).

Os efeitos da radiação solar em humanos podem ter um impacto significativo na saúde, pois embora ela tenha efeitos benéficos à saúde, como a produção de vitamina D e atenuação de algumas doenças como a psoríase e depressão, ela causa queimaduras, fotossensibilidade, fotodermatoses, imunossupressão, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese que são alguns dos efeitos adversos mais importantes (EDDY; NASA, 2009; GARNACHO SAUCEDO; SALIDO VALLEJO; MORENO GIMÉNEZ, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no mundo e a incidência de melanoma está aumentando mais rapidamente do que a incidência de qualquer outro tipo de tumor maligno. Sendo fundamental o entendimento das radiações emitidas pelo sol (OMS, 2017).

Entre as radiações presentes na luz solar, tem-se a radiação ultravioleta (UV) que é subdividida em três partes, UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm), que penetram de formas distintas, em diferentes intensidades na superfície terrestre. Isso acontece devido à presença da camada de ozônio presente na estratosfera que impede completamente a entrada dos raios UVC que são os mais energéticos dos três e tem ação germicida. Assim, a maior parte dos raios UV que atingem o solo terrestre são os UVB (5%) e UVA (95%), embora os raios UVB ainda sejam atenuados pela camada de ozônio, o que não acontece com a radiação UVA (SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017).

A radiação UV penetra nas camadas cutâneas, atingindo diversos cromóforos na pele que a absorve, são eles: melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano, ácido urônico, entre outros. Uma das principais moléculas que sofre com os danos da radiação UV, é o DNA, que pode sofrer mutações malignas, levando ao câncer. Essa interação entre moléculas com grupos cromóforos e a radiação solar desencadeia o

surgimento de reações fotoquímicas diferentes e interações secundárias, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, causando danos ao tecido, principalmente quando há exposição prolongada ao sol (BALOGH et al., 2011; MARIONNET et al., 2018). Os dois tipos de radiação produzem danos biológicos distintos, porém eles apresentam em comum a capacidade de elevar o risco da presença de carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma e, produzir espécies reativas de oxigênio, embora a UVA seja mais eficiente neste ponto (SKLAR et al., 2013).

A radiação UV também é capaz de ativar o sistema imune, que responde por meio da promoção de processos inflamatórios, que vão desde a ativação de células como os queratinócitos, levando posteriormente à produção de melanina para proteção da pele, bem como de outras células, induzindo a produção de moléculas sinalizadoras de resposta inflamatória como citocinas e prostaglandinas (PRASAD; KATIYAR, 2013; WANG et al., 2017).

Os raios UVB são mais energéticos que os raios UVA, porém apresentam um poder de penetração menor na pele, devido ao seu comprimento de onda menor, portanto, afeta principalmente células epidérmicas, possivelmente alterando a proliferação, a diferenciação e o metabolismo dessas células. Enquanto que os raios UVA, por apresentarem um comprimento de onda maior, conseguem penetrar mais profundamente nas camadas cutâneas (cerca de 1 mm), chegando a atingir a derme. A radiação UVA pode ser ainda subdividida em UVA curto (320-340 nm) e UVA longo (340 - 400 nm) ou até mesmo UVA II e UVA I, respectivamente (SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017).

A melanina é considerada uma protetora cutânea contra a agressão da radiação UV ao DNA das células, evitando o desenvolvimento do câncer de pele. Recentemente foi descoberto, em estudos utilizando um modelo de murino, que a melanina pode contribuir para o desenvolvimento de câncer devido a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPC) mesmo após o término da exposição à radiação UVA (LIM; ARELLANO-MENDOZA; STENGEL, 2017; YEAGER; LIM, 2019).

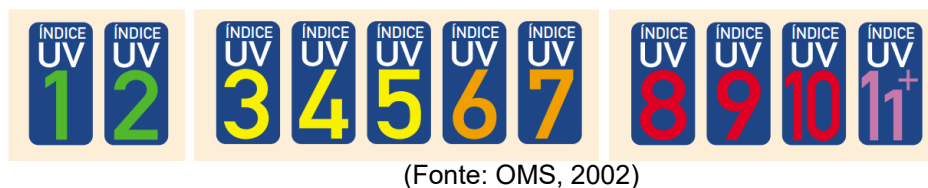
É visto que a ação da radiação UVA aumentando a formação de radicais livres nesse meio biológico, entre eles o superóxido e óxido nítrico, causa tanto a degradação da melanina quanto a excitação dos derivados formados. Horas após a exposição à radiação UVA, pode ocorrer transferência de energia desses derivados de melanina para o DNA, gerando os DPC mutagênicos. Como eles foram gerados horas após a exposição, eles são chamados de dímeros de pirimidina ciclobutano escuros ou atrasados (DPCE). Também foi demonstrando que pode existir uma relação com o fototipo da pele, onde indivíduos de pele clara que tem predominância do pigmento feomelanina apresentam uma predisposição a formar mais DPCE em detrimento a fototipos de pele mais altos, já que eles apresentam como pigmento em maior percentual a eumelanina (DELINASIOS et al., 2018; MOURET et al., 2011; PREMI et al., 2015). Esse tipo de radiação não é filtrado por vidro, é praticamente constante do ao amanhecer ao entardecer e dificilmente é afetado pela altitude ou pelas condições meteorológicas (GARNACHO SAUCEDO; SALIDO VALLEJO; MORENO GIMÉNEZ, 2020).

A radiação UVB é responsável pelas queimaduras solares, eritemas, ensolação, imunossupressão e câncer, pois danifica diretamente o DNA através da formação de fotoprodutos de 6-4 ciclobutano pirimidina (CPDs) e pirimidina (6-4) pirimidona (BEANI, 2014; BÉRUBÉ et al., 2018). Além disso, ela pode formar também outros fotoprodutos de DNA estimuladores da enzima limitante (tirosinase) da formação de melanina, sendo os principais: endotelina-1 (ET-1) e hormônio estimulatório do melanócito tipo α (α -MSH). Os raios UVB têm a capacidade de atacar os queratinócitos superficiais que liberam os fotoprodutos citados anteriormente e, sendo o melanócito uma célula com muitos receptores (ex: receptores específicos para ET-1 e α -MSH), ela consegue interagir de forma bastante ativa com o meio biológico, favorecendo uma resposta rápida de produção de melanina para posterior proteção dos queratinócitos atacados pela radiação UV, que pode levar a formação de manchas (HYTER et al., 2013; MOORE et al., 2013; TAGASHIRA et al., 2015). Outra ação da radiação UVB é a indução de um processo inflamatório na pele através de uma maior liberação de prostaglandina E2 (PGE₂) (FULLER, 2019; KABASHIMA et al., 2007) e fator estimulador de colônia (FEC) (QUIST et al., 2016; YOSHIZUMI et al., 2008).

Esse tipo de radiação é filtrado por vidro, tem um pico de intensidade máximo ao meio dia, embora tenha intensidade relevante de dez da manhã às quatro da tarde e, é afetado pela altitude ou pelas condições meteorológicas (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

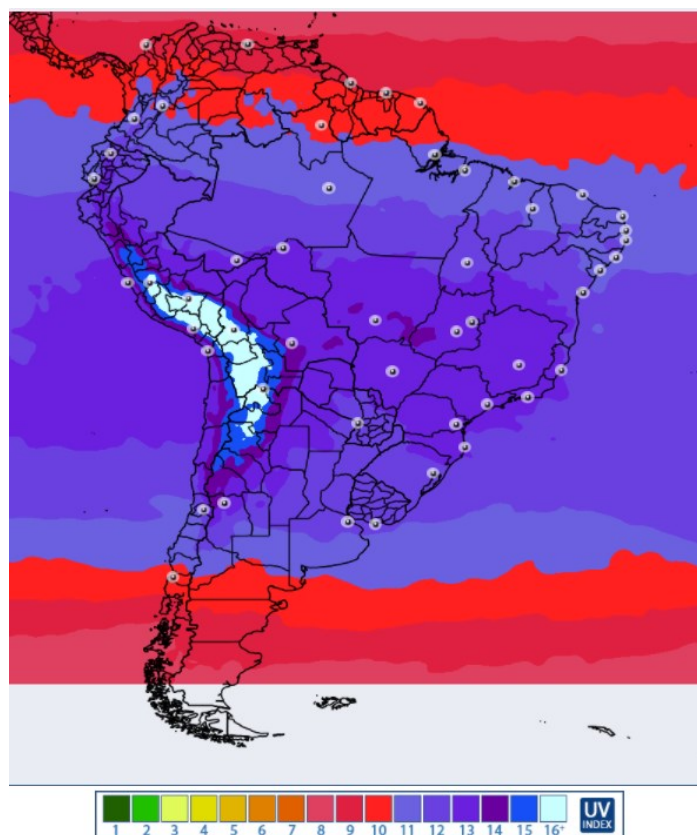
A intensidade da radiação ultravioleta pode ser medida através do índice ultravioleta (IUV) e representa o valor máximo diário (ao meio dia) da radiação UV. Ele é apresentado para uma condição de céu claro, já que as condições meteorológicas podem influenciar. Assim, a escala do IUV classifica a intensidade da radiação de baixa até extrema, sendo dada em números inteiros começando do 1 e indo até valores maiores que 11, que já considerado extremo (SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017; SCHALKA et al., 2014), Figura 7.

Figura 7. Índice ultravioleta.



No Brasil, os níveis de radiação ultravioleta em condição de céu claro apresentam durante todo período do ano muito elevado em quase todo o território brasileiro Figura 8, devido a fatores geográficos e meteorológicos, sendo a região Norte e Nordeste as que apresentam maiores doses cumulativas dessa exposição, variando pouco durante todo o ano. Já as regiões Sul e Sudeste, por apresentarem estações do ano mais definidas, os níveis de radiação ultravioleta apresentam grande variabilidade entre o verão e o inverno. Dessa forma, por questão de saúde pública, medidas preventivas devem ser tomadas para assegurar a proteção da pele contra os raios solares, onde a aplicação exógena de preparações dermatológicas de proteção contendo filtros solares (filtros orgânicos e/ou inorgânicos) é comumente recomendada (SCHALKA et al., 2014).

Figura 8. IUV máximo do hemisfério Sul, mostrando valores extremos de radiação UV para o Brasil.



(Fonte: INPE, 2021)

Estudos têm demonstrado que o uso de filtro solar, numa base diária pode prevenir o desenvolvimento de queratoses actínicas, carcinoma de células escamosas, melanoma e não melanoma. Além disso, há evidências sugerindo que protetores solares podem diminuir a aparência de envelhecimento prematuro e prevenir exacerbações da fotodermatoses (COHEN; GRANT, 2016; WALDMAN; GRANT-KELS, 2019; WATTS et al., 2018; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

Trabalhos científicos estão investigando, cada vez mais, o potencial dos produtos vegetais que desempenham importante papel em um grande número de processos fisiológicos, incluindo a proteção contra a radiação UV prejudicial. Os polifenóis estão entre o grupo de compostos mais promissores que podem ser explorados como agentes quimiopreventivos para uma variedade de desordens da pele, devido ao seu efeito protetor solar e, antioxidante potente, propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (CEFALI et al., 2019a;

GARNACHO SAUCEDO; SALIDO VALLEJO; MORENO GIMÉNEZ, 2020; KORAĆ; KHAMBHOLJA, 2011).

2.5. Radicais livres e antioxidantes

O processo de oxidação acontece naturalmente no organismo em decorrência do seu metabolismo, sendo a mitocôndria a principal responsável pela produção de radicais livres dentro do corpo, isso durante o processo de respiração celular, em condições fisiológicas (ŻUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018).

Esses radicais livres podem ser definidos como moléculas instáveis apresentando elétrons desemparelhados, de curto tempo de vida, em mili, micro ou nanosegundos. Eles são divididos em duas categorias centradas nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo classificadas em espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNS). Porém, existem moléculas reativas dentro dessas duas categorias que não apresentam elétrons desemparelhados, mas também são bastante reativas, Tabela 1. As espécies reativas de oxigênio mais comuns incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e radicais peroxila ($ROO^{\cdot}$), já os derivados do nitrogênio, são o óxido nítrico (NO) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Tabela 1. Tipos de radicais livres e seus tempos de meia vida

Radicais Livres	Símbolo	Tempo de meia vida
Espécies reativas de oxigênio (EROS)		
Radicais		
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6} s
hidroxil	$OH^{\cdot}$	10^{-10} s
alcoxil	$RO^{\cdot}$	10^{-6}
peroxil	$ROO^{\cdot}$	17 s
Não radicais		
	H_2O_2	Estável

Oxigênio singleto	$^1\text{O}_2$	10^{-6} s
Ozônio	O_3	s
Peróxido orgânico	ROOH	Estável
Ácido hipocloroso	HOCl	Estável (min)
Ácido hipobromoso	HOBr	Estável (min)
Espécies reativas de nitrogênio		
Radicais		
Óxido nítrico	$\text{NO}^\bullet$	Depende do meio
Dióxido de nitrogênio	$\text{NO}_2^\bullet$	s
Não radicais		
Peroxinitrito	ONOO^-	10^{-3} s
Cátion nitrosil	NO^+	s
Ânion nitroxil	NO^-	s
Trióxido de nitrogênio	N_2O_3	s
Tetraóxido de nitrogênio	N_2O_4	s
Ácido peroxinítrico	ONOOH	Razoavelmente estável
Cloreto de nitrila	NO_2Cl	s

(Fonte: PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015)

Os radicais livres apresentam importância biológica, pois são essenciais para o processo bioquímico e metabólico, já que estão envolvidos em vários processos celulares como síntese de substâncias, produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, na defesa do organismo através do sistema imunológico, entre outros. Por outro lado, seu excesso favorece efeitos prejudiciais relacionados à várias patologias como doenças cardiovasculares, câncer, envelhecimento cutâneo acelerado, doenças neurodegenerativas, etc, podendo ser o fator desencadeante ou agravante da doença (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Em condições homeostáticas, tanto a formação quanto a eliminação dessas espécies estão em constante equilíbrio, entretanto, a redução da atividade das enzimas antioxidantes e/ou o aumento da atividade das enzimas oxidantes, causa um desbalanço na produção dos radicais livres, sendo o excesso, denominado de estresse oxidativo. Assim, para se estabilizar, esse excedente de radicais afeta algumas macromoléculas de células saudáveis no meio biológico, podendo ser observada a sua ação em lipídios, já que eles

interagem com a membrana celular causando a sua peroxidação lipídica, além de causar danos às proteínas, DNA e RNA (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; NIMSE; PAL, 2015a). As macromoléculas que sofrem modificação oxidativa podem se acumular em tecidos e órgãos, o que pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais, causando a parada da função normal dos mesmos. Além disso, esses produtos oxidativos podem estimular a criação adicional de espécies reativas de oxigênio, levando a um aumento de distúrbios redox (LUSHCHAK, 2014; ŻUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018).

Os lipídios, que estão concentrados na bicamada lipídica, estão mais susceptíveis ao ataque dos radicais livres levando a formação de peróxidos lipídicos e colesterol, aldeídos e cetonas. Quando a molécula alvo for um ácido graxo insaturado, o produto formado através da sua reação com o oxigênio molecular presente é o peroxirradical, que é mais reativo. Dessa maneira, a continuação de todo esse processo, ocasiona diversas alterações biológicas, onde os produtos finais da peroxidação lipídica irão apresentar papéis distintos dependendo da concentração e condições biológicas do meio. Tais ações decorrentes desses produtos podem ser pró inflamatórias, citotóxicas ou pró apoptóticas, sendo seus efeitos ser tóxicos, mutantes e carcinogênicos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018; ŻUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018).

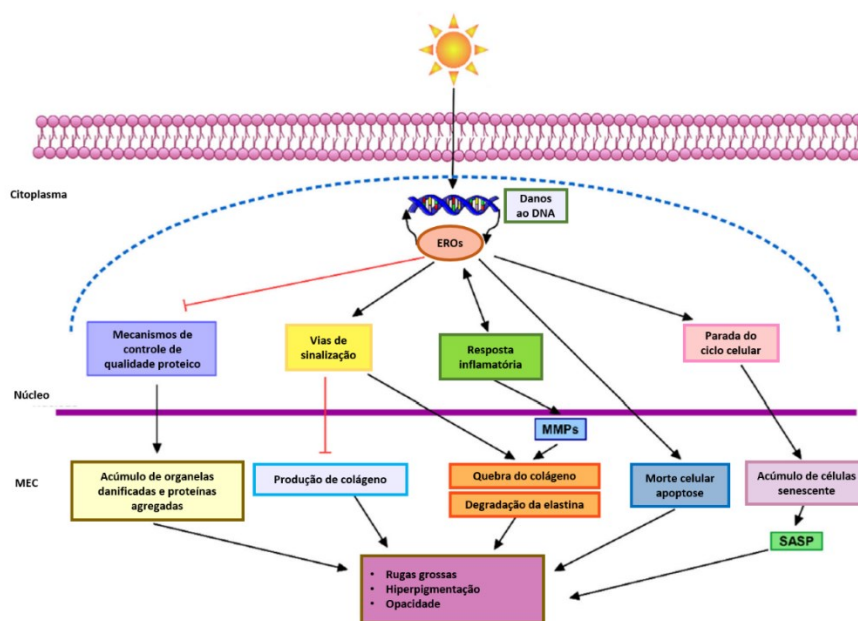
No caso das proteínas, a ação dos radicais livres leva a modificação nos resíduos de aminoácidos, ocasionando mudanças na conformação, perda de função e reticulação. Esses produtos de oxidação e derivados de carbonila de proteínas podem ser resultado das alterações sofridas nas cadeias laterais dos aminoácidos, clivagem de peptídeos mediada por oxigênio reativo, assim como produtos de oxidação de lipídios e carboidratos. Isso pode causar mudanças em canais iônicos, receptores e da fosforilação oxidativa afetando a estrutura de proteínas, como consequência da fragmentação, agregação e reticulação delas (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

Outra molécula vital para a célula e que também sofre os efeitos danosos dos radicais livres é o DNA. Eles podem causar ligações cruzadas de DNA-

proteína, danos estruturais relacionados ao complexo desoxirribose-fosfato presente no DNA, além de alterações químicas nas bases púricas e pirimídicas. Assim, os danos ao açúcar desoxirribose podem ocasionar liberação de bases ou quebras na fita de DNA, enquanto que alterações nas bases podem resultar em mutações. As espécies reativas que mais afetam a estrutura do DNA são: hidroxila radicalar, oxigênio singlete e o óxido nítrico. A hidroxila radicalar age através da produção de vários produção das quatro baseses, enquanto que o oxigênio singlete apresenta preferência na alteração da guanina. Já o óxido nítrico produz nitração, nitrosação e desaminação das bases de DNA (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Embora outros fatores externos possam causar a produção de radicais livres, um dos principais é a radiação ultravioleta e, quando isso acontece, componentes celulares são afetados direta ou indiretamente por mecanismos de fotossensibilização (Figura 9). Alguns mecanismos conhecidos envolvem a enzima catalase, a óxido nítrico sintase (NOS) e, podem causar também uma diminuição na expressão da proteína cinase C (PKC) que vai induzir ainda mais a produção de EROS. Como a luz UV é capaz de alterar o DNA e outros cromóforos, ela induz um aumento de EROS também por essa via (DE JAGER; COCKRELL; DU PLESSIS, 2017).

Figura 9. Mecanismos de ação das EROs após indução pela Radiação UV.



(CAVINATO et al., 2017)

O fotoenvelhecimento ou envelhecimento acelerado da pele é outro efeito negativo ocasionado pelo estresse oxidativo induzido pela radiação UV. Onde pode-se observar que embora tanto os raios UVB quanto UVA tenham a capacidade de promover a produção de radicais livres, é visto que é esse é o principal mecanismo pelo qual a radiação UVA causa danos à pele (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

Outra observação está na relação da taxa de mutação do DNA mitocondrial, pelo fato de que naturalmente ela já apresenta uma alta taxa de mutação devido ao contato direto com as EROS produzidas nessa própria organela, e associado a isso, estudos vem demonstrando que peles fotoexpostas apresentam alta taxa de mutação do DNA mitocondrial quando comparadas à pele fotoprottegida, o que acelera a senescência celular. O que contribui para características dermatológicas de hipertrofia cutânea, tais como rugas profundas, aplanamento da camada basal, estímulos dos melanóticos favorecendo múltiplas lesões pigmentadas, lentificação da renovação epidérmica, como também estratificação do estrato córneo (SCHALKA et al., 2014).

Dessa forma, considerando os danos que o estresse oxidativo pode ocasionar ao organismo como um todo, é necessária a existência de mecanismos que possam reduzir as concentrações de radicais livres produzidos. Assim, antioxidantes são necessários para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos causados pelos radicais livres, mantendo as células saudáveis. Eles podem ser definidos como moléculas que em menores concentrações que os substratos oxidáveis retardam ou previnem essa oxidação, implicando na redução do estresse oxidativo, nas mutações do DNA transformações malignas entre outros danos celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; PISOSCHI; POP, 2015). Eles são tidos como fortes doadores de elétrons e, durante o processo de redução, ele agora oxidado deverá ser regenerado ou substituído. Devido as suas características de ressonância ou duplas ligações conjugadas, os antioxidantes conseguem mesmo oxidados, se manterem não reativos e improvável de atacarem outras moléculas biológicas (LUSHCHAK, 2014; NIMSE; PAL, 2015a).

Eles também podem ser classificados de outras formas, uma delas é com relação à sua atividade, dessa forma eles são tidos como enzimáticos e não enzimáticos, exemplos podem ser observados Tabela 2. Os enzimáticos são produzidos pelo próprio corpo, sendo os de primeira linha de defesa, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido, como também o acúmulo de H_2O_2 através da formação de água, em um processo realizado em várias etapas, necessitando de cofatores com cobre, zinco, manganês e ferro. Dentre eles, vale destacar a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Tabela 2. Exemplos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Não-enzimáticos	Enzimáticos
α -Tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase
β -Caroteno	Catalase
Curcumina	NADPH-quinoa oxidoreductase
Flavonoides	Glutathione peroxidase
Selênio	Enzimas de reparo
Coenzima Q10	
Glutathione	
L-cisteína	
Ácido Ascórbico	

(NIMSE; PAL, 2015b)

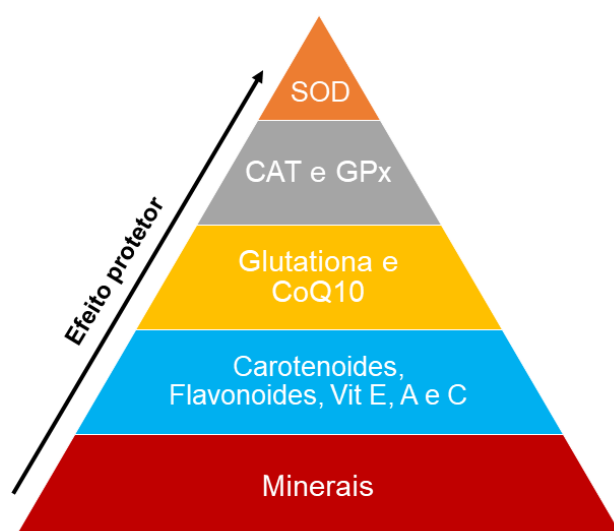
Já os antioxidantes não enzimáticos, uma forma de classificá-los é através da sua solubilidade, podendo ser hidrofílicos ou lipofílicos. Entre os hidrofílicos tem-se a glutathione e vitamina C, polifenóis, e, lipofílicos, vitamina A e E. A exemplo dessa classificação a vitamina C (antioxidante hidrofílico) se apresenta mais em fluidos celulares como o citosol, enquanto que a vitamina E, um antioxidante lipofílico, se apresenta mais nos tecidos cutâneos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; NIMSE; PAL, 2015a). Os mecanismos de ação dos antioxidantes podem ser observados através da Tabela 3 e, seus efeitos protetores podem ser observados através dos exemplos da Figura 10.

Tabela 3. Mecanismos de ação de antioxidantes.

Mecanismos de ação	Exemplos de antioxidantes
Quebra da propagação da cadeia de formação de radicais livres	α -tocoferol
Eliminação direta de radicais livres	Superóxido dismutase (SOD)
Aumento das defesas antioxidantes endógenas	Catalase
Quelação de metal de transição	Transferrina
Supressão da formação de radicais livres	Glutathione
Inibição de enzimas	Polifenóis
Regeneração de antioxidantes	Vitamina C

(NIMSE; PAL, 2015b)

Figura 10. Intensidade do efeito protetor de alguns antioxidantes.

(fonte: <https://issuu.com/gpmais/docs/revista-dimpless>)

2.6. Fotoproteção e filtros solares

A fotoproteção é um conjunto de medidas e estratégias preventivas com o intuito de direcionar o entendimento da população acerca da proteção solar e informar quais atitudes são benéficas para prevenção de problemas de pele, como por exemplo, procurar sombras (reduzir o tempo de exposição ao sol), usar roupas de proteção solar, óculos escuros com comprovação de proteção,

ingestão de água, alimentação saudável e utilização de protetores solares diariamente, inserindo o indivíduo em um contexto cada vez mais importante para a manutenção da saúde (ALMUTAWA; BUABBAS, 2014; YEAGER; LIM, 2019).

Dentro desse contexto, é importante conhecer os fototipos de pele para utilizar de maneira mais eficaz, o protetor solar, como também outras medidas de prevenção. A cor da pele está dividida em constitutiva e facultativa, sendo a constitutiva hereditária, onde a pigmentação não sofre interferência da radiação solar. Já a facultativa, pode ser induzida por outros fatores, principalmente exposição ao sol. Dessa forma, uma das classificações mais famosa para os fototipos cutâneos é a escala de Fitzpatrick (1976) Figura 11, sendo uma escala de fototipos de pele de 1 a 6, apresentando a capacidade de bronzeando, sensibilidade e vermelhidão quando a pele é exposta ao sol (SBD, 2017).

Assim, nessa escala é possível observar que os fototipos mais baixos de pele apresentam predisposição mais acentuada a agressividade solar, sendo necessária a utilização de protetores solares que apresentem proteção UVA e UVB mais altos quando comparado com fototipos mais altos (GOMES, 2018).

Figura 11. Escala de Fitzpatrick de fototipos de pele.

<i>ESCALA DE FITZPATRICK</i>					
					
TIPO 01 BRANCA	TIPO 02 BRANCA	TIPO 03 MORENA CLARA	TIPO 04 MORENA MODERADA	TIPO 05 MORENA ESCURA	TIPO 06 NEGRA
Sempre queima, nunca bronzeia.	Facilmente queima, bronzeia-se pouco.	Queima pouco, bronzeia moderadamente.	Queima pouco, bronzeia facilmente.	Queima raramente, bronzeia bastante.	Nunca queima, totalmente pigmentada.

(fonte: <https://www.raphaeloliver.com.br/post/como-acertar-o-tom-da-base>)

O filtro solar deve assegurar uma proteção uniforme em toda a gama de luz ultravioleta B (UVB) e luz ultravioleta A (UVA), uma propriedade conhecida como "homeostase espectral", que assegura que o espectro natural da luz solar é atenuado de maneira uniforme (MANCEBO; HU; WANG, 2014).

Os protetores solares oferecem proteção temporária contra a radiação UV. Os ingredientes ativos são classificados em filtros UV orgânicos e inorgânicos com base em sua composição química e do seu mecanismo de ação. Esses filtros são moléculas ou complexos moleculares que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV e, assim proteger a pele da exposição direta da luz solar. A atividade biológica de um protetor solar é avaliada por sua habilidade em proteger a pele de eritemas e edemas, reduzir o risco de queimaduras e o risco de carcinoma de células da camada basal e espinhosa (SHARMA; TYAGI; BANSAL, 2020; WALTERS; ROBERTS, 2008).

Os filtros solares químicos ou orgânicos são, geralmente, compostos aromáticos com um grupo carbonila (ou parte de uma cetona ou um éster) e um substituto liberador de elétrons (normalmente grupo amina ou metoxi) na posição *orto* ou *para* do anel aromático, que muitas vezes podem tornar o filtro específico para a região UVA ou UVB do espectro. Por isso, é interessante que se combine pelo menos dois tipos de filtros químicos, no intuito de assegurar a proteção ampla. Filtros solares que são capazes de proteger a pele contra todo o espectro da radiação UVA e UVB são chamados de filtros de amplo espectro (YOSHIDA, 2017). O mecanismo pelo qual os filtros químicos protegem a pele, se deve ao fato de que eles absorvem a energia da radiação incidente, passam para seu estado excitado de maior energia e, liberam-na em forma de calor ou luz ao voltar para seu estado inicial de menor energia (CHEN; WANG, 2016).

Já filtros solares físicos ou inorgânicos, geralmente são produtos de origem mineral, que se apresentam na forma de pós inertes e insolúveis no meio. Quando aplicados sobre a pele, formam uma barreira física e promovem a reflexão, dispersão em outras direções ou absorção da radiação ultravioleta, além disso, filtros físicos apresentam menos capacidade de causar alergias de pele (SHARMA; TYAGI; BANSAL, 2020).

O filtro solar ideal para cumprir com a sua função com eficácia e segurança, deve absorver a radiação na faixa de 290-400 nm, faixa essa, que abrange o espectro das bandas UVB e UVA. Para isso, o filtro deve manter o pico de absorção independente do solvente, ser fotoestável, ter características lipofílicas, mas baixa permeação cutânea, ser atóxico, não causar irritação nem

sensibilização na pele, ser barato, ser compatível com veículos cosméticos, ter boa espalhabilidade e aderência na pele (CHEN; WANG, 2016; WALTERS; ROBERTS, 2008; YOSHIDA, 2017).

Para assegurar o nível de proteção estabelecida no rótulo do produto, se faz necessário que o indivíduo aplique também de forma correta o protetor, pois a redução da quantidade utilizada, diminui a proteção. Por isso, é indicado que se utilize 2 mg/cm² de área cutânea, pois a aplicação inferior a isso, diminui a homogeneidade do filme protetor na pele (SCHALKKA; REIS, 2011). Já foi visto que a aplicação de apenas 0,5 mg/cm² de protetor com FPS 15, causou sua diminuição para FPS = 2, afetando de maneira significativa a proteção indicada pela formulação (FERREIRA CESTARI; BAZANELLA DE OLIVEIRA; CATUCCI BOZA, 2012).

Revisões e estudos sobre o assunto pele, radiação solar, câncer, fotoproteção vem demonstrando que os protetores solares usados carecem de uma proteção completa das radiações ultravioleta UVB e UVA, isso devido à incapacidade de absorver, refletir ou dispersar todos os fótons UV que atingem a pele. De acordo com um requisito para protetores solares publicada pela Food and Drug Administration (FDA), em 14 de junho de 2011, os fabricantes não podem usar o crédito "bloqueador solar", uma vez que exagera a sua eficácia (FREITAS et al., 2015). Considerando-se que os filtros de UV não proporcionem uma proteção de 100% para a pele e que a maioria de danos induzidos por UVA é mediada principalmente por ROS gerado após exposição à radiação UV, a adição de antioxidantes para filtros solares é altamente incentivada, bem como recomendado (FREITAS et al., 2015; WANG; LIM, 2016).

É importante ressaltar também que classificações diferentes são dadas em relação à proteção contra os raios UVB e UVA. A medida de proteção contra a radiação UVB é dada através do fator de proteção solar (FPS), indicando a habilidade do filtro solar de proteger a pele contra queimaduras. Já a proteção contra a radiação UVA pode ser dada pela avaliação do escurecimento do pigmento persistente, que resulta em um índice indicando a capacidade do protetor solar em evitar o bronzamento, como também a geração de radicais livres (ANVISA, 2012).

No Brasil, a regulamentação na área de protetores solares se dá por meio de algumas resoluções da ANVISA, já que no país, eles são considerados cosméticos. Assim, existem 34 substâncias permitidas pela ANVISA, por meio da RDC 69/2016, para serem utilizadas como filtro solares Tabela 4. Além disso, a ANVISA também faz a classificação da proteção solar tanto com relação à proteção UVA (fator de proteção UVA, sendo um terço do valor do FPS presente no rótulo) quanto UVB, por meio do fator de proteção solar (FPS), sendo o valor mínimo aceitável de FPS = 6 (ANVISA, 2012).

Tabela 4. Lista de filtros solares permitidos no Brasil.

Nº	Nome (INCI)	Concentração máxima
1	Sulfato de Metila de N, N, N- trimetil – 4–(2,oxoborn – 3 – ilidenometil) anilínio	6%
2	3, 3' – (1, 4 – fenilenodimetileno)bis (ácido 7, 7 – dimetil – 2 – oxo – biciclo – (2.2.1) 1-heptilmetanosulfônico e seus sais	10% (expresso como ácido)
3	1 -(4 – terc – butilfenil) – 3 – (4 –metoxifenil) propano – 1, 3 – diona	5%
4	Ácido alfa – (2 – oxoborn – 3 –ilideno) tolueno – 4 – sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina	6% (expresso como ácido)
5	2 – Ciano – 3, 3' – difenilacrilato de 2 –etilexila	10% (expresso como ácido)
6	4 – Metoxicinamato de 2 – etoxietila	3%
7	2, 2' – dihidroxi – 4 – metoxibenzofenona (benzofenona -8)	3%
8	Antranilato de mentila	5%
9	Salicilato de trietanolamina	12%
10	Ácido 2 – fenilbenzimidazol – 5 – sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina	8% (expresso como ácido)
11	4 – Metoxicinamato de 2 – etilhexila	10%
12	2 – Hidroxi – 4 – metoxibenzofenona	10%
13	Ácido 2 – hidroxí – 4 – metoxibenzofenona – 5 – sulfônico	10% (expresso como ácido)
14	Sal sódico do ácido 2 – hidroxí – 4 – metoxibenzofenona – 5 – sulfônico – Benzofenona-5	5% (expresso como ácido)
15	Ácido 4 – aminobenzóico (PABA)	15%
16	Salicilato de homomentila (Homosalato)	15%
17	Polímero de N – {(2 e 4)[(2 – oxoborn – 3 –ilideno) metil] benzil} acrilamida	6%
18	Dióxido de titânio	25%

19	N – Etoxi – 4 – aminobenzoato de etila (PEG-25 PABA)	10%
20	4 – Dimetil-aminobenzoato de 2 –etilhexila	8%
21	Salicilato de 2- etilhexila	5%
22	4 – Metoxicinamato de isopentila	10%
23	3 – (4' – metilbenzilideno) – d – l –cânfora	4%
24	3 – Benzilideno cânfora	2%
25	2, 4, 6 – Trianilina – (p – carbo – 2'- etil –hexil – 1' – oxi) – 1, 3, 5 – triazina	5%
26	Óxido de zinco	25%
27	2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-{2 -metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)-disiloxanil)propil}fenol	15%
28	Ácido benzóico,4,4'-[[6-[[4-[[1,1-dimetil-etil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etil hexil)éster	10%
29	2,2'-metileno-bis-6-(2H-benzotriazol2-il)-4-(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol	10%
30	Sal monossódico do ácido 2,2'-bis-(1,4-fenileno)- 1H-benzimidazol-4,6-dissulfônico	10% (expresso em ácido)
31	(1,3,5)-triazina-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidróxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil)	10%
32	Dimeticodietilbenzalmalonato (Polysilicone-15)	10%
33	Éster hexílico do ácido 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]-, benzoico	10%
34	1,3,5-Triazina, 2,4,6-Tris([1,1'-Bifenil]-4-il)	10%

(Fonte: ANVISA, 2016)

O estudo de ativos naturais que possam atuar sinergicamente com os filtros solares químicos e físicos para a ampliação do fator de proteção solar tem se intensificado nos últimos anos. Estes estudos demonstraram boas expectativas com relação ao uso de substâncias fenólicas como filtros solares. Esses compostos polifenólicos são relatados entre os fatores que protegem a pele contra os efeitos nocivos da radiação solar (CHIARI-ANDRÉO et al., 2020; WANG; LIM, 2016).

A incorporação de antioxidantes em muitos produtos de proteção solar para neutralizar os efeitos citotóxicos do ROS gerados pela exposição aos raios UV tem sido realizada em várias pesquisas. Em estudos com seres humanos, após a exposição RUV, demonstrou-se que os sujeitos que aplicaram protetor solar contendo antioxidantes (Aos) tiveram maior redução nos níveis de metaloproteinase de matriz-1 e menos de indução pigmento e proliferação epidérmica quando comparados aos controles. Portanto, essa tem sido

considerada uma estratégia promissora para o desenvolvimento de formulações de protetores solares com melhores propriedades de fotoprotetoras (AGIĆ et al., 2018; WANG; LIM, 2016).

Polifenóis são componentes naturais de plantas que estão distribuídos em frutos, vegetais, sementes, casca de árvores e flores. Eles apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomodulatórias. Estudos demonstraram a eficácia de polifenóis naturais no combate a inflamação, estresse oxidativo, danos ao DNA e supressão da resposta imune, induzidos pela radiação UV. Estes efeitos protetores contribuem para a ação antifotocarcinogenica dos mesmos (CHIARI-ANDRÉO et al., 2020; GOLLÜCKE et al., 2018; KOJIMA-YUASA, 2018).

Os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores dos polifenóis contra a radiação UV são complexas, mas parecem envolver a modulação de vias de sinalização celular, atividades anti-inflamatórias, a indução de citocinas, tais como interleucina-12 (IL-12), prevenção da imunossupressão induzida por UVB, up-regulation de genes que codificam enzimas de reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e principalmente a inibição de espécies reativas de oxigênio por vários mecanismos (AFAQ; KATIYAR, 2011; CHONG et al., 2019; KOJIMA-YUASA, 2018).

Outro grande ponto de interesse, é que têm-se demonstrando que a incorporação de produtos naturais em fotoprotetores aumenta a sua tolerabilidade e diminuição de seu impacto ambiental (MANCEBO; HU; WANG, 2014).

2.7. Produtos naturais e fotoproteção

Além de barreiras físicas ou mecânicas contra a radiação solar, a maneira mais efetiva de proteger a pele do sol, é a utilização de protetores solares, como já discutido anteriormente. Porém, como também tem sido comentado, estudos mostram que pode haver problemas na utilização desses produtos, devido à permeação cutânea de filtros químicos, que podem causar problemas tireoidianos, devido ao seu potencial estrogênico, além de alergias, dermatite de

contato, fotoirritação, entre outros. Em relação aos filtros físicos, já foi visto que o dióxido de titânio pode ser comedogênico e, na sua forma nano, pode causar dermatite de contato foto alergênica (CEFALI et al., 2016; RADICE et al., 2016). Portanto, os produtos naturais vêm se tornando uma alternativa positiva a esses problemas enfrentados pela indústria de cosméticos (CEFALI et al., 2016; MOTA et al., 2019).

Isso se justifica pelo fato de que associações entre produtos naturais com propriedades fotoprotetoras e antioxidantes e os filtros químicos, apresentando resultados positivos, permitem a diminuição da concentração dos filtros orgânicos utilizados nas formulações, diminuindo as chances de promover a absorção desses agentes, que podem ter ações sistêmicas, apresentando menos riscos à saúde, além de que, eles atendem melhor aos requisitos de sustentabilidade (MOTA et al., 2019; SAEWAN; JIMTAISONG, 2015).

As formulações dermatológicas e dermocosméticas têm destacado em seus ingredientes farmacêuticos as combinações contendo filtros UV, antioxidantes e extratos naturais como base em seus benefícios importantes para a pele. Devido a estas substâncias demonstrarem aumentar a proteção contra a exposição UV, prevenir o câncer de pele, melhorar a sua condição e prevenir o envelhecimento das camadas dérmicas através da hidratação, restauração da função de barreira e promoção da síntese de colágeno, o que amplia as defesas da pele, como também favorece na recuperação da mesma (PERES et al., 2018a; WANG; LIM, 2016; YOSHIDA, 2017). Exemplos de estudos com produtos naturais em fotoproteção podem ser encontrados na Tabela 5.

Tabela 5. Estudos de fotoproteção com produtos naturais.

Estudos de fotoproteção			
Planta	Constituinte	Autores	Atividade
-	Trans - resveratrol e beta-caroteno	FREITAS et al., 2015	Filtros UV + Antioxidantes – Apresentando taxas de penetração da pele satisfatórios
<i>Ginkgo biloba</i>	Rico em flavonóides (rutina, quercetina, kaempferol) e terpenoides	MERCURIO et al., 2015	Melhora significativamente do desempenho dos filtros solares na prevenção de danos no DNA e inflamação e também pode atuar na renovação celular
<i>Galinsoga parviflora</i>	Rico em flavonoides e ácidos fenólicos	BAZYLKO; BORZYM; PARZONKO, 2015	Os extratos impediram a atividade de proliferação e diminuiu o aumento da apoptose causada por irradiação de UVA e UVB, apresentaram a capacidade para inibir a produção de ROS
<i>Punica granatum</i>	Considerada como “Uma farmácia em si mesmo” os principais responsáveis para a maioria de suas propriedades funcionais são compostos fenólicos	BACCARIN et al., 2015	As formulações mostraram efeito protetor contra o dano ao DNA celular induzidas por UVB
Extratos isolados e mistura de extratos de <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Vitis Vinifera</i> , <i>Dirmophandra mollis</i> e <i>Ruta graveolens</i>	Flavonoides como quercetina e rutina	(CEFALI et al., 2019b)	O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> sozinho e a mistura de extratos apresentaram valores de FPS <i>in vitro</i> maiores que 6 e a mistura de extratos apresentou valor de comprimento de onda crítico de 372,7 nm. O extrato de <i>Ginkgo biloba</i> apresentou expressiva atividade antioxidante frente aos radicais testados e nenhum dos extratos afetou a viabilidade das células testadas.
<i>Campomanesia guazumifolia</i> , <i>Campomanesia</i>	Compostos fenólicos	CATELAN et al., 2019	Formulações de todos os extratos vegetais, isoladamente ou em

<i>sessiliflora</i> , <i>Campomanesia</i> <i>xanthocarpa</i> e <i>Campomanesia</i> <i>adamantium</i> , separadas ou em combinação			combinação, aumentaram o FPS com a incorporação de metoxicinamato de octila. As amostras que apresentaram os melhores valores de FPS continham a associação de CA e CX.
---	--	--	---

(Terto, 2021)

Várias classes de metabólitos secundários podem atuar em formulações fotoprotetores principalmente como antioxidantes, mas também impedindo diretamente a ação da radiação ultravioleta incidente, são eles: fitoestrogênios, carotenoides, xantofilas, cumarinas, proantocianidinas, antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, alcaloides, terpenoides, óleos voláteis, taninos e flavonoides. Porém, no geral, destacam-se os compostos fenólicos, tanto por sua potente atividade antioxidante, como por sua capacidade de ação contra os raios solares de forma direta. Isso acontece devido sua estrutura química apresentar sistemas cíclicos ou conjugados de dupla ligações, mais de um anel aromático e uma estereoquímica específica (NUNES et al., 2018; SAEWAN; JIMTAISONG, 2015).

O crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (RADICE et al., 2016; SAEWAN; JIMTAISONG, 2015).

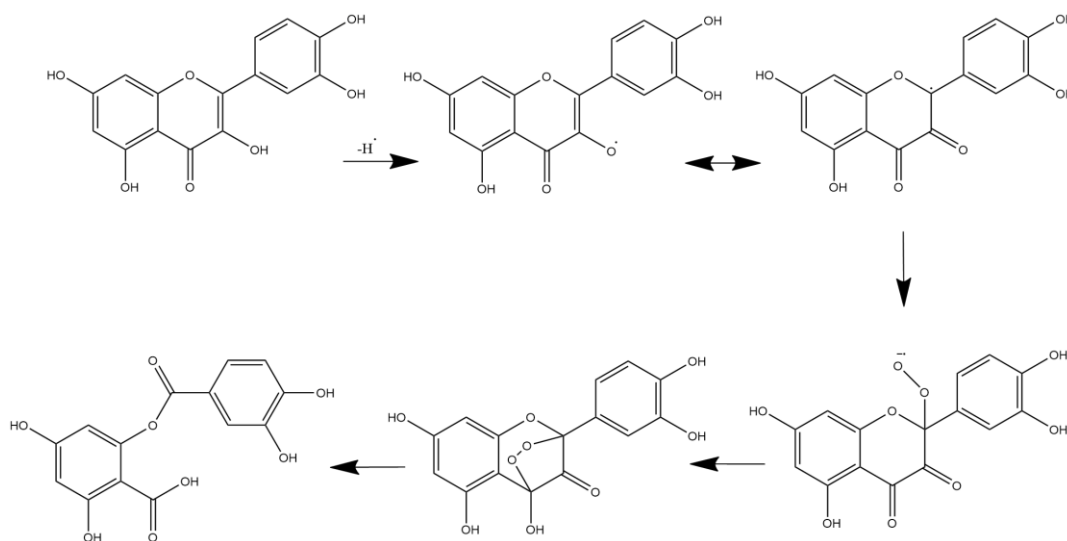
Dentro dos polifenóis, uma classe importante que vem apresentando interesse na sua ação fotoprotetora é a dos flavonoides. São capazes de absorver a luz ultravioleta, agir como antioxidantes e, apresenta em seu espectro de absorção, de uma maneira geral, dois picos máximos de absorção, um entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm, o que mostra a possibilidade de uso destes extratos como filtros solares em preparações fotoprotetoras UVB/UVA (DI FERDINANDO et al., 2014; GREGORIS et al., 2011; NASCIMENTO, 2016).

A utilização, pelas plantas, dos flavonoides como uma estratégia de defesa contra a radiação ultravioleta e ação dos radicais livres dependerá do teor

dos flavonoides produzidos, tornando um fator vital para a sobrevivência da planta em seu ambiente. Por exemplo, o anel B de orto-dihidroxi-flavonas, como a luteolina, em relação ao anel B de mono-hidroxi-flavonas, como a apigenina, pode ser mais efetivo em anular os efeitos potencialmente deletérios de radicais livres produzidos no tecido pela radiação ultravioleta. Esses mesmos autores mostram que os flavonoides também atuam dissipando a energia UV absorvida de uma maneira inofensiva (NIMSE; PAL, 2015a).

A quercetina, por exemplo, pode atuar protegendo o DNA contra o estresse oxidativo resultante do ataque de radicais $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$ ou H_2O_2 através do mecanismo mostrado na Figura 12 (PERES et al., 2018b; ROJAS; LONDOÑO; CIRO, 2016).

Figura 12. Mecanismo de ação da quercetina contra o dano oxidativo do DNA.



(Fonte: NIMSE; PAL, 2015)

Ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, ácido cafeico, *p*-cumárico e seus derivados como ácidos clorogênicos e ácido rosmarínico são bastante interessantes também, já que eles são capazes de absorver a radiação ultravioleta na região dos raios UVB (SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009).

O ácido rosmarínico (RA) é quimicamente definido como sendo um éster do ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxifenilático, ele apresenta uma boa

variabilidade de atividades biológicas incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana. A presença do ácido rosmarínico nas plantas é uma forma adaptativa favorecendo sua defesa, que causa até mesmo a preservação de alimentos, justamente devido às suas propriedades citadas. Na pele humana, além de agir contra espécies reativas do oxigênio, ele proporciona uma proteção à matriz extracelular da derme atribuída a sua ação de inibição da elastase, favorecendo assim a manutenção da propriedade de viscoelasticidade, importante para fixação de água e desta forma, promovendo uma ação antienvelhecimento do local (SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009).

Devido a essas propriedades biológicas apresentadas pelo ácido rosmarínico, ele também vem sendo estudado na área da fotoproteção, tanto por via tópica, quanto por via oral, associando sua atividade antioxidante com suas propriedades anti-inflamatórias, mostrando que suas ações não estão apenas relacionadas a sua capacidade de eliminação de radicais livres, mas também com a capacidade de regulação enzimática envolvida nesse processo. Em experimentos com a suplementação oral de extrato de ácido rosmarínico, constatou-se que o dano à pele pelas espécies relativas de oxigênio induzidas por raios UVA foram reduzidas devido a atividade dessa suplementação de eliminar e extinguir tais espécies (FERNANDO et al., 2016).

Em outro estudo feito por Fadel; El Kirat; Morandat, 2011, mimetizando a via tópica, foi visto que o ácido rosmarínico apresenta capacidade de citoproteção, devido a eliminação de espécies reativas de oxigênio intracelular que foram induzidas pela radiação UVB, atenuou o dano oxidativo em macromoléculas induzido por UVB, como o conteúdo de proteína carbonil, quebras das fitas de DNA e o nível de 8-isoprostano, foi possível observar que ele também promoveu o aumento da enzima superóxido dismutase, catalase, heme-oxigenase-1, pelo aumento da expressão do fator de transcrição Nrf2, que se encontrava diminuído pela radiação UVB.

Também foi observado por Dalmagro et al., 2018; Ribeiro; Bonilla; Lucena, 2018 que o ácido rosmarínico apresentou proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro*, através de sua inserção espontânea na membrana utilizada, sem causar qualquer alteração perceptível a ela.

Diante de todos esses estudos, é observado que tanto os compostos fenólicos e entre eles, o ácido rosmarínico são de extrema importância na produção de um protetor solar de fontes naturais, apresentando como estratégia uma proteção de amplo espectro, associada a ação antioxidante e anti-inflamatória.

2.8. Sazonalidade

As plantas estão sempre precisando se adaptar às condições que vivenciam ao seu redor. Fatores como o solo, luz, água disponíveis, poluição, condições ambientes e climáticas, sazonalidade, idade da planta, espécies vizinhas, níveis de estresse, entre outros Figura 13, exigem que as plantas desenvolvam estratégias para sobreviver que, por muitas vezes, envolvem seu metabolismo e mudanças morfológicas. Dessa forma, o metabolismo secundário é afetado por esses fatores e, vários metabólitos podem ser produzidos dependendo das condições existentes. Algumas dessas estratégias podem ser: a produção de alcaloides, cianetos, taninos e outros fenólicos como formas de defesa contra patógenos ou herbívoros e a produção de polifenóis como as antocianinas que servem como atrativo para atrair agentes polinizadores e dispersores (GOUVEA et al., 2012).

Figura 13. Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários pelas plantas.



(Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A sazonalidade e a hora do dia podem influenciar tanto na produção quantitativa quanto qualitativa dos metabólitos secundários (ZOUARI-BOUASSIDA et al., 2018). Óleos essenciais demonstram ter uma grande variabilidade na sua produção em decorrência da época do ano, exemplos disso podem ser vistos no estudo de De Macêdo et al., 2020 onde a maior concentração de óleos essenciais de *Mentha longifolia* foi observada na primavera e no estudo de Ahn; Alford; Niemeyer, 2020b foi observado que o período de coleta do óleo essencial de *Psidium myrtoides* alterou a composição química do mesmo e sua atividade antimicrobiana.

Outros metabólitos secundários, como os fenólicos apresentam uma alta dependência de fatores ambientes, sendo fortemente afetados tanto pela composição do solo, fertilização mineral, métodos de cultivo, níveis de água, quanto pela temperatura ambiente, mostrando que a variabilidade das condições ambientais durante todo o ano é importante para a produção deles (NENADIS et al., 2015; PASSARI et al., 2019b).

Dois fatores importante a se considerar nesse sentido é a radiação UV, principalmente a UVB e o déficit hídrico, já que eles podem causar estresse nas plantas, provocando o aumento de radicais livres produzidos por elas, levando a danos celulares. Em épocas do ano quando isso acontece, é possível que haja o aumento na produção de compostos fenólicos nas folhas de algumas espécies como forma de proteção contra esses fatores agressores (WAR et al., 2012).

Já foi visto, por exemplo, que a produção de fenólicos em *Cistus ladanifer*, especialmente seis agliconas de flavonoides tinham suas concentrações elevadas dependendo da estação do ano (ALÍAS et al., 2012) e, em outros estudos foi visto que os fenólicos eram majoritariamente produzidos no verão em detrimento do inverno (KO et al., 2018). Entretanto, outro estudo feito por (RUTKOWSKA et al., 2020) determinou que melhor período para a coleta da espécie *Sasa quelpaertensis* visando a maior concentração de fenólicos e atividade antioxidante é no outono e no inverno (outubro a dezembro), em resposta a alterações ambientes ocorridas, mostrando que é necessário avaliar as condições de cada planta mais especificamente.

As variações no metabolismo secundário das plantas se tornam especialmente relevantes quando se pensa em sua utilização industrial, como

por exemplo, em medicamentos fitoterápicos, fitocosméticos, dermocosméticos, alimentos funcionais e nutracêuticos. Os estudos abrangendo várias áreas sobre as alterações da produção dos metabólitos de espécies vegetais se fazem necessários justamente para o entendimento das interações entre o meio ambiente no qual a planta está inserida e, como isso influencia fisiológica e metabolicamente seu desenvolvimento e adaptação (RUTKOWSKA et al., 2020). Já que não existe uma regra específica para todas as espécies, dependendo então de estudos mais direcionados.

Objetivos

3 - Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar a atividade fotoprotetora e antioxidante do extrato etanólico de *P. amboinicus*, desenvolver metodologia analítica por CLAE para quantificação do composto majoritário do extrato, validá-la, além de avaliar as variações sazonais na concentração dos metabólitos secundários ocorridas durante todo o ano, observando a influência da radiação solar e precipitação.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o perfil de absorbância e atividade fotoprotetora do extrato de *P. amboinicus*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato a partir do método do DPPH;
- Determinar o teor de compostos fenólicos do extrato;
- Determinar o teor de flavonoides totais;
- Determinar perfil fitoquímico do extrato por CLAE-EMⁿ;
- Desenvolver e validar método analítico por CLAE-DAD para quantificar o marcador químico do extrato;
- Avaliar a sazonalidade do extrato e realizar análise multivariada dos resultados;

Metodologia

4 - Metodologia

4.1. Coleta do material e produção do extrato etanólico bruto de *Plectranthus amboinicus*

As partes aéreas (2,15 kg) de *Plectranthus amboinicus* foram coletadas no dia 04 de Abril de 2017, às 8h, no Horto do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, município de João Pessoa-PB. Essa espécie foi identificada pela professora Rita Baltazar de Lima e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da UFPB, sob o número de registro JPB0047239. Também foi feito o registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) para este projeto, sob o número de registro AAB0FA6.

O material vegetal fresco foi triturado e submetido à maceração com etanol a 95% por 72h, sendo esse processo repetido por três vezes. 3 L de etanol foram utilizados em cada repetição da maceração, totalizando 9 L em todo o processo extrativo. Posteriormente, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador à temperatura de 40 °C obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB). Após a evaporação do solvente, foi obtido 52 g do extrato.

4.2. Determinação do perfil químico do extrato de *P. amboinicus* por CLAE-IES-EMⁿ

O extrato de *P. amboinicus* foi analisado por HPLC da marca Shimadzu, utilizando coluna cromatográfica analítica C18 (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5 µm), acoplado a espectrômetro de massas (Ion-Trap AmazonX, Bruker), com ionização por Eletrospray (IES).

Para realização da análise, a amostra foi solubilizada em metanol (1 mg/mL), com posterior filtração em filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno), com malha de 0,45 µm. O método cromatográfico desenvolvido utilizou os solventes metanol (solvente B) de grau cromatográfico e água ultrapura tipo I (Mili-Q),

acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (solvente A), com análise em gradiente de concentração (5 a 100% de B em 95 minutos). O volume de injeção foi de 10 µL e taxa de fluxo foi de 0,6 mL/minuto. No espectrômetro de massas, as amostras foram submetidas a uma fragmentação sequencial em EM³. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, *offset* da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás (N₂) com fluxo de 8 mL/minuto e temperatura de 300 °C. A amostra foi analisada no modo de ionização negativo e a identificação dos compostos foi baseada nos dados (EMⁿ) reportados pela literatura.

4.3. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de ácido rosmarínico em *P. amboinicus*

4.3.1. Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência (padrão) utilizada para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência foi o ácido rosmarínico obtido da Sigma Aldrich, com teor de pureza > 95%. Este padrão também foi utilizado como marcador químico no extrato de *P. amboinicus*.

4.3.2. Solventes

Os solventes utilizados para o desenvolvimento e validação do método analítico foram metanol e acetonitrila grau HPLC (Tedia[®]), água do tipo I (obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q-Millipore[®]), ácido fórmico (HCOOH) (J. T. Baker[®]), ácido fosfórico (H₃PO₄) (Proquimios[®]) e ácido acético (H₃CCOOH) (J. T. Baker[®]).

4.3.3. Desenvolvimento do método analítico

Nesse caso, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) (Figura 14) equipado com módulo de bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A HT, um sistema de degaseificação DGU-20A5R, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A diode array e controlador CBM-20A. A coluna utilizada foi Kromasil[®]

C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 μ m, Lote: 146155/E193786), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 μ m). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

Figura 14. Cromatógrafo líquido utilizado.



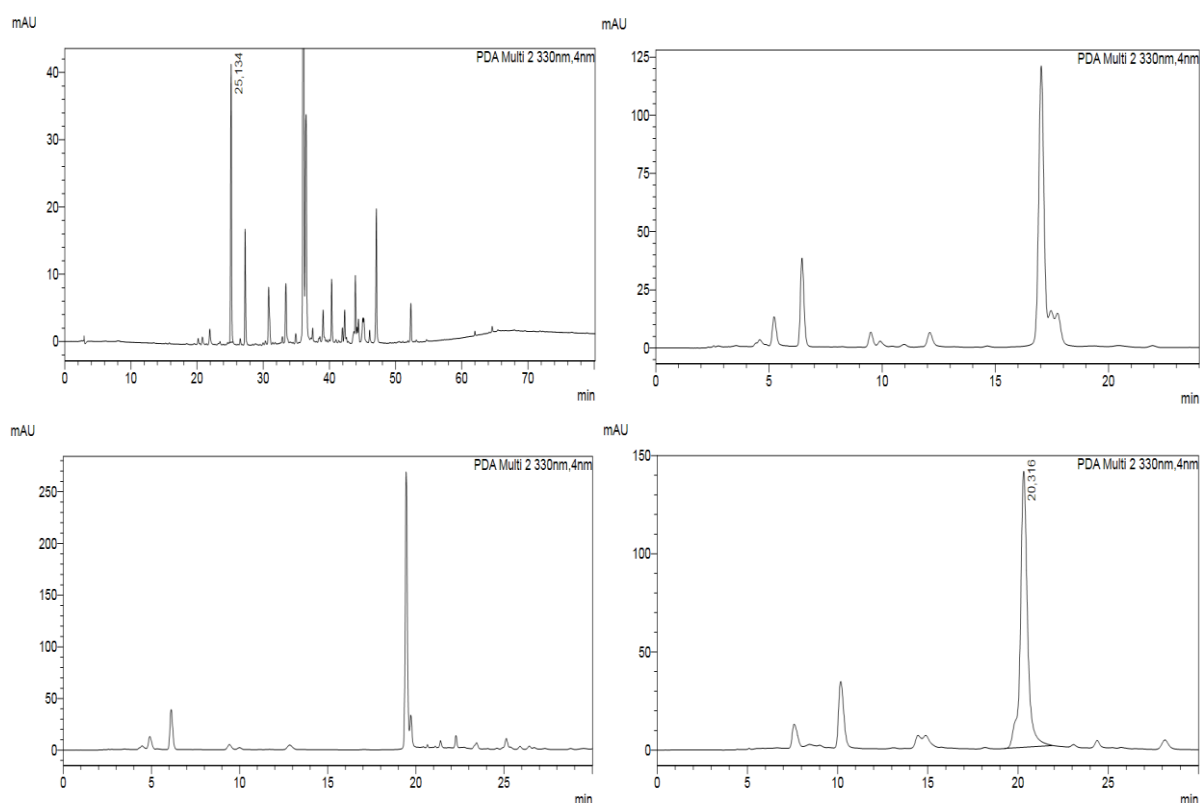
(Fonte: COMES, 2018)

Na busca para o desenvolvimento do método mais adequado para a separação das substâncias no extrato, vários sistemas de eluição tanto em gradiente quanto isocrático foram testados, utilizando metanol ou acetonitrila como fase móvel B. Dessa forma, foi visto que o melhor solvente orgânico para a separação era o metanol puro. Já a fase móvel A, foi composta por água tipo I em mistura com 0,1% de ácido fórmico. Todos os solventes passaram por processo de degaseificação com o sonicador ultraCleaner 1600 antes de cada análise.

Tanto soluções do extrato quanto do padrão de ácido rosmarínico foram preparadas para o desenvolvimento do método. Elas foram filtradas através de membrana filtrante Hexis de 0,45 μ m x 25 mm de diâmetro, para impedir que impurezas insolúveis fossem injetadas no equipamento de CLAE. Essas soluções tiveram como solvente a mistura de MeOH:água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (1:1). Posteriormente, 20 μ L de cada solução foi injetada no

cromatógrafo e os tempos de retenção, áreas dos picos bem como a resolução entre eles, foram avaliados. Vários cromatogramas foram obtidos (Figura 15) até que as condições cromatográficas fossem encontradas.

Figura 15. Exemplos de cromatogramas obtidos durante o desenvolvimento do método.



(Fonte: TERTO, 2020)

Dessa forma, conforme os parâmetros ideais foram encontrados, a corrida cromatográfica teve um tempo total de 26 minutos. Ela se inicia com 50% de solvente B, chegando a 60% em 20 min permanecendo assim por 1 min e voltando para 50% até finalizar a corrida em 26 min. O fluxo utilizado nesse método foi 0,6 mL/min, à uma temperatura do forno de 26 °C, com um volume de injeção de 20 µL e a detecção por meio do detector UV (DAD) foi feita no comprimento de onda de 330 nm. Além disso, as amostras de extrato e de padrão foram feitas com solução diluente com concentração de 50%:50% MeOH:água acidificada com 0,1% de HCO₂H (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos usados para análise do extrato de *P. amboinicus*.

Parâmetros	Condições
Fase móvel A	Água acidificada (0.1% of HCO ₂ H)
Fase móvel B	Metanol
Gradiente	0 min – 50% B 20 min – 60% B 21 min – 50% B 26 min – 50% B
Fluxo	0.6 ml / min
Temperatura do forno	26 °C
Solução diluente	MeOH: água acidificada 0.1% HCO ₂ H (50% : 50%)
Tempo de análise	26 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	330 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 × 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

(TERTO, 2020)

4.3.4. Validação do método analítico desenvolvido

A validação do método foi realizada seguindo as recomendações da RDC nº 166 de julho de 2017 (guia para validação de métodos analíticos), que é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção (ANVISA, 2017). Assim, os parâmetros determinados foram a linearidade, seletividade, precisão/repetibilidade, efeito matriz, exatidão e robustez.

4.3.4.1. Linearidade

Segundo a RDC nº 166/2017, a linearidade deve ser demonstrada pela capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, em um intervalo determinado. Para esse parâmetro, foram utilizadas 5 concentrações diferentes do composto padrão, onde elas variaram entre limites inferior, médio e superior. Uma solução estoque de ácido rosmarínico foi preparada a partir dela, as concentrações de 5,6; 11,25; 22,5; 45 e 90 µg/mL foram feitas.

➤ Solução estoque de AR:

5 mg de AR foi pesado em balança analítica, que posteriormente foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL, que teve seu volume completado com a mistura de solventes MeOH:água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%). Assim, a concentração final resultante foi de 1 mg/mL.

➤ Preparação das amostras de AR nas concentrações 5,6; 11,25; 22,5; 45 e 90 µg/mL:

1. **5,6 µg / mL:** 28 µL da solução estoque de AR foram transferidos para um balão volumétrico de 5 ml, e o seu volume completado com a mistura de solventes MeOH : água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%), obtendo-se a concentração final desejada.
2. **11,25 µg / mL:** 56,25 µL da solução estoque de AR foram transferidos para um balão volumétrico de 5 ml e o seu volume completado com a mistura de solventes MeOH : água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%), obtendo-se a concentração final desejada.
3. **22,5 µg / mL:** 112,5 µL da solução estoque de AR foram transferidos para um balão volumétrico de 5 ml e o seu volume completado com a mistura de solventes MeOH : água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%), obtendo-se a concentração final desejada.
4. **45 µg / mL:** 225 µL da solução estoque de AR foram transferidos para um balão volumétrico de 5 ml e o seu volume completado com a mistura de solventes MeOH : água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%), obtendo-se a concentração final desejada.
5. **90 µg / mL:** 450 µL da solução estoque de AR foram transferidos para um balão volumétrico de 5 ml e o seu volume completado com a mistura de solventes MeOH : água acidificada a 0,1% de HCO₂H (50%:50%), obtendo-se a concentração final desejada.

4.3.4.2. Seletividade

Este parâmetro visa avaliar a capacidade do método de analisar especificamente o composto de interesse na presença de componentes como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz que podem estar presentes na amostra (ANVISA, 2017).

Utilizando análise por CLAE, para a determinação desse parâmetro, usou-se o padrão a 100% (22,5 µg/mL), a fase móvel, o extrato (1 mg/mL) e a solução diluente. Eles foram avaliados através do detector de arranjo de diodo (DAD), afim de observar se na faixa de comprimento de onda entre 190 a 800 nm, haveria algum outro pico coeluinto com o pico do marcador químico.

4.3.4.3. Efeito Matriz

De acordo com o RDC nº 166/2017, a comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com SQR (linearidade) e analitos fortificados com SQR precisam indicar que não há interferência dos constituintes da matriz e, isso pode ser visto através do paralelismo das linhas. Assim, foram preparadas cinco amostras de extrato de 1 mg/mL de *P. amboinicius* e foram adicionados volumes de 20, 30, 40, 50 e 60 µL de AR na concentração de 1 mg/mL, correspondendo a 45,93, 53,28, 62,07, 70,68 e 78,78 µg/mL de AR, respectivamente, nas amostras fortificadas.

4.3.4.4. Precisão

A precisão do método busca avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme o método analítico a ser validado. Para isso foram avaliados os parâmetros de repetibilidade e a precisão intermediária (ANVISA, 2017).

A repetibilidade visa avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação/equipamento, em uma única corrida analítica. Neste caso, ela foi feita através da determinação de 6

réplicas a 100% (22,5 µg/mL) da concentração do teste já previamente determinada.

Já a precisão intermediária busca expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Segundo a RE nº 166/2017, a precisão é expressa pelo coeficiente de variação (desvio padrão relativo de uma série de medidas). Ela pode ser calculada através da Equação 1 abaixo, porém, é importante salientar que a variação permitida não pode ser maior que 5%.

Equação 1. Fórmula para o cálculo do desvio padrão relativo.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde,

DPR = Desvio padrão relativo

DP = Desvio padrão

CMD = Concentração média determinada

Para a repetibilidade, foram preparadas soluções tanto do padrão de AR quanto do extrato de *P. amboinicus*, que obedeceram aos seguintes procedimentos:

- Uma solução do padrão de AR de 22,5 µg/mL foi feita e filtrada para um vial utilizando filtro Hexis.
- Para análise do extrato, foram feitas 3 amostras na concentração de 1 mg / ml, que também foram filtradas para 3 vials diferentes, utilizando sempre como solvente a solução diluente de MeOH:água acidificada a 0,1% de ácido fórmico e todo o procedimento foi feito sempre pelo mesmo analista.

Já para a determinação da precisão intermediária, ela foi realizada 2 dias após a repetibilidade, mas agora com todo o procedimento sendo feito por um analista diferente, que também realizou 6 determinações da concentração de 100% de AR existente no extrato etanólico bruto de *P. amboinicus*.

4.3.4.5. Exatidão

Esse parâmetro se baseia na avaliação do grau de proximidade dos dados obtidos utilizando-se o método estudado e sua comparação com o valor verdadeiro. É necessário que esse parâmetro seja determinado após a linearidade e seletividade do método, onde é necessário realizar no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo utilizado no método, com 3 concentrações diferentes, baixa, média e alta, sendo todas feitas em triplicata. A partir disso, a exatidão pode ser calculada através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a Equação 2 abaixo (ANVISA, 2017):

Equação 2. Fórmula para o cálculo da exatidão.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Nesse caso, para a realização desse teste, 3 amostras das concentrações baixa, média e alta (5,6; 22,5 e 90 µg/mL) escolhidas para a linearidade foram preparadas em triplicata. O método utilizado foi pela adição de padrão, o qual adicionado em quantidades conhecidas nas soluções do extrato de *P. amboinicus*. A exatidão pôde ser avaliada pela porcentagem de recuperação do teor do marcador de AR adicionado às amostras do extrato. Segundo a mesma resolução, os limites aceitáveis de recuperação não podem variar mais que 10%. Dessa forma, as amostras foram preparadas para avaliar a recuperação conforme descrito abaixo:

1. **Exatidão 80% (5,6 µg/mL):** uma solução com 30% de AR mais 50% de extrato foi feita, sendo os 100% completados com solução diluente em um balão volumétrico de 5 ml.
2. **Exatidão 100% (22,5 µg/mL):** uma solução com 50% de AR mais 50% de extrato foi feita em um balão volumétrico de 5 ml.
3. **Exatidão 120% (90 µg/mL):** uma solução com 70% de AR mais 50% de extrato foi feita, sendo o volume completado com solução diluente em um balão volumétrico de 5 ml.

4.3.4.6. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é definido como sendo a menor quantidade do analito presente na amostra passível de detecção, mas que não necessariamente é quantificada através do método desenvolvido. Já o limite de quantificação, é a menor quantidade que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo mesmo método (ANVISA, 2017).

- O limite de detecção pode ser calculado através da Equação 3 abaixo:

Equação 3. Fórmula para o cálculo do limite de detecção.

$$LD = \frac{3 \cdot DP}{a}$$

Onde,

LD = Limite de detecção

DP = Desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão.

a = Inclinação da reta obtida para o marcador

Já para a determinação do limite de quantificação, utiliza-se a

Equação 4 abaixo:

Equação 4. Fórmula para o cálculo do limite de quantificação.

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{a}$$

Onde,

LQ = Limite de quantificação

DP = Desvio padrão da equação da linha de regressão, dada pelo erro padrão obtido na estatística de regressão.

a = Inclinação da reta obtida para o marcador

4.3.4.7 Robustez

A robustez é o parâmetro que no desenvolvimento de um método analítico demonstra sua capacidade de resistir a pequenas variações das condições analíticas. Ela garante que pequenas variações não interfiram no uso normal do método e seu limite de aceitação é de 90 – 110%.

Assim, para esse teste, triplicatas das amostras tanto para o extrato (1 mg/mL) quanto para o padrão de AR na concentração de 100% foram feitas (BRASIL, 2017). As condições avaliadas são descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros alterados para a comprovação da robustez do método desenvolvido.

Parâmetros	Condições	Variações
Fase móvel A	0,1% HCOOH	0,1% H ₃ PO ₄ ; H ₃ CCOOH
pH	2,5	2 ; 3
Coluna	Kromasil® C18 (250 × 4.6 mm d.i. preenchida com partículas de 5 µm)	Kromasil® C18 (150 × 4.6 mm d.i. preenchida com partículas de 5 µm)
	Lote: 146155/E193786	Lote: 165839/L201813

Fluxo	0,6 ml/min	0,5 ml/min ; 0,7 ml/min
Temperatura do forno	26 °C	24 °C ; 28 °C

(Fonte: TERTO, 2020)

4.4. Quantificação de fenólicos totais

Para o ensaio, foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, o qual é um dos mais empregados. O reagente de Folin é composto por dois tipos de ácido, o ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), então, quando os compostos fenólicos são colocados em meio alcalino e essa reação gera a formação do ânion fenolato, esse íon é capaz de reduzir os ácidos presentes no Folin, fazendo com que a solução mude de amarela para azul, pela formação de óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) (PIRES et al., 2017).

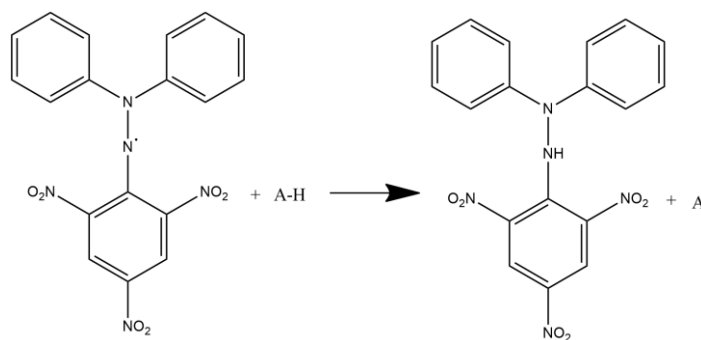
Dessa forma, o teste foi feito como descrito por Gulcin, 2004, onde em 120 μL da amostra (extrato na concentração de 1 mg/mL) é adicionado 0,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10%. Essa reação é então mantida em repouso e ao abrigo da luz por 8 min e posteriormente são adicionados 0,4 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Essa reação foi mantida a temperatura ambiente e no escuro por 120 min, sendo 200 μL transferidos para as placas de 96 poços durante esse tempo de espera. A absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro UV-visível (UV-2550, Shimadzu) e as análises foram feitas em triplicata e repetidas por 3 dias. Para a produção do branco, 900 μL de metanol eram adicionados a 120 μL das amostras em eppendorfs e depois 200 μL eram transferidos também para as microplacas.

O ácido gálico (AG) foi utilizado como padrão para esse teste e o cálculo do teor de fenólicos totais foi feito a partir da equação de regressão linear gerada através da curva de calibração dele, que foi construída com as concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de amostra).

4.5. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Para essa determinação, foi utilizado o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) e ele se baseia na doação de um hidrogênio do composto antioxidante para o DPPH, que é reduzido e a coloração da reação muda de violeta para amarelo (Figura 16). Esse método tem sido bastante utilizado pela sua rapidez e praticidade (ALEZANDRO, 2009; BERTOLDI, 2006).

Figura 16. Reação envolvida na neutralização do radical DPPH por um antioxidante.



(Fonte: OLIVEIRA, 2015)

Assim, o experimento foi realizado como descrito por Garcez et al., 2009, com metanol como solvente. O DPPH foi preparado a 0,3 mM e 100 μ L dessa solução foi adicionado à 100 μ L das amostras de diferentes concentrações do extrato (10, 20, 40, 80 e 160 μ g / mL), determinadas de acordo com triagem inicial, já nas microplacas de 96 poços. Essa reação foi mantida em repouso e ao abrigo da luz por 30 min, sendo a leitura feita em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) em comprimento de onda de 518 nm. A atividade sequestradora de radicais foi calculada em porcentagem através da

Equação 5.

Equação 5. Fórmula para cálculo da porcentagem de redução dos radicais DPPH.

$$(\% AS) = \frac{(A_{\text{controle negativo}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle negativo}}} \times 100$$

Onde,

% A = porcentagem da atividade sequestradora de radicais

$A_{\text{controle negativo}}$ = Absorbância do controle negativo

A_{amostra} = Absorbância da amostra

A partir dessa fórmula, a atividade sequestradora foi expressa em CE_{50} , é a concentração necessária para reduzir 50% dos radicais DPPH. O controle negativo foi feito com DPPH e metanol e o controle positivo foi feito com ácido ascórbico (AA) nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Todas as análises foram feitas em triplicata e repetidas por três dias.

4.6. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

O FPS de um filtro solar é mundialmente definido pelas autoridades competentes como sendo um índice quantitativo de proteção da pele contra eritemas e deve ser o principal fator considerado na escolha do produto. Na prática, o FPS aumenta o tempo de exposição ao sol permitida para uma pessoa sem que haja a produção de eritemas, portanto, quanto maior o FPS, maior o tempo de exposição, mas vale ressaltar o fato de que esse fator é uma proteção exclusiva contra os raios UVB que são os maiores causadores de eritemas solares (PASSERON et al., 2019).

Para o teste, todos os extratos foram incorporados em base cosmética (creme Polawax®) na concentração de 10% e essa preparação foi diluída em etanol PA a uma concentração de 0,2 mg/mL. Posteriormente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro UV visível, UV-2550 Shimadzu com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a faixa do espectro avaliada foi entre 290

a 400 nm, utilizando etanol PA também como branco. A análise foi feita em triplicata.

Para a determinação do FPS do extrato, o cálculo foi baseado na Equação 6 abaixo desenvolvida por Mansur et al., 1986, e que é muito utilizada até hoje, por apresentar boa correlação com os métodos *in vivo*, ser rápido e prático (MASKE et al., 2013). Para isso, foi utilizado o espectrofotômetro UV visível, UV-2550 Shimadzu, em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, etanol PA como branco e todas as análises foram realizadas em triplicata.

Equação 6. Fórmula para o FPS *in vitro*.

$$FPS = FC. \sum_{290}^{320} EE(\lambda).I(\lambda).ABS(\lambda)$$

Onde,

FC = 10 (Fator de correção)

EE(λ) = Efeito eritematogênico

I(λ) = intensidade do sol

ABS(λ) = absorbância

Nesta fórmula, o produto de **EE.I** já é tabelado na literatura exatamente para os comprimentos de onda na faixa entre 290 – 320 nm, como pode ser observado na Tabela 8 abaixo:

Tabela 8. Ponderação empregada no cálculo de FPS *in vitro*.

Comprimento de onda	EE(λ).I(λ)
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

(Fonte: SAYRE et al., 1979)

4.7. Estudo de sazonalidade do extrato de *P. amboinicus*

Esse estudo teve como objetivo avaliar as alterações sazonais na composição química no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *P. amboinicus*, inferindo as características temporais (mês a mês) do marcador químico da espécie, da produção quantitativa de fenólicos e flavonoides totais, a resposta antioxidante de cada extrato produzido, bem como o comportamento do FPS, de forma a possibilitar a geração de informações relevantes para o cultivo e coleta da espécie em estudo.

Assim, os extratos foram preparados mês a mês, para a determinação do teor dos metabólitos secundários de janeiro a dezembro de 2019. Todas as quantificações, bem como a atividade antioxidante e determinação do FPS foram feitas a partir dos métodos já descritos anteriormente e foi observada se haveria correlação entre a quantidade de metabólitos produzidas e as atividades estudadas. O índice pluviométrico e nível de radiação solar também foram utilizados para observação de sua possível interferência tanto na produção dos metabólitos quanto nas atividades estudadas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.8. Coleta do material vegetal e produção dos extratos de *P. amboinicus*

O procedimento de coleta e produção do extrato etanólico bruto foi feita seguindo o método de maceração já descrito, a única alteração realizada foi na quantidade de material vegetal coletado, que para este estudo, foi de 500 g. A quantidade de extrato anual média obtida foi de 12,37 g, mas a quantidade obtida em cada mês pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9. Quantidade de extrato obtida em cada mês do ano.

Mês	Quantidade (g)
Janeiro	12,9
Fevereiro	13,47
Março	10,37
Abril	10,98
Maio	11,77
Junho	10,7
Julho	14,02

Agosto	13,83
Setembro	12,17
Outubro	12,05
Novembro	12,96
Dezembro	13,25

(TERTO, 2020)

4.9. Análise estatística

A análise estatística foi feita por comparação estabelecida através da Análise de Variância (ANOVA one way), onde os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Também foi utilizado o teste t student quando necessário e, como pós teste para o ANOVA, foi feito o teste de Tukey, sendo para isso utilizando o programa GraphPad Prism 7.0, o nível de significância adotado foi de 95%. Para a obtenção das curvas de calibração e regressões lineares foi utilizado Excel® 2010. Também foi realizada análise de componentes principais (PCA) para observar possíveis correlações dos diferentes grupos de dados obtidos no estudo de sazonalidade e, esta análise foi realizada com o programa Orange statistic 3.4.

Resultados e discussão

5 - Resultados e discussão

5.1. Determinação do perfil químico do extrato de *P. amboinicus* por CLAE-IES-EMⁿ

Através da análise feita por CLAE-IES-EMⁿ em modo negativo, foi possível fazer a detecção de 31 compostos a partir do estudo de suas fragmentações e a comparação com a literatura, onde foi visto que a grande maioria das substâncias identificadas pertenciam a classe dos compostos fenólicos.

Assim, foram detectados 11 ácidos fenólicos, 15 flavonoides em sua maioria ligados a açúcares, 1 lignana, um dissacarídeo, o ácido cítrico e o ácido tuberônico-hexosídeo, onde 18 substâncias estão sendo reportadas pela primeira vez na espécie (ácido siríngico-O-hexosídeo, taxifolina hexosídeo, ácido *p*-cumárico-O-hexosídeo, ácido tuberônico hexosídeo, ácido prolithospérmico, ácido lithospérmico, siringaresinol hexosídeo, ácido salvianólico E, ácido rosmarínico-O-hexosídeo, luteolina-O-hexosídeo, luteolina-O-glucuronídeo, apigenina-7-O-hexosídeo, apigenina-7-O-glucuronídeo, crisoeriol-7-O-glucuronídeo, tricina-O-hexosídeo, luteolina acetil hexosídeo, ácido salvianólico F e tricina).

O cromatograma de íons totais do extrato pode ser observado através da Figura 17 e as fragmentações de todos os compostos podem ser encontradas na Tabela 10.

Figura 17. Cromatograma do pico base do extrato de *P. amboinicus* avaliado por CLAE-IES-EMⁿ.

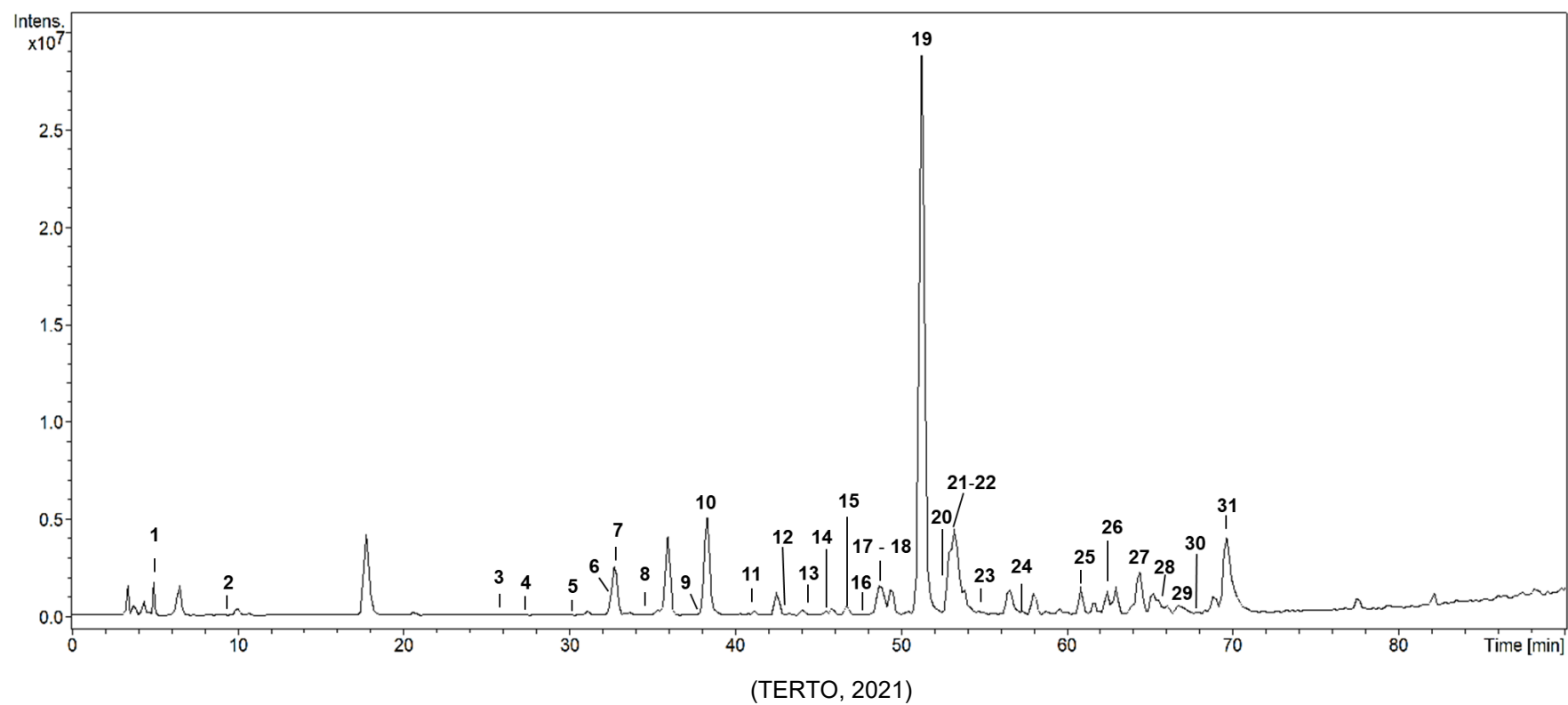


Tabela 10. Compostos identificados tentativamente de *P. amboinicus* por CLAE-IES-EMⁿ no extrato de *P. amboinicus*.

Pico	T. R.	[M-H] ⁻	MS ⁿ m/z	Composto	Referências
1	5,1	341	MS ² [341]: 179, 161, 149; 143, 131 MS ³ [341 → 179]: 161, 131, 143, 119, 101, 89	Dissacarídeo	JIN et al., 2018; TAYLOR et al., 2005; VERARDO; DUSE; CALLEA, 2009
2	9,8	191	MS ² [191]: 173, 129, 111	Ácido cítrico	FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010; LI et al., 2016b
3	26,0	359	MS ² [359]: 197 MS ³ [359 → 197]: 182, 153, 138	Ácido siríngico-O-hexosídeo	ELSADIG KARAR; KUHNERT, 2016; HOFMANN; NEBEHAJ; ALBERT, 2016
4	26,7	465	MS ² [465]: 447, 303, 285, 177 MS ³ [465 → 303]: 285, 177, 125	Taxifolin hexosídeo	CAMPELO et al., 2020; KANG et al., 2016
5	31,6	325	MS ² [325]: 163, 119 MS ³ [325 → 163]: 119	Ácido <i>p</i> -cumárico-O-hexosídeo	FANG; YU; PRIOR, 2002; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015
6	35,7	179	MS ² [179]: 135	Ácido caféico	CHEN et al., 2011; KANG et al., 2016
7	36,0	387	MS ² [387]: 369, 225, 207; 163	Ácido tuberónico hexosídeo	ABU-REIDAH et al., 2019; QUIRANTES-PINÉ et al., 2010; TAAMALLI et al., 2015
8	37,0	385	MS ² [385]: 223 MS ³ [385 → 223]: 208, 179, 164	Ácido sinápico-O-hexosídeo	BYSTROM et al., 2008; SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015
9	37,8	357	MS ² [357]: 313, 269, 159	Ácido Prolithospermico	(CHEN et al., 2011; STANOEVA et al., 2017)
10	38,3	593	MS ² [593]: 575, 503, 413, 473, 383, 353	Apigenina 6, 8-di-C-glucosídeo	IBRAHIM et al., 2015; OZAROWSKI et al., 2018; SILVA et al., 2015
11	40,6	537	MS ² [537]: 493, 313, 295 MS ³ [537 → 493]: 313, 295 MS ³ [537 → 295]: 277	Ácido Lithospermico	ZENG et al., 2006; ZHU et al., 2007

12	43,3	303	MS ² [303]: 285, 275, 177, 125	Taxifolin	KANG et al., 2016; SAÉZ et al., 2019
13	44,1	163	MS ² [163]: 119	Ácido cumárico	CHEIRAN et al., 2019; FANG; YU; PRIOR, 2002
14	45,6	579	MS ² [579]: 417 MS ³ [579→417]: 402, 181, 166, 151	Siringaresinol hexosideo	EKLUND et al., 2007; SANZ et al., 2012
15	46,8	717	MS ² [717]: 537, 519, 339, 321 MS ³ [717→519]: 339, 321	Ácido salvianolic B/E	WANG et al., 2012; ZHU et al., 2007
16	47,8	521	MS ² [521]: 359 MS ³ [521→359]: 197, 179, 161	Ácido Rosmarínico-O- hexosideo	CIRLINI et al., 2016; JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2017
17	48,2	447	MS ² [447]: 285 MS ³ [447→285]: 243, 241, 217, 199, 175, 151, 133	Luteolina-O- hexosideo	ELSADIG KARAR; KUHNERT, 2016; FRIŠČIĆ; BUCAR; HAZLER PILEPIĆ, 2016
18	48,5	461	MS ² [461]: 285 MS ³ [461→285]: 243, 241, 217, 199, 175, 151, 133	Luteolina-O- glucuronideo	GU et al., 2012; PEREIRA et al., 2013
19	51,2	359	MS ² [359]: 197, 179, 161	Ácido Rosmarínico	(ZENG et al., 2006)
20	52,3	431	MS ² [431]: 269 MS ³ [431→269]: 241, 227, 225, 201, 183, 181, 159, 151, 149, 117, 107	Apigenina-7-O- hexosideo	(PIKULSKI; BRODBELT, 2003)
21	53,1	445	MS ² [445]: 269 MS ³ [445→269]: 241, 227, 225, 201, 183, 181, 159, 151, 149, 117, 107	Apigenina-7-O- glucuronídeo	FRIŠČIĆ; BUCAR; HAZLER PILEPIĆ, 2016
22	53,2	475	MS ² [475]: 299; 284 MS ³ [475→299]: 284 MS ³ [475→284]: 256	Crisoeriol-7-O- glucuronídeo	BARREIRA et al., 2014; OLENNIKOV et al., 2018
23	55,1	287	MS ² [287]: 151; 135, 125, 107	Eriodictiol	BRITO et al., 2014; DESTA et al., 2017; FABRE et al., 2001

24	56,9	491	MS ² [491]: 329 MS ³ [491→329]: 314, 299	Tricina-O-hexosideo	KANG et al., 2016; SPÍNOLA et al., 2014)
25	60,7	489	MS ² [489]: 285 MS ³ [489→285]: 243, 241, 217, 199, 175, 151, 133	Luteolina acetil hexosideo	JUSTESEN, 2000
26	62,3	285	MS ² [285]: 243, 241, 217, 199, 175, 151, 133	Luteolina	CHEN et al., 2016; FABRE et al., 2001; KANG et al., 2016
27	64,4	313	MS ² [313]: 269 MS ³ [313→269]: 159, 109	Ácido salvianólico F	CIRLINI et al., 2016; LIU et al., 2007
28	65,4	329	MS ² [329]: 314, 299 MS ³ [329→314]: 299 MS ³ [329→299]: 271	Tricina	KANG et al., 2016; SHAO et al., 2020; ZHONG et al., 2019
29	66,7	269	MS ² [269]: 241, 227, 225, 201, 183, 181, 159, 151, 149, 117, 107	Apigenina	FABRE et al., 2001; FRIŠČIĆ; BUCAR; HAZLER PILEPIĆ, 2016; TROALEN et al., 2014
30	67, 0	299	MS ² [299]: 284 MS ³ [299→284]: 256	Crisoeriol	FRIŠČIĆ; BUCAR; HAZLER PILEPIĆ, 2016
31	69,6	313	MS ² [313]: 298; 283 MS ³ [313→298]: 283, 269 MS ³ [313→283]: 255	Canferol-dimetil éter	FALCÃO et al., 2013; SCHMEDA-HIRSCHMANN; QUISPE; GONZÁLEZ, 2015

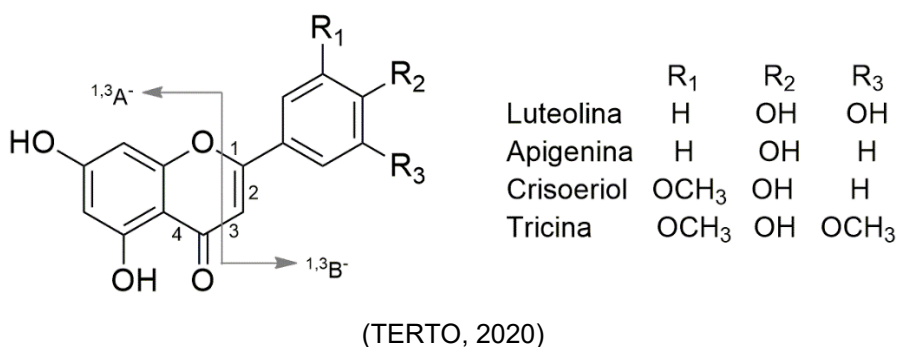
(TERTO, 2021)

5.1.1. Análise dos padrões de fragmentação das flavonas presentes no extrato

O pico 26 ($[M-H]^-$ m/z 285) exibiu no espectro de EM^2 o perfil de fragmentação composto pelos íons fragmentos: m/z 243 $[M-H-C_2H_2O]^-$, m/z 241 $[M-H-CO_2]^-$, m/z 217 $[M-H-C_3O_2]^-$, m/z 175 $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]^-$ e os íons produtos gerados por Retro-Diels-Alder (RDA) $^{1,3}A^-$ com m/z 151 e $^{1,3}B^-$ com m/z 133, através da comparação dos espectros EM^2 e vias de fragmentação o pico 26 foi tentativamente identificado como luteolina (Figura 18), outros três derivados da luteolina também foram identificados (17, 18 e 25).

O pico 17 ($[M-H]^-$ m/z 447) apresentou no espectro de EM^2 a perda neutra de 162 Da (m/z 285), no espectro de EM^3 $[447 \rightarrow 285]$ foram observados os íons fragmentos característicos da luteolina. Desta forma, a fragmentação em EM^2 e EM^3 fornece suporte à proposta do pico 17 como luteolina-O-hexosídeo. O pico 18 $[M-H]^-$ com m/z 461 apresentou no espectro EM^2 como pico base, o íon fragmento com m/z 285 $[M-H-176]^-$, indicando a perda de uma unidade de ácido glucurônico, permitindo assinalar a molécula como luteolina-O-glucuronídeo. O pico 25 ($[M-H]^-$ m/z 489) exibiu em EM^2 o íon produto com m/z 285 $[M-H-204]^-$, indicativo de unidade hexose com grupo acetil ($162 + 42 = 204$), possibilitando identificar tentativamente o pico 25 como luteolina acetil hexosídeo.

Figura 18. Estrutura das agliconas de flavonas estudadas e representação da reação de (RDA).



No tempo de retenção de 66,7 minutos foi observado o pico 29 ($[M-H]^-$ m/z 269), seu espectro de EM^2 apresentou como íons produtos: m/z 241 $[M-H-CO]^-$

m/z 227 $[M-H-C_2H_2O]^-$, m/z 225 $[M-H-CO_2]^-$, m/z 201 $[M-H-C_3O_2]^-$, m/z 183 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$, m/z 181 $[M-H-CO_2-CO_2]^-$, m/z 159 $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]^-$, por RDA, a fragmentação $^{1,3}B^-$ exibiu o íon com m/z 117 e por $^{1,3}A^-$ o íon fragmento m/z 151 com posterior perda de CO_2 (m/z 107), a fragmentação $^{0,2}A^-$ resultou na perda neutra de 120 Da pela reciclagem do anel C, produzindo o íon fragmento com m/z 149, estes padrões de fragmentações possibilitaram identificar tentativamente o pico 29 como apigenina. Os picos 10, 20 e 21 foram associados a derivados da apigenina.

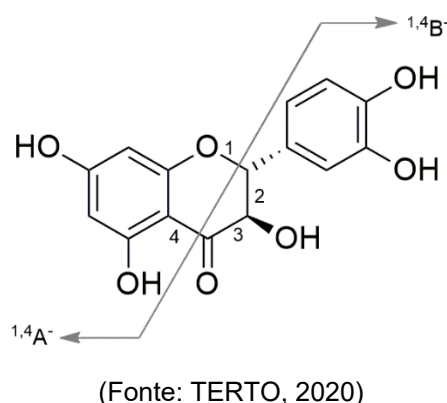
O pico 20 ($[M-H]^-$ m/z 431) apresentou no espectro de EM^2 o íon fragmento com m/z 269 $[M-H-162]^-$ caracterizando a perda de uma unidade hexose, sugerindo a molécula apigenina-O-hexosídeo para o pico 20. O pico 21 ($[M-H]^-$ m/z 445) exibiu em EM^2 o íon produto com m/z 269 $[M-H-176]^-$ indicando a perda neutra característica de uma unidade de ácido glucurônico, associando ao pico 21, o composto apigenina-O-glucuronídeo. Apigenina 6,8-di-C-glucosídeo foi tentativamente identificada para o pico 10 através do íon precursor $[M-H]^-$ com m/z 593 e fragmentação característica com perdas de 90 e 120 Da correspondentes a unidades C-glicosil observadas no espectro de EM^2 : m/z 575 $[M-H-18]^-$, m/z 503 $[M-H-90]^-$, m/z 473 $[M-H-120]^-$, m/z 413 $[M-H-90-90]^-$, m/z 383 $[M-H-90-120]^-$ e m/z 353 $[M-H-120-120]^-$.

A estrutura do crisoeriol foi proposta para o pico 30 ($[M-H]^-$ m/z 299) através da observação em EM^2 do íon fragmento m/z 284, correspondente à perda de 15 Da $[M-H-CH_3]^-$, e em EM^3 $[299 \rightarrow 284]$ do íon produto m/z 256, indicativo da perda de uma unidade CO (28 Da) do anel C. O pico 22 ($[M-H]^-$ m/z 475) apresentou em EM^2 o íon fragmento com m/z 299 correspondente a perda de 176 Da, e em EM^3 íons fragmentos característicos da aglicona crisoeriol, desta forma, o pico 22 foi tentativamente identificado como crisoeriol-O-glucuronídeo. O íon precursor ($[M-H]^-$ m/z 329) foi detectado em 65,4 minutos para o pico 28, apresentando em EM^2 perdas características de 15 Da, m/z 299 $[M-H-15]^-$ e m/z 314 $[M-H-15-15]^-$, em EM^3 $[329 \rightarrow 299]$ exibiu o íon fragmento m/z 271, indicativo da perda de 28 Da, permitindo atribuir ao pico 28 o composto tricina. O pico 24 ($[M-H]^-$ m/z 491) apresentou em EM^2 a perda neutra de 162 Da (m/z 329) e EM^3 o perfil de fragmentação da tricina, desta forma, o pico 24 foi tentativamente identificado como tricina-O-hexosídeo.

5.1.2. Análise dos padrões de fragmentação dos flavanois presentes no extrato

No tempo de retenção de 43,3 minutos o pico 12 apresentou o íon precursor com m/z 303 $[M-H]^-$, cuja fragmentação: m/z 285 $[M-H-H_2O]^-$, m/z 275 $[M-H-CO]^-$ e fragmentações $^{1,4}A^-$ com m/z 125 e $^{1,3}B^-$ com m/z 177 são características e atribuídas à molécula da taxifolina (Figura 19). O pico 4 ($[M-H]^-$ m/z 465) exibiu em EM² a perda de 162 Da (m/z 303), de acordo com seu padrão de fragmentação em EM² e EM³ o pico 4 foi tentativamente identificado como taxifolina hexosídeo.

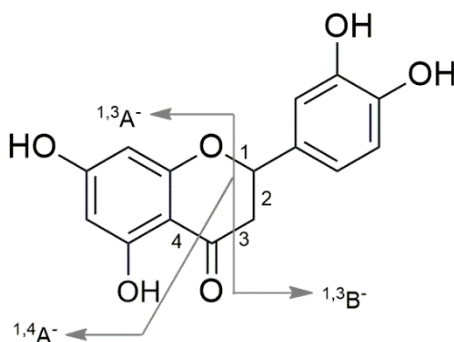
Figura 19. Estrutura da taxifolina e representação da proposta de fragmentação do anel C.



5.1.3. Análise dos padrões de fragmentação da flavanona presente no extrato

O pico 23 exibiu o íon precursor com m/z 287 $[M-H]^-$, e no espectro de EM² íons produtos com típica fragmentação RDA $^{1,3}B^-$ com m/z 135 e $^{1,3}A^-$ com m/z 151 e posterior perda de CO_2 com m/z 107, além da fragmentação $^{1,4}A^-$ com m/z 125 permitindo propor para o pico 23, o composto eriodictiol (Figura 20).

Figura 20. Estrutura da eriodictiol e representação da proposta de fragmentação do anel C.

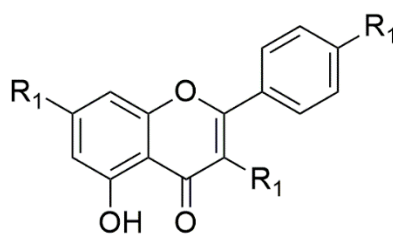


(Fonte: TERTO, 2020)

5.1.4. Análise dos padrões de fragmentação do flavonol presente no extrato

O pico 31 ($[M-H]^-$ m/z 313) apresentou em EM^2 os íons fragmentos m/z 298 $[M-H-15]^-$ e m/z 283 $[M-H-30]^-$, característicos de perdas consecutivas de grupo metil, no espectro de EM^3 $[313 \rightarrow 283]$ exibiu o íon produto m/z 255 correspondente a perda de 28 Da. O perfil de fragmentação apresentando em EM^2 e EM^3 possibilita identificar tentativamente o pico 31 como Canferol dimetil éter (Figura 21).

Figura 21. Representação da estrutura do Canferol dimetil éter.



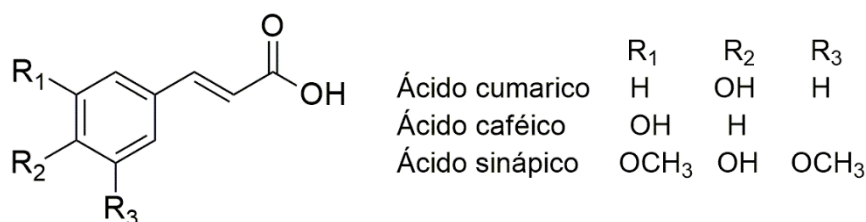
$R_1 = OH$ ou OCH_3

(Fonte: TERTO, 2020)

5.1.5. Análise dos padrões de fragmentação dos ácidos fenólicos e orgânicos

Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (Figura 22) apresentam perdas características de 44 Da devido à perda neutra de unidade CO₂. O pico 13 ([M-H]⁻ *m/z* 163) e 6 ([M-H]⁻ *m/z* 179), exibiram no espectro de EM² os íon fragmentos *m/z* 119 [M-H-CO₂]⁻ e *m/z* 135 [M-H-CO₂]⁻, respectivamente. Desta forma, o pico 13 foi tentativamente identificado como ácido *p*-cumárico e o pico 6 como ácido caféico. O pico 5 ([M-H]⁻ *m/z* 325), apresentou em EM² o íon produto *m/z* 163 [M-H-162]⁻, e no espectro de EM³ [325→163] exibiu o íon fragmento com *m/z* 119 [M-H-162-44]⁻ permitindo atribuir ao pico 5 o composto ácido *p*-cumárico-O-hexosídeo. Para o pico 8 ([M-H]⁻ *m/z* 385) foi observado no espectro de EM² a perda neutra de 162 Da (*m/z* 223) e em EM³ [385→223], os íons fragmentos: *m/z* 208, através da eliminação radical de •CH₃ (15 Da); *m/z* 179, devido a perda de CO₂ e *m/z* 164 pela perda sequencial de •CH₃ e CO₂, identificando tentativamente o pico 8 como ácido sinápico-O-hexosídeo.

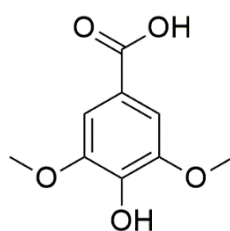
Figura 22. Estrutura das agliconas dos derivados do ácido cinâmico observados.



(Fonte: TERTO, 2020)

O pico 3 ([M-H]⁻ *m/z* 359), exibiu em EM² o íon fragmento com *m/z* 197 [M-H-162]⁻, indicando a presença de unidade O-hexosídeo, a observação dos íons produtos em EM³ foi compatível com o perfil de fragmentação reportado para o ácido sirínico (Figura 23): *m/z* 182 [M-H-15]⁻, *m/z* 153 [M-H-44]⁻ e *m/z* 138 [M-H-15-44]⁻ permitindo assinalar a molécula como ácido sirínico-O-hexosídeo.

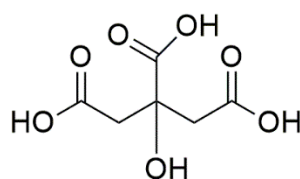
Figura 23. Estrutura do ácido siríngico.



(TERTO, 2020)

Ácidos orgânicos também foram observados, o pico **2** ($[M-H]^-$ m/z 191) através dos íons fragmentos em EM²: m/z 173 $[M-H-H_2O]^-$, m/z 129 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ e m/z 111 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ foi tentativamente identificado como ácido cítrico (Figura 24. Estrutura do ácido cítrico.(Figura 24).

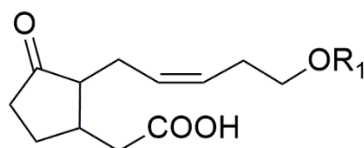
Figura 24. Estrutura do ácido cítrico.



(TERTO, 2020)

O pico **7** ($[M-H]^-$ m/z 387) exibiu no espectro de EM²: m/z 369 $[M-H-H_2O]^-$, m/z 225 $[M-H-162]^-$, m/z 207 $[M-H-180]^-$ e m/z 163 $[M-H-180-CO_2]^-$, perfil de fragmentação consistente com os reportados para os jasmonatos, desta forma, o pico 7 foi tentativamente identificado como ácido tuberônico hexosídeo (Figura 25).

Figura 25. Estrutura do ácido tuberônico hexosídeo.



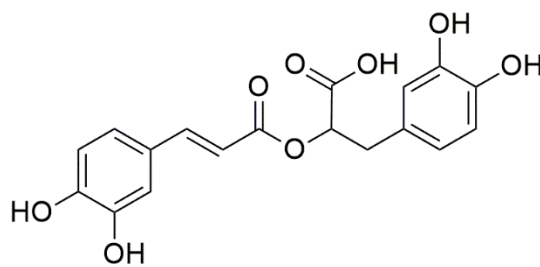
R_1 = Hexosídeo

(TERTO, 2020)

5.1.6. Análise dos padrões de fragmentação do ácido rosmarínico e outros compostos

O ácido rosmarínico (Figura 26) foi proposto para o pico 19 ($[M-H]^-$ m/z 359), devido à observação do íon fragmento m/z 161 relacionado à perda neutra do ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (ADL) (198 Da), m/z 179 correspondente a perda neutra do ácido caféico (CA) (180 Da) e m/z 197 associado à desprotonação do ADL. O pico 16 apresentou como fragmentação principal para seu íon precursor com m/z 521 $[M-H]^-$ a perda de 162 Da (m/z 359), o perfil de fragmentação em EM^3 [521→359] exibiu os íons produto m/z 197, 179 e 161, desta forma, o pico 16 foi tentativamente caracterizado como ácido rosmarínico-O-hexosídeo.

Figura 26. Estrutura do ácido rosmarínico.

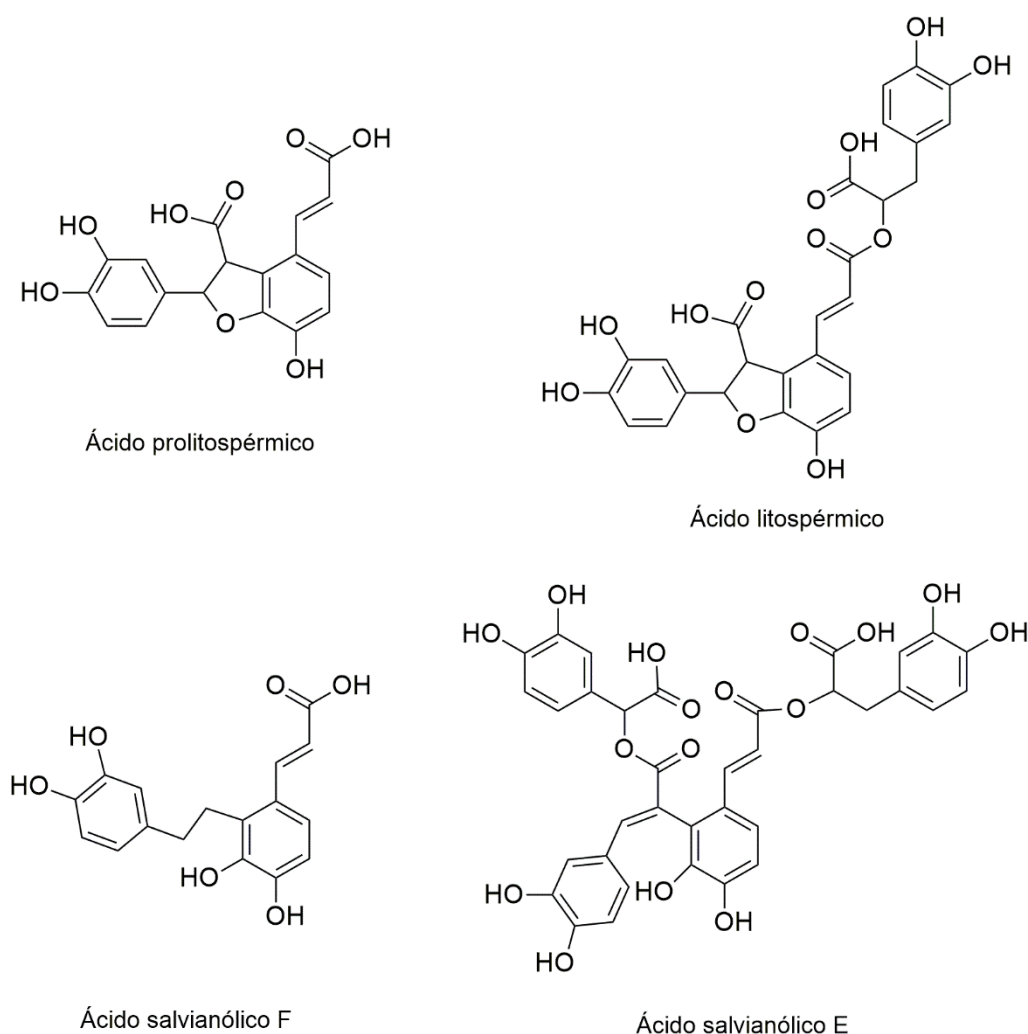


(TERTO, 2020)

O pico 11 ($[M-H]^-$ m/z 537) exibiu em EM^2 o íon fragmento m/z 493, associado à perda de CO_2 , m/z 313 $[M-H-CO_2-180]^-$ e m/z 295 relacionado à saída sequencial de ADL $[M-H-CO_2-198]^-$, baseado neste perfil de fragmentação o pico 11 foi tentativamente identificado como ácido litospérmico (Figura 27). O pico 9 ($[M-H]^-$ m/z 357) apresentou no espectro de EM^2 os íons produtos com m/z 313 $[M-H-CO_2]^-$ e m/z 269 $[M-H-2CO_2]^-$, sendo identificado tentativamente como ácido prolitospérmico. O pico 27 ($[M-H]^-$ m/z 313) exibiu em EM^2 o íon fragmento com m/z 269 $[M-H-CO_2]^-$ e em EM^3 [313→269] a presença proeminente do íon fragmento com m/z 159, associado à perda de uma unidade de dihidroxibenzeno após a saída de CO_2 , sendo então o pico 27 identificado tentativamente como ácido salvianólico F. No pico 15 ($[M-H]^-$ m/z 717) é observado em EM^2 os íons fragmentos: m/z 519 $[M-H-198]^-$, m/z 537 $[M-H-180]^-$,

m/z 339 $[M-H-198-180]^-$ e m/z 321 $[M-H-198-198]^-$, perfil de fragmentação reportado para os isômeros ácido salvianólico B e E. RUAN et al., 2012 indica que o íon fragmento m/z 537 mais intenso seria característico ao ácido salvianólico E (como foi observado no espectro de EM^2). GRZEGORCZYK-KAROLAK et al., 2018 aponta que o ácido salvianólico B tende a eluir após o pico do ácido rosmarínico, enquanto o ácido salvianólico E elui antes do ácido rosmarínico, este perfil de eluição foi observado no trabalho de outros autores CIRLINI et al., 2016; LI et al., 2019; LIU et al., 2007; RUAN et al., 2012; TAAMALLI et al., 2015; WANG et al., 2012; ZHAO et al., 2016 com base nestes dados o pico 15 foi tentativamente identificado como ácido salvianólico E.

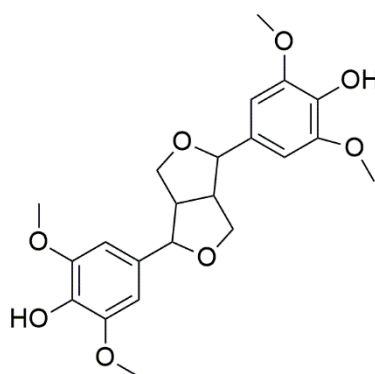
Figura 27. Estrutura dos derivados do ácido rosmarínico observados.



5.1.8. Análise dos padrões de fragmentação da lignana presente no extrato

O pico 14 ($[M-H]^-$ m/z 537) exibiu em EM² o íon fragmento com m/z 417 atribuído a perda de uma unidade hexosídeo (162 Da), no espectro de EM³ [537→417] foi observado os íons produtos com m/z 402, 181, 166 e 151, perfil de fragmentação característico de lignanas furânicas metoxiladas, consistentes ao reportado para a molécula do siringaresinol (Figura 28), desta forma, o composto siringaresinol hexosídeo foi proposto para o pico 14.

Figura 28. Estrutura do siringaresinol.



(Fonte: TERTO, 2020)

5.1.9. Análise dos padrões de fragmentação do açúcar detectado no extrato

O pico 1 ($[M-H]^-$ m/z 341) exibiu perfil de fragmentação característico de dissacarídeos, através da observação dos íons fragmentos associado a saída de monossacarídeo (m/z 179 e 161) e pelas múltiplas perdas de H₂O e CH₂O (m/z 149, 143, 131 e 119).

Diante da identificação desses compostos, é interessante ressaltar a sua importância do ponto de vista biológico, já que inúmeros são os estudos mostrando a relação de compostos fenólicos (incluindo a grande maioria dos compostos presentes em *P. amboinicus*) e atividade antioxidante (BOCHAROVA, 2018; GUO, 2009; MENAA; MENAA; TRÉTON, 2014; RYAN et al., 2019; SROKA; CISOWSKI, 2003; ZUNJAR; MAMMEN; TRIVEDI, 2015), bem

como sua relação com a fotoproteção, já que em dados da literatura, foi visto que o ácido cumárico, por exemplo, apresenta FPS = 9.3 e absorbância máxima em 290 nm, dando uma característica de filtro UVB, o ácido cafeico apresenta FPS = 28 e absorbância máxima em 320 nm, mostrando características de um filtro também UVB, a apigenina apresenta FPS = 28.8 e absorbância máxima em 330 nm já tendo uma característica um pouco voltada também para a proteção UVA, e o canferol que apresenta um FPS = 24.9 e absorbância máxima em 365 nm dando características de um filtro solar de amplo espectro (STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014), embora seja necessário determinar sua proteção UVA para confirmar.

Dessa forma, baseado no perfil químico da espécie *P. amboinicus*, pode-se observar que seu extrato apresenta uma combinação de substâncias bastante interessantes e potencialmente benéficas para o desenvolvimento de um fotoprotetor de amplo espectro e com característica antioxidante.

5.2. Manuscrito intitulado “Photoprotective activity of *Plectranthus amboinicus* extracts and HPLC quantification of rosmarinic acid” publicado em 2020 pela Revista Brasileira de Farmacognosia

Original article

Photoprotective activity of *Plectranthus amboinicus* extracts and HPLC quantification of rosmarinic acid

*Márcio Vinícius C. Terto^a; Juliana M. Gomes^a; Diego Igor A. F. Araújo^a; Taina S. Silva^d;
Jailson M. Ferreira^c; João Jarllys N. Souza^b; Marcelo S. Silva^a; Josean F. Tavares^{a*}*

^aLaboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^cLaboratório de Caracterização de Nanomateriais, Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^dInstituto Federal da Paraíba, Catolé do Rocha, PB, Brazil

Correspondence: Josean Fechine Tavares* - josean@lftf.ufpb.br

Received 17 September 2019; Accepted 21 December 2019

ORCID ID

Márcio Vinícius C. Terto: 0000-0002-9754-7162

Juliana M. Gomes: 0000-0001-5345-0935

Diego Igor A. F. Araújo: 0000-0002-8032-6240

Taina S. Silva: 0000-0002-1453-7111

Jailson M. Ferreira: 0000-0002-2964-6812

João Jarllys N. Souza: 0000-0001-5546-3633

Marcelo S. Silva: 0000-0003-3451-8468

Resumo: Exposição excessiva ao sol tem efeitos danosos na pele e, pode causar eritemas e câncer de pele. Agentes fotoprotetores são importantes para a prevenção à exposição ao sol e estão presentes na composição de protetores solares. Globalmente, o uso de filtros solares baseados em produtos naturais tem ganhado interesse da comunidade científica; pois além de suas propriedades fotoprotetoras, esses produtos demonstraram atividade antioxidante, cicatrizante e hidratante. Eles favorecem uma proteção solar adequada devido ao amplo espectro de atividade e são ecologicamente mais corretos. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae é usada na medicina popular para tratar várias condições e é comumente conhecida como “hortelã-da-folha-grossa” no Brasil. Essa espécie apresenta compostos fenólicos, incluindo o ácido rosmarínico e, estudos da sua atividade antioxidante e fotoprotetoras tem sido feitos. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial fotoprotetor e atividade antioxidante e desenvolver uma metodologia analítica para a padronização e validação do extrato. Assim, a absorbância máxima, o fator de proteção solar, a atividade sequestradora de radicais DPPH e o teor de compostos fenólicos do extrato etanólico bruto de *P. amboinicus* foram determinados e uma metodologia analítica de HPLC foi desenvolvida e validada para quantificar o ácido rosmarínico. As análises revelaram que o extrato apresenta bom fator de proteção solar (FPS = 12,63), atividade antioxidante promissora ($EC_{50} = 112,39 \mu\text{g/ml}$), teor de compostos fenólicos ($142.39 \pm 1.12 \text{ mg EAG/g}$), e concentração de ácido rosmarínico de ($22,5 \mu\text{g/ml}$). Além da validação da metodologia analítica de PLC para a quantificação do marcador. Esses resultados mostraram que o extrato tem potencial fotoprotetor e antioxidante e isso favorece o desenvolvimento de um produto final com características fotoprotetoras que englobem um amplo espectro de ação e proteção biológica.

Palavras – chave: Fotoproteção, ultravioleta, radiação solar, danos à pele, “hortelã-da-folha grossa”

Conflito de interesse: Todos os autores declaram não ter conflitos de interesse

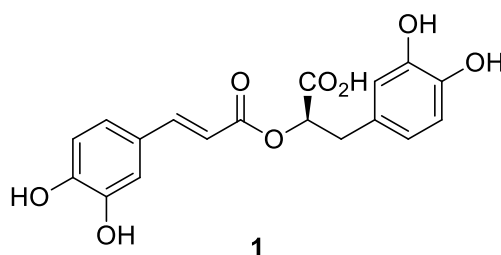
Introdução

A radiação ultravioleta (UV) pode causar problemas agudos e crônicos de pele. Esses processos estão relacionados à ação da radiação UVA e UVB quando a pele é exposta a quantidades excessivas de luz solar (Souza et al. 2011; Tosato et al. 2015).

Para uma ação fotoprotetora efetiva, um produto deve apresentar proteção contra radiação UV de amplo espectro, correspondendo à radiação UVB (290–320 nm) e UVA (320–400 nm). O mercado mundial passou a utilizar mais filtros de origem natural, pois apresentam efeitos colaterais reduzidos, são menos agressivos ao meio ambiente, apresentam capacidade de hidratação dérmica e são compostos fenólicos com atividade antioxidante que podem eliminar radicais livres nocivos gerados pela exposição excessiva ao sol (Ferdinando et al. 2014; Mercurio et al. 2015).

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., Lamiaceae, é uma planta medicinal amplamente utilizada na Índia, China e Brasil para o tratamento de diversas doenças (Murthy et al. 2009; El-hawary et al. 2012; Arumugam et al. 2016). No Brasil, esta espécie é popularmente conhecida como “hortelã-da-folha-grossa” e é principalmente utilizada contra doenças respiratórias e infecções microbianas (França et al. 2008; Nogueira et al. 2008; Paulo et al. 2009). Estudos têm demonstrado que esta planta possui atividades antiinflamatórias, antioxidantes, analgésicas e antimicrobianas, que podem estar relacionadas com a existência de compostos fenólicos (El-hawary et al.

2012; Arumugam et al. 2016 and Sulaiman et al. 2018). Entre eles, o ácido rosmarínico (**1**) é notável e tem sido alvo de estudos em fotoproteção (Psotova et al. 2006; Sánchez-Campillo et al. 2009), tendo boa atividade antioxidante já descrita (Gil ede et al., 2013; Amoah et al. 2015; Zhu et al., 2019).



Assim, considerando o potencial terapêutico do extrato de *P. amboinicus*, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial fotoprotetor e atividade antioxidante de *P. amboinicus*, e desenvolver e validar metodologia analítica para padronização desse extrato.

Material e Métodos

Material vegetal

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., Lamiaceae, foi coletada em 4 de abril de 2017 na Universidade Federal da Paraíba, Instituto de Pesquisas Farmacêuticas (Coordenadas: 7°8'29.875"S/34°50'48.757"W), Campus I, João Pessoa, PB. Um espécime foi depositado no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB / UFPB) sob o número de acesso JPB0047239; essa espécie foi identificada pela Profa. Rita Baltazar de Lima e registrada na plataforma do SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado) sob a referência AAB0FA6.

Preparação do extrato etanólico bruto

As partes aéreas frescas (2.150 kg) foram moídas grosseiramente e maceradas em etanol 95% por três dias consecutivos; este processo foi repetido três vezes. Foram utilizados três litros de etanol para cada repetição, totalizando 9 litros de etanol ao longo da maceração. Após a extração, a solução extraída foi concentrada em um evaporador rotativo a 40 °C para gerar o extrato etanólico bruto (EEB). Após evaporação do solvente, foram obtidos 52 g do extrato.

Determinação de absorbância máxima

O extrato foi incorporado a uma base cosmética na concentração de 10% e então diluído para obter a concentração de 0,2 mg / ml utilizando o etanol absoluto como solvente. As leituras foram obtidas por varredura de comprimentos de onda de 200 a 400 nm em um espectrofotômetro de UV visível (UV-2550 Shimadzu), usando uma célula de quartzo de 1 cm e etanol absoluto usado como branco. A análise foi realizada em triplicata.

Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro

De acordo com o método descrito por Mansur (1986), que é amplamente utilizado por ser rápido e acessível e demonstrar boa correlação com métodos in vivo (Nascimento et al. 2014), o FPS foi calculado pela fórmula 1, encontrada no material suplementar. A formulação foi preparada e diluída para determinar a absorbância máxima usando um espectrofotômetro UV-2550 Shimadzu visível com uma célula de quartzo de 1 cm e etanol absoluto como um branco. A análise foi realizada em triplicata.

Substância química de referência (SQR)

O ácido rosmarínico (RA) foi usado como um padrão de análise para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ele (> 95% de pureza) foi obtido da Sigma Aldrich e também foi usado como um marcador químico do extrato de *P. amboinicus*.

Reagentes e solventes

Os solventes usados foram metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil), ácido fórmico (JT Baker®), ácido acético (JT Baker®), ácido fosfórico (Proquimios®) e água ultrapura obtida de um sistema de purificação (Milli-Q - Millipore®).

Desenvolvimento do método analítico de HPLC

As análises foram realizadas usando um sistema Shimadzu HPLC (Prominence) equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A, uma temperatura de forno de 26 °C, e software LC Solution®. Foi usada uma coluna Kromasil® C18 (250 x 4,6 mm d.i. preenchida com partículas de 5 µm), com uma pré-coluna Security Guard Gemini® C18 (4 x 3,0 mm d.i. preenchida com partículas de 5 µm). A vazão foi de 0,6 ml / min, o volume de injeção foi de 20 µl e a detecção foi realizada a 330 nm. A fase móvel A consistia em água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B consistia em metanol puro. Tanto o extrato quanto as soluções padrão de AR foram preparadas usando MeOH: H₂O com 0,1% de ácido fórmico (50:50 v / v). A corrida foi iniciada com 50% do solvente B, aumentada para 60% ao longo de 20 min, retornou a 50% ao longo de 21 min e permaneceu a 50% do solvente B pelos 26 min finais.

Caracterização do extrato etanólico bruto

Quantificação do Ácido Rosmarínico

Utilizando o método analítico de HPLC, o ácido rosmarínico foi quantificado no extrato de *P. amboinicus* utilizando a curva de calibração feita no parâmetro de linearidade do método. Os cromatogramas foram analisados a 330 nm.

Teor de fenólicos totais

O conteúdo total de fenólicos foi determinado conforme descrito por Singleton et al. (1999), usando ácido gálico como padrão. As amostras foram solubilizadas em metanol para obter uma concentração de 1 mg/ml. O reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado a cada amostra e, após 8 min, Na_2CO_3 (7,5%) foi adicionado à mistura; a absorbância foi medida a 765 nm após 2 h. Uma equação de regressão linear foi calculada a partir de uma curva de calibração construída com solução de ácido gálico padrão (25, 50, 75, 100 e 150 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / amostra g). As análises foram realizadas em triplicata e repetidas por 3 dias.

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada conforme descrito por Garcez et al. (2009), com poucas adaptações. Diferentes concentrações de extrato (10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g} / \text{ml}$) foram escolhidas com base em testes preliminares e uma solução de DPPH (0,3 mM) foi usada para a reação. Após 30 min em repouso e no escuro, a absorbância foi medida a 518 nm. A atividade da amostra foi expressa como EC50. O ácido ascórbico foi usado como padrão. As análises foram realizadas em triplicata e repetidas por 3 dias.

Validação do método analítico de HPLC

O método analítico por HPLC foi validado seguindo os procedimentos da resolução 166/2017 (Anvisa 2017). Linearidade, especificidade, precisão, precisão intermediária, exatidão, efeito de matriz e robustez foram avaliadas.

Linearidade

Segundo Anvisa (2017), a linearidade confirma que o método é diretamente proporcional à concentração do analito utilizado em um determinado intervalo de tempo. As concentrações usadas para este teste foram 5,6, 11,25, 22,5, 45 e 90 µg / ml.

Efeito Matriz

Segundo a Anvisa (2017) a comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com SRQ e analito fortificado com SRQ precisa indicar que não há interferência dos constituintes da matriz e isso pode ser visto através do paralelismo das linhas. Assim, cinco amostras de extrato de *P. amboinicius* 1 mg/ml foram preparadas, e volumes de 20, 30, 40, 50 e 60 µl de AR foram adicionados a uma concentração de 1 mg/ml, correspondendo a 45,93, 53,28, 62,07, 70,68 e 78,78 µg / ml de ácido rosmarínico, respectivamente, de amostras fortificadas com ácido rosmarínico.

Especificidade

Este parâmetro demonstra a capacidade do método de analisar o analito de interesse na presença de impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz

(Anvisa, 2017). Assim, a fase móvel, o ácido rosmarínico (padrão) (22,5 µg / ml), o extrato (1 mg/ml) e a solução diluente foram submetidos à análise de HPLC com o auxílio de um detector de arranjo de diodos (DAD) para observar comprimentos de onda de 190 a 800 nm, para detectar a coeluição de quaisquer picos com o do marcador químico.

Precisão

A precisão foi confirmada por meio de seis determinações a 100% da concentração usada (22,50 µg / ml). A precisão intermediária foi determinada pela análise da consistência entre os resultados obtidos com diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos, em dias diferentes, mas no mesmo laboratório. Para isso, o desvio padrão relativo máximo não poderia ultrapassar 5% (Anvisa 2017).

Exatidão

Três amostras, cada uma de baixa, média e alta concentração, foram preparadas em triplicata para avaliar a exatidão. O padrão foi adicionado em quantidades conhecidas a soluções do extrato de *P. amboinicus*. A exatidão foi avaliada usando a recuperação percentual de soluções de marcador de ácido rosmarínico adicionado às amostras de solução de extrato. Os limites de recuperação aceitáveis foram 90-110%.

Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a Anvisa (2017) por meio da curva de linearidade, e são definidos como as concentrações mínimas que podem ser detectadas e quantificadas por CLAE-DAD.

Robustez

A robustez é definida como a capacidade do método de suportar pequenas variações nos parâmetros analíticos, com um limite de aceitação de 90-110%. Amostras de Ar e extrato, em triplicata, foram preparadas nas concentrações de 100% (Anvisa 2017).

Análise estatística

As análises estatísticas foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA one-way). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. O teste t de Student também foi utilizado quando necessário, o teste de Tukey foi realizado como pós-teste para ANOVA, utilizando GraphPad Prism 6.07, com nível de significância de 95%.

Resultados e discussão

Determinação da absorbância máxima e FPS

A determinação da absorbância máxima via análise espectrofotométrica do extrato de *P. amboinicus* revelou que o maior pico de absorbância para filtro solar UVB foi 1,402 em 290 nm, e este patamar também se estendeu para a região UVA, com a maior absorbância (1,481) em torno de 330 nm. Estas absorbâncias se estendem por todo o espectro de bandas de UVB e UVA, indicando assim potencial a atividade de amplo espectro deste extrato.

Assim, o potencial fotoprotetor mostrou-se correlacionado com a capacidade do extrato de apresentar bandas de absorção adequadas para um filtro solar, que coincide

com a região restrita do espectro de radiação eletromagnética que engloba a radiação UVA e UVB. Na região do espectro UVB, informações obtidas nos testes *in vitro* indicam que o FPS é responsável por prevenir a formação de eritema e o desenvolvimento do câncer de pele. Dentro do espectro UVA, compostos com boas bandas de absorção produzem filtros que podem prevenir o fotoenvelhecimento e o câncer de pele. O valor do FPS, que foi calculado a partir dos valores apresentados pelo gráfico de absorbância, foi de 12,63, valor superior ao valor mínimo recomendado pela Anvisa (FPS = 6) (Anvisa, 2012). Portanto, a preparação do EEB de *P. amboinicus* é promissora para fotoproteção em comparação com os demais extratos, e possui alto FPS. Em estudo com extratos aquosos, Rosa et al. (2008) calcularam o FPS de *A. millefolium* (FPS = 8), *Brassica oleracea* var. *Capitata* (SPF = 5), *C. rotundus* (SPF = 1), *P. barbatus* (SPF = 2), *P. ruderales* Cass (SPF = 5) e *S. oleraceus* (SPF = 6). Esses valores foram inferiores aos relatados no presente estudo, ou seja, 12,63.

Caracterização do extrato etanólico bruto

Quantificação do Ácido Rosmarínico

Usando a curva de calibração preparada com o padrão de ácido rosmarínico desenvolvido no parâmetro de linearidade, o ácido rosmarínico no extrato foi analisado comparando a área do pico do ácido rosmarínico entre a amostra e o padrão. O teor de ácido rosmarínico foi de $22,48 \pm 0,07 \mu\text{g} / \text{ml}$, conforme indicado pela padronização do extrato de *P. amboinicus*. Com base na corrida padrão de ácido rosmarínico, seu tempo de retenção (T_R) foi de 9,623 min, que foi o mesmo observado no extrato de *P. amboinicus* para este composto, no qual o marcador de ácido rosmarínico teve um T_R de 9,619 min (Figura 1 do material suplementar).

Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais no extrato de *P. amboinicus* foi de $142,39 \pm 1,12$ mg EAG/g de extrato, conforme determinado após a construção da curva de ácido gálico. Esse valor foi comparado com os resultados de outros estudos com plantas do gênero *Plectranthus*. Mendonça (2016) avaliou o conteúdo fenólico total das folhas de *P. amboinicus*, *P. barbatus* e *P. ornatos*, e relatou valores de 9,31, 9,2 e 10,80 mg EAG/g folha fresca, respectivamente, indicando que os valores encontrados na presente estudo são promissores.

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante, expressa como EC_{50} , foi de $112,39 \mu\text{g} / \text{ml}$, enquanto a do ácido ascórbico foi de $10,87 \mu\text{g} / \text{ml}$. Assim, o EC_{50} de *P. amboinicus* foi promissor, embora tenha sido inferior ao padrão; mais estudos são necessários para determinar sua atividade antioxidante. Mendonça (2016) avaliou a atividade de eliminação de radicais das espécies *P. amboinicus*, *P. ornatos* e *P. barbatus* contra DPPH, e relatou valores de EC_{50} de 510, 500 e $280 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivamente. Portanto, no presente estudo, o valor de EC_{50} foi mais eficaz, o que pode ser devido a maiores concentrações de compostos fenólicos.

Validação da metodologia analítica de HPLC

A linearidade foi determinada pela construção de uma curva padrão de ácido rosmarínico usando concentrações de 5,6–90 μg de AR/ml. Usando a curva, foi possível identificar a equação da reta, que foi $y = 82037x + 139625$ e $R^2 = 0,9998$ ($r = 0,9998$). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para a elaboração da curva de calibração

foi utilizado o método dos mínimos quadrados, com base na análise das diferentes concentrações, tomando a média de três repetições por nível de concentração. Foi realizada análise de regressão de variância, revelando coeficiente angular significativo e validade da reta de regressão.

Esses resultados indicam que a linearidade está de acordo com as recomendações da Anvisa (2017), com valor mínimo de coeficiente de correlação de 0,99.

Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado pela construção de uma curva de amostras fortificadas com ácido rosmarínico, considerando a área do pico do ácido rosmarínico formado em cada concentração. Assim, a curva foi comparada com a linearidade para determinar a existência de paralelismo entre as linhas. Como seu coeficiente angular é igual ao da linearidade, $\alpha = 82037$, isso indica que não há efeito de matriz. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da extrapolação dos dados da curva de calibração seguindo a Anvisa (2017).

O limite de detecção do ácido rosmarínico foi de 1,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ e o limite de quantificação foi de 4,18 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Especificidade

A análise dos cromatogramas obtidos das soluções padrão, amostra, fase móvel e diluente revelou que nenhum pico coeluiu com o padrão de ácido rosmarínico. Isso indica

que, no comprimento de onda utilizado, nenhuma outra substância estava presente no mesmo tempo de retenção e que o método era específico.

Precisão

Os resultados obtidos para confirmação da repetibilidade, que avaliou a precisão do método entre corridas realizadas pelo mesmo analista, revelaram que o desvio padrão relativo das análises realizadas pelo analista 1 foi de 1,73%, e pelo analista 2 foi de 0,33%, atendendo aos requisitos Anvisa (2017), o que indica que $DPR < 5\%$. Assim, os desvios relativos observados não foram significativos, demonstrando que o método foi preciso e que não houve variação entre os analistas.

Os dados de precisão intermediária mostraram que o desvio padrão relativo foi de 1,32% entre os resultados reportados pelo analista 1 e 2, o que também foi consistente com os limites exigidos pela Anvisa (2017); o teste t não revelou diferença estatística entre as análises. Portanto, esses resultados indicam que o método proposto é preciso.

Exatidão

Os valores médios de recuperação encontrados para as concentrações de 5,6, 22,5 e 90 $\mu\text{g} / \text{ml}$ foram $95,28 \pm 0,43$, $96,36 \pm 0,05$ e $104,1 \pm 0,17$, respectivamente. Isso demonstra que o método é exato em quantificar o padrão de acordo com a resolução recomendada, que permite variação de 90 a 110% (Anvisa 2017).

Robustez

O teste de robustez avaliou variáveis como pH, temperatura, composição da fase móvel, coluna e fluxo. EEB e amostras do padrão foram analisadas separadamente. Os resultados mostraram que alterações no pH, temperatura, coluna e composição da fase móvel não influenciaram no tempo de retenção das substâncias, comparando padrão e amostras. Assim, o método foi considerado robusto com base nos valores obtidos. O desvio padrão relativo foi inferior a 1,03% em todas as determinações, o que condiz com os requisitos da legislação em vigor.

Conclusão

O extrato de *P. amboinicus* foi quantificado e validado em ácido rosmarínico, e demonstrou atividade antioxidante in vitro, presença de compostos fenólicos e capacidade de filtrar a radiação solar nos comprimentos de onda UVB e UVA. Assim, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de um cosmético diferenciado a base de um produto natural, que apresenta benefícios para a proteção da pele por meio da capacidade de filtrar os raios UV, inibir os radicais livres e com danos limitados ao meio ambiente.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Laboratório de Caracterização e Análise (UFPB), Lanano (IFPB) e GenusPharma®, Programa dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT); CNPq e código CAPES 001, Brasil, na forma de bolsa de doutorado para MVCT

Contribuição dos autores

MVCT e JMG foram responsáveis pela coleta de material vegetal, produção do extrato etanólico bruto, produção da formulação e interpretação dos resultados. MSS e JFT contribuíram com a determinação do conteúdo fenólico e atividade antioxidante, interpretação dos resultados e coordenação do projeto. MVCT, JMG e DIAFA desenvolveram e validaram o método analítico de HPLC. TSS, JJNS e JMF foram responsáveis por determinar o SPF do extrato. Todos os autores leram o manuscrito final e aprovam a submissão.

Referências

- Amoah SKS, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW (2015) Rosmarinic acid – pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Med* 82:388=406.
- Arumugam G, Swamy MK, Sinniah UR (2016) *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
- Anvisa (2017) Resolução RE nº 166 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF.
- Anvisa, (2012). Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012, Ministério da Saúde, Brasília, DF 2012.
- El-Hawary SS, El-Sofany RH, Abdel-Monem AR, Ashour RS, Sleem AA (2012) Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Phcog J* 4:45-54.

- Ferdinando MD, Brunettia C, Agatib G, Tattinic M (2014) Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ Exp Bot* 103:107-116.
- França ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VR, (2008) Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev Bras Enferm* 61:201-208.
- Gil Ede S, Enache TA, Oliveira-Brett AM (2013) Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. *Comb Chem High Throughput Screen* 16:92-97.
- Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD (1986) Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61:121-124.
- Mendonça SC (2016) Atividades antioxidantes, anti-candida e inibitórias da lipoxigenase e alfaamilase de espécies medicinais do gênero *plectranthus*. MSc. Dissertation, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Mercurio DG, Wagemaker TAL, Alves VM, Benevenuto CG, Gaspar LR, Maia PMBG (2015) *In vivo* photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. *J Photoch Photobio B* 153:121-126.
- Murthy PS, Ramalakshmi K, Srinivas P (2009) Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chem* 114:1014-1018.
- Nascimento LF, Santos EP, Aguiar AP (2014) Fotoprotetores orgânicos: pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. *Rev Virtual Quim* 6:190-223.
- Nogueira JCR, Diniz MFM, Lima EO (2008) *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis externa. *Rev Bras Otorrinolaringol* 74:118-124.
- Paulo PTC, Diniz MF.FM, De Moraes LCSL, Andrade FB, Santos HB (2009) Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). *Rev Bras Farmacogn* 19:68-76.

- Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D (2006) Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. J Photoch Photobio B 84:167-174.
- Rosa MB, Oliveira TG, Carvalho CA, Silva FD, Carvalho LM, Nascimento PC, Peres RL (2008) Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (jacq.) cass e *Sonchus oleraceus*. Rev Eletrônica Farm 5:101-110.
- Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavette-García O, Del Bãno MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA (2009) Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. Food Chem Toxicol 47:386-392.
- Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E (1979) Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. Photochem Photochem Photo 29:559-565.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols content and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method Enzymol 299:152-177.
- Souza RJSP, Mattedi AP, Correa MP, Rezende ML, Ferreira ACA (2011) An estimate of the cost of treating non-melanoma skin cancer in the state of Sao Paulo, Brazil An Bras Dermatol 86:657-62.
- Sulaiman CT, Deepak M, Balachandran I (2018) Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. Beni-Suef Univ, J Bas Appl Sci. 7:471-473.
- Tosato MG, Orallo DE, Ali SM, Churio MS, Martin AA, Dicio L (2015) Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. J Photoch Photobio B 153:51-58.

Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H (2014) Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. J Agric. Food Chem 62:885-892.

Supplementary material

Photoprotective activity of *Plectranthus amboinicus* extracts and HPLC quantification of rosmarinic acid

*Márcio Vinícius C. Terto^a; Juliana M. Gomes^a; Diego Igor A. F. Araújo^a; Taina S. Silva^d;
Jailson M. Ferreira^c; João Jarllys N. Souza^b; Marcelo S. Silva^a; Josean F. Tavares^{a*}*

^aLaboratório Multiusuário de Caracterização e análise, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

^cLaboratório de Caracterização de Nanomateriais, Instituto Federal da Paraíba – IFPB, João Pessoa, PB, Brazil

^dInstituto Federal da Paraíba – IFPB, Catolé do Rocha, PB, Brazil

Table of contents

Formulas

Formula 1. Sun protection factor (SPF) *in vitro*

Formula 2. Limit of detection

Formula 3. Limit of quantification

Figures

Figure 1. Chromatogram of crude ethanolic extract (*P. amboinicus*); rosmarinic acid (RA) peak used as a marker can be observed at 9.619 min

Figure 2. Chromatogram of the RA standard used as reference to quantification in *P. amboinicus* extract, $T_R = 9.623$ min

Figure 3. *P. amboinicus* extract ultraviolet spectrum

Figure 4. Calibration curve of Gallic acid standard

Figure 5. Overall mean $EC_{50} \pm$ standard deviation (SD) of the sample and ascorbic acid (AA; n = 9)

Figure 6. AA curve

Figure 7. *P. amboinicus* crude ethanolic extract (CEE) curve

Figure 8. RA calibration curve for linearity

Figure 9. A: Matrix effect curve of the *P. amboinicus* extract. B: Comparison of straight lines with RA and the matrix effect with extract

Figure 10. Residue plot from linearity

Tables

Table 1. Weighting used to calculate SPF *in vitro* (Sayre et al, 1979)

Table 2. Mean total phenolic content of CEE of *P. amboinicus* in mg EAG/g extract per day (n = 3) at a concentration of 1 mg/ml. *Coefficient of variation

Table 3. Mean $EC_{50} \pm$ SD for the CEE of *P. amboinicus* and AA analyzed by the DPPH method over 3 days (n = 3). * Coefficient of variation

Table 4. Chromatographic parameters used to analyze *P. amboinicus* extract

Table 5. Parameters evaluated to confirm the robustness of the developed method

Table 6. Line equations for RA used for the linearity repetitions

Table 7. Linearity regression statistics

Table 8. ANOVA of linearity

Table 9. Statistical data for the regression equations of RA calibration curves developed by the HPLC method

Table 10. Values obtained by analysts 1 and 2 for the RA marker in the precision (repeatability) test

Table 11. Values obtained for the precision test (intermediate precision) by comparing the analyses made by analyst 1 and 2

Table 12. *T test* of precision

Table 13. Accuracy results at 80, 100, and 120%

Table 14. Acetic acid robustness

Table 15. Phosphoric acid robustness

Table 16. Robustness at pH 2

Table 17. Robustness at pH 3

Table 18. Robustness at 0.5 ml/min flow

Table 19. Robustness at 0.7 ml/min flow

Table 20. Robustness at 24 °C

Table 21. Robustness at 28 °C

Formulas

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot ABS(\lambda)$$

Formula 1. Sun protection factor (SPF) *in vitro*

where,

CF = 10 (correction factor)

EE (λ) = erythematogenic effect

I (λ) = sun intensity

ABS (λ) = absorbance

$$DL = \frac{3 \cdot DP}{\alpha}$$

Formula 2. Limit of detection

Where,

DL = detection limit

SD = standard deviation of the regression line equation, given by the standard error obtained in the regression analysis

α = inclination of the straight line obtained for the marker

$$QL = \frac{10.DP}{a}$$

Formula 3. Limit of quantification

Where,

QL = quantification limit

SD = standard deviation of the regression line equation, given by the standard error obtained in the regression analysis.

α = inclination of the straight line obtained for the marker

Figures

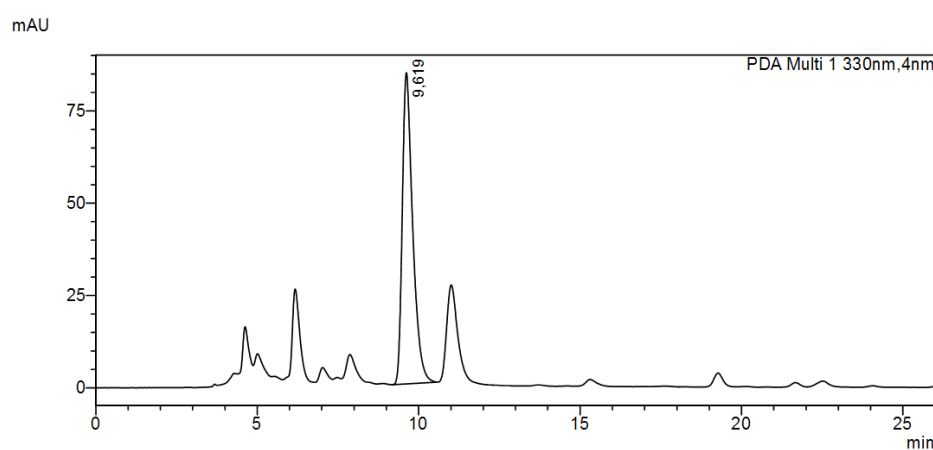


Figure 1. Chromatogram of crude ethanolic extract (*P. amboinicus*); rosmarinic acid (RA) peak used as a marker can be observed at 9.619 min

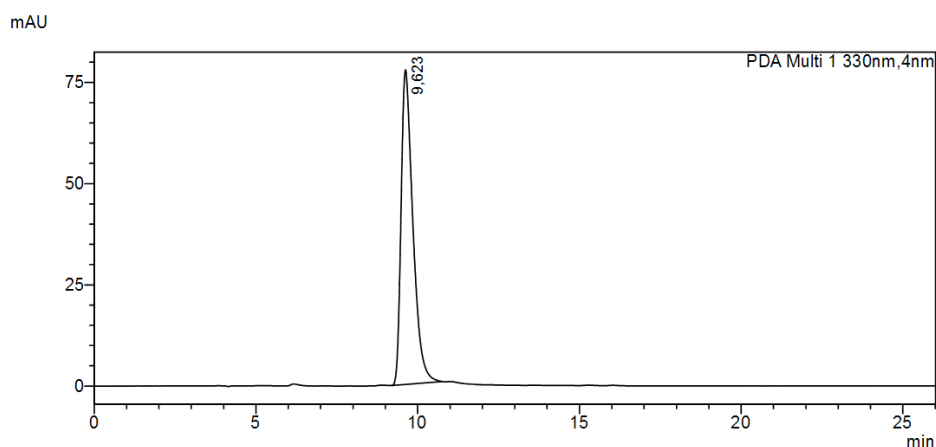


Figure 2. Chromatogram of the RA standard used as reference to quantification in *P. amboinicus* extract, $T_R = 9.623$ min

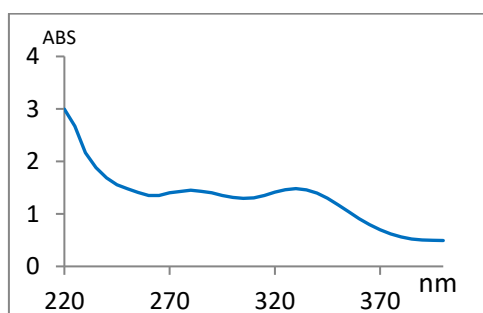


Figure 3. *P. amboinicus* extract ultraviolet spectrum

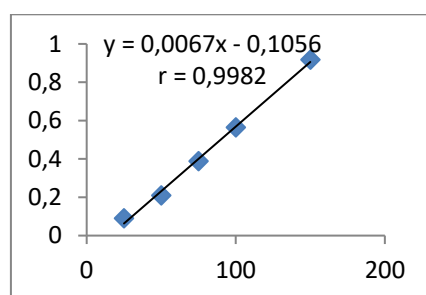


Figure 4. Calibration curve of Gallic acid standard

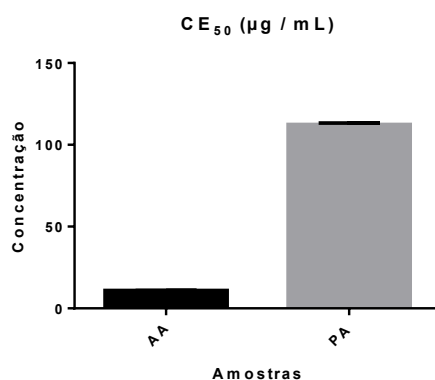


Figure 5. Overall mean EC₅₀ ± standard deviation (SD) of the sample and ascorbic acid (AA; n = 9)

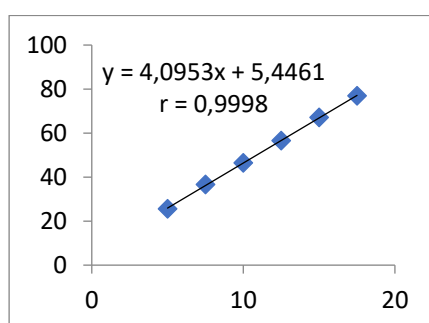


Figure 6. AA curve

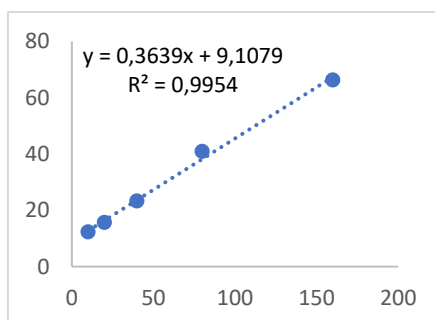


Figure 7. *Plectranthus amboinicus* crude ethanolic extract (CEE) curve

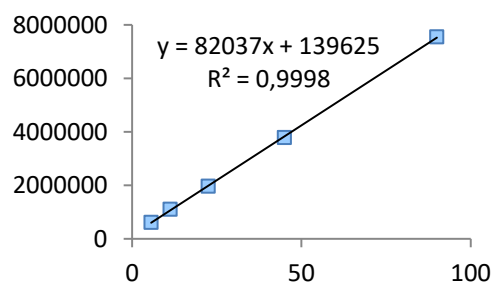


Figure 8. Rosmarinic acid calibration curve for linearity

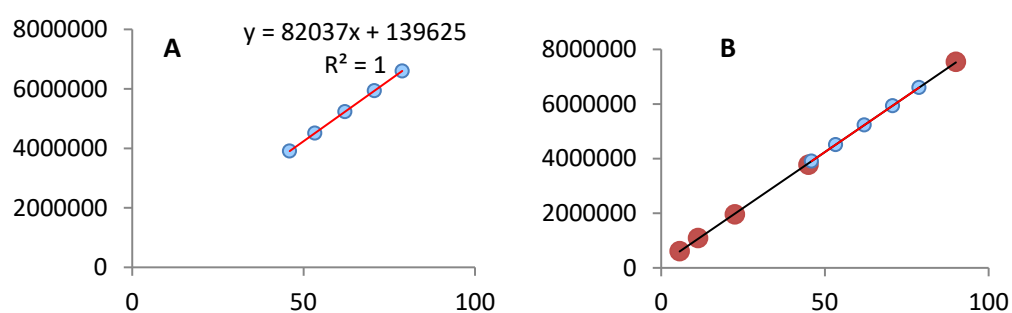


Figure 9. A: Matrix effect curve of the *Plectranthus amboinicus* extract. B: Comparison of straight lines made with RA and the matrix effect with extract

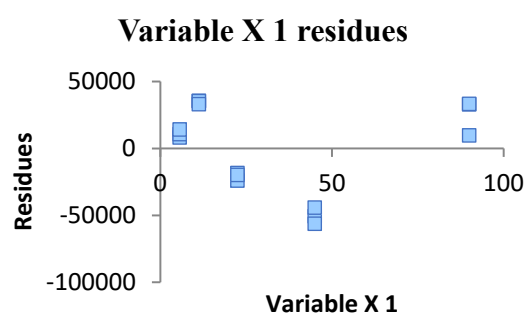


Figure 10. Residue plot from linearity

Tables

Table 1. Weighting used to calculate SPF *in vitro* (Sayre et al. 1979)

Wavelength	EE(λ).I(λ)
290	0.015
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Total	1.0000

Table 2. Mean total phenolic content of CEE of *Plectranthus amboinicus* in mg EAG/g extract per day (n = 3) at a concentration of 1 mg/ml.

Sample	Total phenol content			CV(%)*	<i>p</i>
	Day 1	Day 2	Day 3		
EEB	142.28 $\pm$ 0.26	141.53 $\pm$ 0.15	143.37 $\pm$ 1.53	0.78	0.11

*Coefficient of variation

Table 3. Mean $EC_{50} \pm SD$ for the CEE of *Plectranthus amboinicus* and AA analyzed by the DPPH method over 3 days (n = 3).

Sample	$EC_{50} \mu g / ml$			CV (%)*	p
	Day 1	Day 2	Day 3		
CEE	111.81 $\pm$ 0.64	112.19 $\pm$ 0.8	113.16 $\pm$ 0.76	0.8	0.15
AA	10.89 $\pm$ 0.08	10.88 $\pm$ 0.03	10.87 $\pm$ 0.06	0.49	0.86

* Coefficient of variation

Table 4. Chromatographic parameters used to analyze *Plectranthus amboinicus* extract

Parameters	Method conditions
Mobile Phase A	Acidified water (0.1% of HCOOH)
Mobile Phase B	Methanol
Gradient of elution	0 min – 50% B
	20 min – 60% B
	21 min – 50% B
	26 min – 50% B
Flow	0.6 ml / min
Oven temperature	26° C
Diluent solution	MeOH: acidified water with 0.1% of HCOOH (50% : 50%)
Time run	24 min
Injection volume	20 μ l
Wavelength	330 nm
Column	Kromasil® C18 (250 $\times$ 4.6 mm d.i. filled with particles 5 μ m)

Table 5. Parameters evaluated to confirm the robustness of the developed method.

Parameters	Method conditions	Variations
Mobile Phase A (acidified water)	0.1% HCOOH	0.1% H ₃ PO ₄ ; H ₃ CCOOH
pH	3	2.5 ; 3.5
Column	Kromasil® C18 (250 × 4.6 mm d.i. filled with particles 5 µm) Lote: 146155/E193786	Kromasil® C18 (150 × 4.6 mm d.i. filled with particles 5 µm) Lote: 165839/L201813
Mobile phase flow	0.6 ml/min	0.5 ml/min ; 0.7 ml/min
Oven temperature	26°C	24°C ; 28°C

Table 6. Line equations for rosmarinic acid used for the linearity repetitions.

Marker	Repetitions	Line equation
Rosmarinic acid	1	$y = 81861x + 142695$
	2	$y = 82147x + 137980$
	3	$y = 82104x + 138199$
	Mean	$y = 82037x + 139625$

Linearity statistics

Table 7. Linearity regression statistics

<i>Regression statistics</i>		Detection Limit
Multiple R	0.999919683	1.253367774
R-Square	0.999839373	Quantification Limit
R-Square adjusted	0.999827017	4.17789258
Standard error	34274.17736	
Observations	15	

Table 8. ANOVA of linearity

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F of meaning</i>
Regression	1	9.50582E+13	9.50582E+13	80919.94523	4.72576E-26
Residue	13	15271350040	1174719234		
Total	14	9.50735E+13			

Table 9. Statistical data for the regression equations of RA calibration curves developed by the HPLC method.

	<i>Coefficients</i>	Standard error	<i>Stat t</i>	<i>P-value</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>95.0% inferior</i>	<i>95.0% superior</i>
Intersection	139624.5278	13396.67847	10.42232432	1.11109E-07	110682.7635	168566.292	110682.7635	168566.292
Variable X 1	82037.08307	288.3914762	284.4643128	4.72576E-26	81414.05117	82660.11498	81414.05117	82660.11498

Table 10. Values obtained by analysts 1 and 2 for the rosmarinic acid marker in the precision (repeatability) test

	Repetition	Area	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Analyst 1	1	1889096	22.21
	2	1900095	22.34
	3	1905812	22.41
	4	1958951	23.03
	5	1960072	23.05
	6	1956586	23.01
	Mean		22.67
	DP		0.39
	DPR (%)		1.733
Analyst 2	1	2136001	22.41
	2	2126583	22.33
	3	2133122	22.40
	4	2140226	22.48
	5	2134786	22.42
	6	2147695	22.56
	Mean		22.43
	DP		0.08
	DPR (%)		0.33

Table 11. Values obtained for the precision test (intermediate precision) by comparing the analyses made by analyst 1 and 2

	Repetition	Area	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
Analyst 1	1	1889096	22.21
	2	1900095	22.34
	3	1905812	22.41
	4	1958951	23.03
	5	1960072	23.05
	6	1956586	23.01
Analyst 2	1	2136001	22.41
	2	2126583	22.33
	3	2133122	22.40
	4	2140226	22.48
	5	2134786	22.42
	6	2147695	22.56
	Mean		22.50
	DP		0.29
	DPR (%)		1.32

Table 12. *T-test* of precision

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	22.6760446	22.43394235
Variance	0.154504895	0.005655669
Observation	6	6
Grouped variance	0.080080282	
Mean difference hypothesis	0	
G1	10	
Stat t	1.481824081	
P(T<=t) uni-caudal	0.084598603	
t critics uni-caudal	1.812461123	
P(T<=t) bi-caudal	0.169197207	
t crítico bi-caudal	2.228138852	

Table 13. Accuracy test at 80, 100, and 120%

Level	Repetition	Area	Content	RA area	Recovery (%)	Average recovery (%)
80%	1	580252	5.30824	612145	94.79	95.28
	2	584513	5.34722		95.49	
	3	585004	5.35171		95.57	
					SD	0.43
					RSD (%)	0.45
Level	Repetition	Area	Content	RA area	Recovery (%)	Average recovery (%)
100%	1	1892600	21.67	1964773	96.33	96.36
	2	1892673	21.67		96.33	
	3	1894249	21.69		96.41	
					SD	0.05
					RSD (%)	0.05
Level	Repetition	Area	Content	RA area	Recovery (%)	Average recovery (%)
120%	1	7842847	93.51	7548298	103.90	104.09
	2	7860062	93.72		104.13	
	3	7868803	93.82		104.25	
					SD	0.17
					RSD (%)	0.17

Table 14. Acetic acid robustness

	RA area	Repetition	Area	Recovery (%)
Acetic acid	2284348	1	2135928	106.95
		2	2145914	106.45
		3	2150851	106.21
			Mean	106.53
			SD	0.38
			RSD	0.35

Table 15. Phosphoric acid robustness

	RA area	Repetition	Area	Recovery (%)
Phosphoric acid	2244126	1	2151719	104.29
		2	2146988	104.52
		3	2130665	105.32
			Mean	104.71
			SD	0.54
			RSD	0.52

Table 16. Robustness at pH 2

pH	RA area	Repetition	Area	Recovery
2	2107166	1	2047857	102.90
		2	2046033	102.99
		3	2068540	101.87
			Mean	102.58
			SD	0.62
			RSD	0.61

Table 17. Robustness pH 3

pH	RA area	Repetition	Area	Recovery
3	2236847	1	2108467	106.09
		2	2099659	106.53
		3	2105891	106.22
			Mean	106.28
			SD	0.23
			RSD	0.22

Table 18. Column robustness

	RA area	Repetition	Area	Recovery
Column	2079755	1	1903561	109.26
		2	1893239	109.85
		3	1877209	110.79
			Mean	109.96
			SD	0.77
			RSD	0.70
			RSD	0.57

Table 19. Robustness at 0.5 ml/min flow

Flow (mL/min)	RA area	Repetition	Area	Recovery
0.5	2366086	1	2396266	98.74
		2	2402535	98.48
		3	2422648	97.66
			Mean	98.30
			SD	0.56
Flow (mL/min)	RA area	Repetition	Area	Recovery
0.7	1732230	1	1771416	97.79
		2	1750565	98.95
		3	1746879	99.16
			Mean	98.63
			SD	0.74

Table 20. Robustness at 24 °C

Temperature	RA area	Repetition	Area	Recovery
24°C	2017951	1	2042232	98.81
		2	2070618	97.46
		3	2083570	96.85
			Mean	97.71
			SD	1.00
			RSD	1.03

Table 21. Robustness at 28 °C

Temperature	RA area	Repetition	Area	Recovery
28°C	2008897	1	2050707	97.96
		2	2039154	98.52
		3	2054526	97.78
			Mean	98.08
			SD	0.38
			RSD	0.39

5.3. Manuscrito intitulado “Seasonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species” publicado em 2021 pela Revista Pharmaceutics

Seasonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species

Juliana Gomes 1, Márcio Terto 1, Sócrates do Santos 1, Marcelo da Silva 1 and Josean Tavares 1*

¹ Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, PB, Brazil, juli.mg@hotmail.com

*Correspondence: josean@lta.ufpb.br; Tel.: +55 83 98802-7809 (BR)

Resumo: *Mentha x villosa* e *Plectranthus amboinicus* apresentam em sua composição química compostos fenólicos e através de estudos anteriores, foi visto que as duas espécies apresentam atividade fotoprotetora *in vitro* promissora. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar alterações sazonais e a influência de fatores como nível de precipitação e incidência de radiação solar nas atividades fotoprotetoras e antioxidantes. Para isso, foram feitas a quantificação de compostos fenólicos, análises cromatográficas (HPLC-DAD) e multivariada (PCA) dos extratos das duas espécies durante 12 meses. Dessa forma, foi observado que os melhores meses para as atividades fotoprotetoras e antioxidantes foram abril para *M. villosa* e julho para *P. amboinicus* (FPS = 14) e foi possível concluir que a radiação solar influencia de forma mais clara a produção de fenólicos e o aumento do FPS de *M. villosa*, além de favorecer a atividade antioxidante das duas espécies, enquanto a precipitação parece não ter influencia.

Palavras-chave: fotoproteção; *M. x villosa*; *P. amboinicus*; radiação ultravioleta; PCA; sazonalidade

1 Introdução

Variações sazonais na produção de metabólitos secundários gerados pelas plantas tanto de forma qualitativa como quantitativa podem ocorrer ao longo de todo o ano como resposta às condições ambientais da planta, incluindo às climáticas [1,2]. Essa variação também pode alterar a atividade biológica que extratos da planta apresentam, já que amostras da mesma planta coletadas em meses diferentes terão a presença ou ausência de determinados compostos, bem como sua concentração também poderá ser diferente, por isso, o extrato pode inclusive apresentar propriedades farmacológicas diferentes ao longo do ano [3,4].

Sabe-se que um aumento na incidência da radiação UVB e uma diminuição da precipitação pode causar um aumento na produção de radicais livres, causando danos celulares que obriga a planta a responder a esse estímulo, alterando desde características morfológicas até o conteúdo de metabólitos produzidos, como por exemplo, o aumento da produção de compostos fenólicos [5]. Por isso, avaliar também fatores ambientais como: temperatura, disponibilidade hídrica, incidência radiação ultravioleta, entre outros, é relevante para entender melhor as alterações metabólicas existentes nas plantas [6-8].

Mentha x villosa Hudson e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng são duas espécies pertencentes à família Lamiceae e, no Brasil, são popularmente chamadas de “hortelã da folha miúda” e “hortelã da folha grossa”, respectivamente. Elas são usadas na medicina popular principalmente como antimicrobianas, mas *M x villosa* também é usada na forma de infusão ou decocção de suas folhas para o tratamento de problemas estomacais e cólicas menstruais, além de ser usada como sedativa [9] e antiparasitária [10]. Cientificamente, seus efeitos hipotensivos endotélio dependentes e vasorrelaxantes têm sido demonstrados [11], bem como sua atividade antimicobiana [12], antitumoral [13], anti-inflamatória [14] e antioxidante [15,16]. *P. amboinicus* é usada para o

tratamento de resfriados, tosse, asma e doenças do trato respiratório no geral, bem como para o tratamento de dores de cabeça, febre, doenças de pele e desordens gastrointestinais [17-19]. Assim, por ser uma espécie bem conhecida e usada, muitos estudos sobre os seus efeitos já foram feitos para demonstrar atividades como a antimicrobiana e antiviral *in vitro* [20,21], atividade contra desordens gastrointestinais e respiratórias, anticonvulsivante e antitumoral [22,23], analgésica, anti-inflamatória e antioxidante [24,25]. As duas espécies também são usadas na culinária como saborizantes e na preparação de alguns pratos [17,26].

Muitas das atividades biológicas apresentadas por *M x villosa* e *P. amboinicus* são devidas à presença de seus óleos essenciais que são amplamente estudados e tem mono e sesquiterpenos em suas composições [17,27]. Entretanto, seus extratos não voláteis também apresentam uma grande quantidade de compostos interessantes, como os compostos fenólicos. Em *M x villosa*, vários ácidos fenólicos já foram identificados, como o ácido rosmarínico, ácido quínico e clorogênico, bem como flavonoides como derivados da luteolina e apigenina, hesperidina, campferol-3-*O*-glucuronideo, eriocitrina e crisoeriol-7-*O*-rutinosideo [28]. Em *P. amboinicus*, muitos polifenóis também já foram encontrados, como o ácido caféico, ácido gálico, ácido rosmarínico, cirsimarina, derivados da luteolina e apigenina, ácido p-cumárico, taxofilina, entre outros [29].

Portanto, essas espécies apresentam em sua composição química uma quantidade de interessantes compostos fenólicos, que são conhecidos principalmente por sua ação anti inflamatória, antioxidante e fotoprotetora [30-32]. Suas propriedades antioxidantes estão intimamente ligadas às suas estruturas químicas estáveis, tornando-os capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROS), inibir a peroxidação lipídica e até prevenir a produção de radicais livres [33].

Uma atividade relevante atribuída a essa classe de metabolitos é a atividade de proteção solar, já que eles são capazes de filtrar a radiação ultravioleta incidente. Por isso, quando a intensidade dos raios UVA e UVB está alta, a planta pode ser estimulada a produzir compostos fenólicos para que eles absorvam ou dissipem a energia solar e dificultem os danos aos tecidos [34,35].

M. villosa e *P. amboinicus* apresentam como composto majoritário em seus extratos o ácido rosmarínico (AR). Estudos relacionados à ação fotoprotetora desse ácido vêm demonstrando um futuro favorável para este metabólito, já que foi observado além da sua capacidade fotoprotetora, a sua ação na inibição da peroxidação lipídica, bem como uma boa atividade antioxidante [36-38], o que o coloca em uma posição relevante para o desenvolvimento de novos protetores solares.

Assim, baseada na extensiva literatura demonstrando os aspectos terapêuticos de *M x villosa* e *P. amboinicus*, essas duas espécies merecem atenção principalmente em áreas nas quais elas não foram bem exploradas ainda, como na fotoproteção e sazonalidade de seus extratos não voláteis, já que as plantas empregam vários mecanismos pra se adaptar as condições ambientais no intuito de regular bem seu metabolismo [39] e isso pode impactar diretamente na produção de metabólitos secundários. Portanto, entender as variações anuais dos metabólitos secundários dessas duas espécies pode nos ajudar a melhor usá-las, em termos de desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Um estudo anterior feito por Terto et al [40], bem como resultados ainda não publicados [41], mostraram que essas duas espécies apresentaram atividade fotoprotetora promissora *in vitro*, já que as duas apresentaram fator de proteção solar (FPS) em torno de 13. Assim, nós avaliamos as variações sazonais ocorridas em *M x villosa* e *P. amboinicus*, através do monitoramento da produção quantitativa de polifenóis e flavonoides totais e ácido rosmarínico mês a mês, o papel da radiação solar

e da precipitação na produção desses metabólitos e suas implicações no FPS e atividade antioxidante desses extratos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Material Vegetal

As partes aéreas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, foram coletadas às 8h da manhã do dia 20 de todos os meses, de janeiro a dezembro de 2019. Onde elas foram cultivadas na Universidade Federal da Paraíba, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) (7°8'29.875"S/34°50'48.757"W), Campus I, município de João Pessoa-PB. Essa espécie apresenta uma exsicata depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB/UFPB) sob o número de identificação JPB0047239 e seu registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) está sob o número de referência AAB0FA6.

2.2 Preparação do extrato etanólico bruto

500g das partes aéreas frescas de *P. amboinicus*, foram trituradas e submetidas à maceração com etanol 96%, por três dias consecutivos, sendo esse processo repetido por três vezes. Nessa etapa, foi utilizado um total 9 l e, após extração, as soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador a temperatura de 40 °C obtendo-se os extratos etanólicos brutos (EEB), resultando em média, em extratos com cerca de 12,37 g para *P. amboinicus*.

2.3 Reagentes e equipamentos

Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC (Tédia®, Rio de Janeiro, Brasil), ácido fórmico (J.B.Baker®, Aparecida de Goiânia, Brasil), ácido acético (J. T. Baker®, Aparecida de Goiânia, Brasil) ácido fosfórico (Proquimios®, Rio de Janeiro, Brasil) e

água tipo I obtida por sistema de purificação (Milli-Q - Millipore®), além de etanol absoluto PA (Neon®, Suzano, Brasil), creme Polawax® (João Pessoa, Brasil), Folin-Ciocalteu, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), cloreto de alumínio (AlCl₃) e Ácido Rosmarínico, obtido da Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil, com teor de pureza de 96%.

Os equipamentos utilizados foram a UV-visible spectrophotometer (UV-2550, Shimadzu) e um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, auto injetor SIL-20A HT, um sistema de degaseificação DGU-20A5R, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A diode array e controlador CBM-20A. A coluna utilizada foi Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). O software LC Solution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

2.4. Métodos cromatográficos analíticos de HPLC

O método analítico utilizado para as análises de quantificação do AR em *P. amboinicus*, teve como a solução diluente utilizada MeOH : água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (1:1). A corrida começa com 50% de solvent B e alcança 60% em 20 min, retornando para 50% em 21 min e mantendo essa concentração até os 26 min finais. Neste caso, o fluxo utilizado foi de 0,6 ml/min [40].

2.5. Tratamentos com radiação solar e precipitação

A exposição consistiu em submeter as plantas a radiação solar e precipitação naturalmente durante o ano de 2019 no local onde as amostras eram coletadas no Instituto de Pesquisa Farmacêutica – UFPB e coletar as plantas adultas para observar as mudanças no conteúdo dos compostos investigados entre cada mês de coleta. Os dados de incidência de radiação solar e precipitação foram coletados no site (<https://portal.inmet.gov.br/>) do Instituto Nacional de meteorologia do Brasil.

2.6. Determinação do teor de fenólicos totais

Para a realização do método [42], foram adicionados 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) a 120 μ L da amostra (das duas espécies, para todos os meses) (1 mg/ml de extrato) e o ácido gálico foi utilizado como padrão. O tempo de reação foi de 8 min e nesse momento, ela foi mantida em repouso. Posteriormente, 400 μ L de carbonato de sódio (7,5%) foram adicionados no intuito de neutralizar a mistura. Em seguida, as amostras, em triplicata, foram mantidas a temperatura ambiente e no escuro por 120 minutos, sendo transferidas para placa de 96 poços para posterior leitura em espectrofotômetro UV-visível (UV-2550, Shimadzu) a 765 nm.

Para o cálculo do teor de fenólicos se utilizou a equação de regressão linear a partir da curva de calibração do padrão de ácido gálico (25, 50, 75, 100, 150 e 200 μ g/ml) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de amostra).

2.7. Quantificação de ácido rosmarínico

A quantificação do AR foi feita através da construção de uma curva de calibração com padrão, onde foram utilizadas concentrações entre o intervalo de 5,6; 11,25; 22,5; 45 e 90 µg/ml para os extratos de *P. amboinicus*. As amostras de cada mês foram preparadas em triplicata, na concentração de 1 mg/ml e injetadas no HPLC de acordo com o método analítico adequado já mencionado.

2.8. Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi avaliado pelo método espectrofotométrico proposto por Schmidt e Ortega [43], com adaptações, utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) como reagente. Dessa forma, 0,1 ml da solução de AlCl_3 (2,5%) foram adicionados a 0,1 ml das amostras (1 mg/ml) em placas de 96 poços, a mistura foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos e, em seguida, a absorbância medida a 410 nm em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) [44]. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de flavonoides foi calculado através da equação de regressão linear obtida a partir da curva de calibração de quercetina (5; 25; 50; 100 e 200 µg / ml) e o resultado foi expresso em µg de quercetina / mg de amostra.

2.9. Determinação da atividade antioxidante

Nesta análise foi utilizado o método do sequestro dos radicais DPPH [45], utilizando metanol como solvente para produção das amostras. Dessa forma, em microplaca de 96 poços, a solução de DPPH a 0,3 mM (100 µl) foi acrescentada a 100 µl de diferentes concentrações dos extratos das duas espécies estudadas (10, 20, 40, 80 e 160 µg/ml, em certas amostras houve a necessidade de utilizar também a concentração de 320 µg/ml). Essa reação permaneceu em repouso e no escuro por 30 min e posteriormente a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) a 518 nm. Essa análise foi realizada para as amostras de todos os meses, em triplicata e, a atividade sequestradora (AS) de radicais de cada concentração utilizada foi calculada a partir da

Equação 7. Após o cálculo da AS, curvas de calibração foram feitas e os resultados foram expressões como CE₅₀.

$$AS (\%) = (A_{\text{controle negativo}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle negativo}} \times 100 \quad (1)$$

Equação 7. Fórmula da atividade sequestradora de radicais.

Onde,

AS (%) = porcentagem de atividade sequestradora de radicais livres

A_{controle negativo} = Absorbância do controle negativo

A_{amostra} = Absorbância da amostra

2.10. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro*

O FPS foi determinado de acordo com o método *in vitro* [46], conhecido por ser prático e apresentar boa correlação com testes *in vivo*. Assim, foram preparadas formulações cosméticas, utilizando creme polawax[®] como base e, os extratos, separadamente, foram incorporados a uma concentração de 10%. Para análise, foram preparadas amostras líquidas de cada formulação a uma concentração de 0.2 mg/ml, empregando etanol absoluto como solvente. Posteriormente, foi feita uma varredura entre os comprimentos de onda de 200-400 nm através de um visible UV spectrophotometer, UV-2550 Shimadzu, with a 1 cm optical path length quartz cell, Absolut ethanol was also used as blank and analysis was done in triplicate. O FPS foi calculado através da Equação 8.

$$FPS = FC. \sum_{290}^{320} EE(\lambda). I(\lambda). ABS(\lambda)$$

Equação 8. Fórmula para o FPS in vitro.

Onde,

FC = 10 (fator de correção)

EE(λ) = Efeito eritematogênico

I(λ) = intensidade do sol

ABS(λ) = absorbância

2.11. Análise estatística

Os dados foram obtidos em triplicata, calculando-se a média, erro padrão e erro padrão relativo. A análise estatística foi feita por comparação estabelecida através da análise de Variância (ANOVA one way), onde os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$, o nível de significância adotado foi de 95% e pós teste Tukey também, Graphpad Prism 6.01. As curvas de calibração e os coeficientes de correlação (r) foram obtidos e calculados por regressão linear usando o Excel® 2010. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para obter correlação dos diferentes conjuntos de dados e uma visão mais distinta da relação entre as variáveis, bem como da variabilidade da atividade antioxidante e do FPS. Esta análise foi realizada com o programa Orange stastistic 3.4.

3 Resultados

3.1. Efeitos da sazonalidade no teor de fenólicos, flavonoides totais e ácido rosmarínico

Através da quantificação no teor de fenólicos totais foi possível identificar qual o melhor mês para a coleta de *P. amboinicus* em relação a esses compostos. Portanto, foi observado que o melhor mês é julho (164,7 mg EAG/g), Figura 29.

Porém, através do pós teste de Tukey é possível observar também que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) no teor de fenólicos totais em vários meses de estações diferentes do ano em *P. amboinicus*, mostrando que sua produção não obedece a uma tendência específica para cada estação, por exemplo, Janeiro, que pertence a estação do ano verão, não mostrou diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparada com abril (outono), agosto (inverno) ou outubro (primaveira). Assim, atrelado ao fato de que não existem estações bem definidas na região de coleta das plantas, justificada pela sua localização geográfica próxima à linha do equador, as estações do ano parecem ter menor influência na variação do teor destes metabólitos. Resultado semelhante foi observado em um estudo feito por WOŹNIAK et al. [47], onde a concentração da maioria dos compostos fenólicos se manteve constante durante as estações, mostrando que elas não influenciaram na variação desses metabólitos.

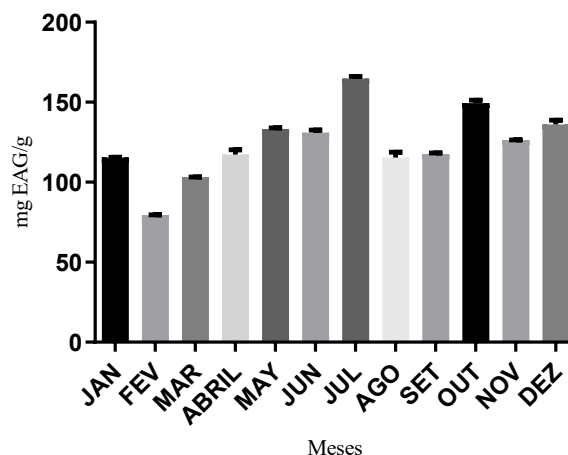


Figura 29. Teor de fenólicos totais de *P. amboinicus* em 12 meses.

Nas análises feitas para a avaliação do teor de flavonoides totais foi observado que o melhor mês de coleta é dezembro (49,82 $\mu\text{g querc/mg}$), visando a coleta da planta para a obtenção do maior teor de flavonoides, Figura 30.

Do mesmo modo que foi observado para o teor de fenólicos é visto que não existe diferença estatística no teor de flavonoides em vários meses de estações diferentes do ano em *P. amboinicus*, indicando que sua produção também não obedece a uma tendência específica para cada estação, o que mostra que as estações do ano parecem ter menor influência na variação do teor de flavonoides.

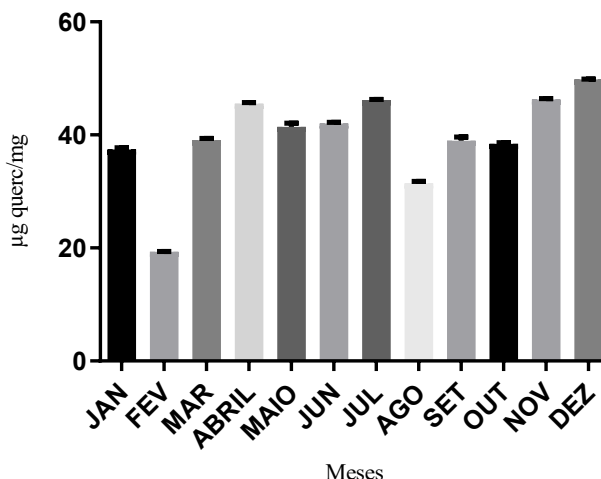


Figura 30. Teor de flavonoides totais de *P. amboinicus* em 12 meses.

Já para o ácido rosmarínico, é visto que esse metabólito é o majoritário do extrato em todos os meses do ano, porém com variações na sua concentração, Figura 31. Foi observado que em seis meses do ano a concentração de ácido rosmarínico se mantém praticamente constante, não apresentando diferença estatística entre esses meses, são eles janeiro, maio, junho, julho, outubro, novembro e dezembro. Os valores absolutos variaram de 39,46 a 44,24 mg/g. Esses resultados mostram certa estabilidade da produção desse metabólito na produção de AR. Porém, da mesma forma que observado para o teor de fenólicos e flavonoides, as estações do ano parecem ter menor influência na variação da concentração de ácido rosmarínico encontrada. Tabelas contendo os valores do teor de polifenóis, flavonoides e AR de todos os meses podem ser encontrados no material suplementar.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, é possível observar que outros fatores além das estações do ano podem ter uma melhor influência na produção de polifenóis e flavonoides totais, bem como de AR e foi possível concluir também que, de maneira geral, o melhor mês de coleta para *P. amboinicus* é o mês de julho.

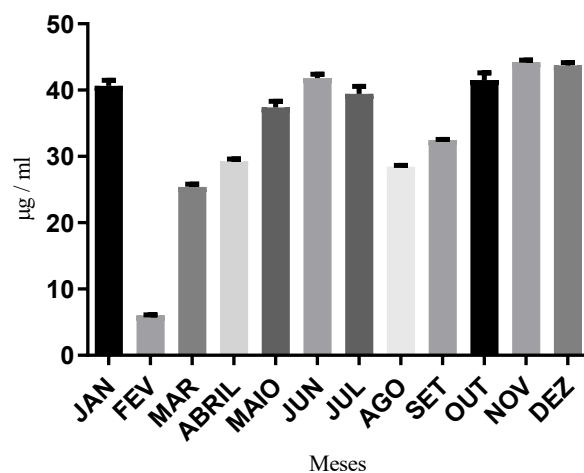


Figura 31. Teor de AR de *P. amboinicus* em 12 meses.

3.2. Efeitos da sazonalidade na atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato também foi avaliada através do teste do DPPH e os resultados também foram expressos como CE_{50} . Dessa forma, foi visto que o melhor mês para a ação sequestradora de radicais pelo extrato de *P. amboinicus* é outubro (85,04 µg/ml) Figura 32.

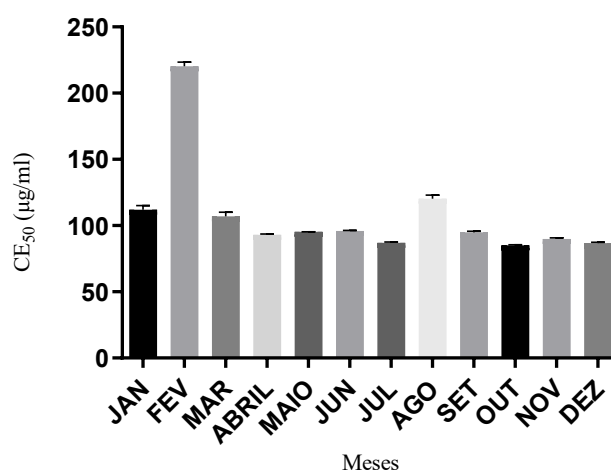


Figura 32. CE_{50} do extrato de *P. amboinicus* em 12 meses.

3.3. Efeitos da sazonalidade no FPS

No Figura 33 é possível avaliar as variações mensais ocorridas no fator de proteção solar, foi observado que os melhores meses para o FPS são abril, maio, junho e julho, ou seja, é possível sugerir que o outono favorece a atividade fotoprotetora dessa planta e, que no mês de julho, o extrato chega ao máximo do valor de FPS = 14,79, os outros resultados podem ser encontrados no material suplementar.

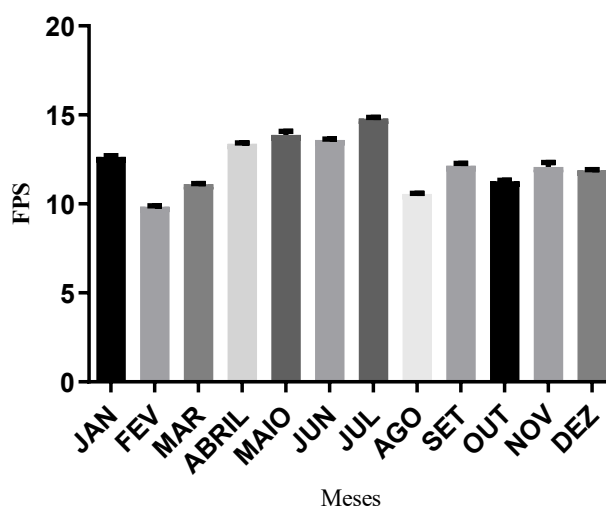


Figura 33. Variações do valor de FPS de *P. amboinicus* em 12 meses.

Ao considerar que nesses testes foram utilizados apenas o extrato vegetal da espécie estudada incorporado a 10% em creme polawax®, é possível sugerir que esses resultados são relevantes na área da fotoproteção, já que atingir níveis de FPS próximos a 15 sem a adição de nenhum filtro químico sintético já comercializado, não é simples, como mostra o estudo feito por OLIVEIRA et al., [48], que avaliou o FPS de extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e mostrou que nenhuma das formulações compostas por apenas esses extratos tiveram valores de FPS acima de 5,08. Em outro estudo feito por Mota et al., [49] foi avaliado o FPS do extrato etanólico de *Psidium guajava* e ele apresentou valor igual a 1. Da mesma forma, Mota et al, [50], avaliaram o FPS do extrato

etanólico das casas de *Nephelium lappaceum* L, onde foi visto que esse extrato apresentou um valor de FPS = 0,4.

Diante disso, a espécie estudada no presente estudo mostra valores significativos de FPS ao longo de todo o ano, os quais são maiores que os exigidos pela ANVISA em sua RDC nº 30/2012 [51], que determina que apenas formulações fotoprotetoras com FPS $\geq$ 6.

3.4. Análise de componentes principais

Para avaliar a relação entre todas as variáveis existentes, foi utilizada a análise multivariada de componentes principais que possibilitou a observação de várias correlações entre a concentração de ácido rosmarínico, teor de fenólicos e flavonoides totais, FPS e CE₅₀, bem como a relação dessas variáveis com o índice pluviométrico e a radiação solar durante o ano.

Conforme mostrado na Figura 34, a correlação entre PC4 x PC1 do PCA explicou 80% dos grupamentos existentes. Para um melhor entendimento dos resultados, os valores de FPS foram categorizados através de cores para diferenciar o valor desse parâmetro no extrato. Nessa figura é possível observar mais à esquerda que os extratos que ficaram mais agrupados em verde e para baixo, foram aqueles que apresentaram, no geral, maior valor de FPS e, além disso, é possível observar que algo além do FPS influência nesses grupamentos e que se trata da concentração de compostos fenólicos.

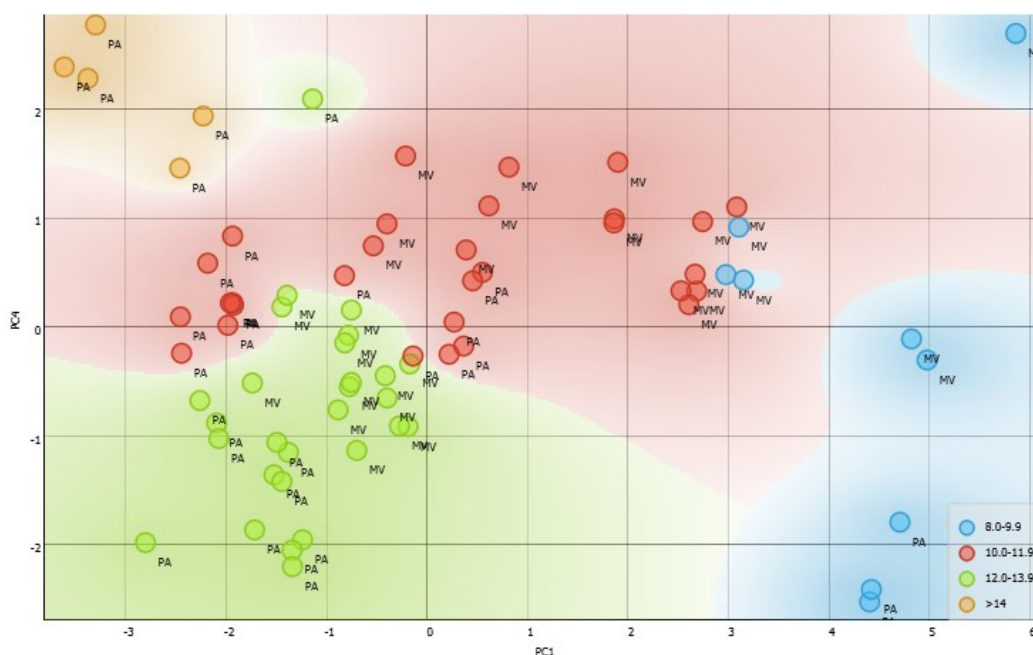


Figura 34. Análise de componentes principais mostrando os grupamentos de correlação de PC4 x PC1 usando os dados obtidos para o teor de fenólicos e flavonoides totais, teor de ácido rosmarínico, CE50, FPS, incidência de radiação solar e nível de precipitação.

Através da projeção linear em quatro eixos representada na Figura 35, é possível observar que as triplicatas dos meses do ano estão representadas pela cor azul e, que o aumento ou a diminuição do diâmetro dos círculos representa um maior ou menor valor de FPS. Assim, no geral, é visto que a presença de flavonoides, ácido rosmarínico e fenólicos mantém os valores de FPS similares, porém quando a concentração de fenólicos totais é máximo, têm-se o maior valor de FPS observado na planta estudada. É visto também, que quanto maior a CE₅₀, menor o FPS.

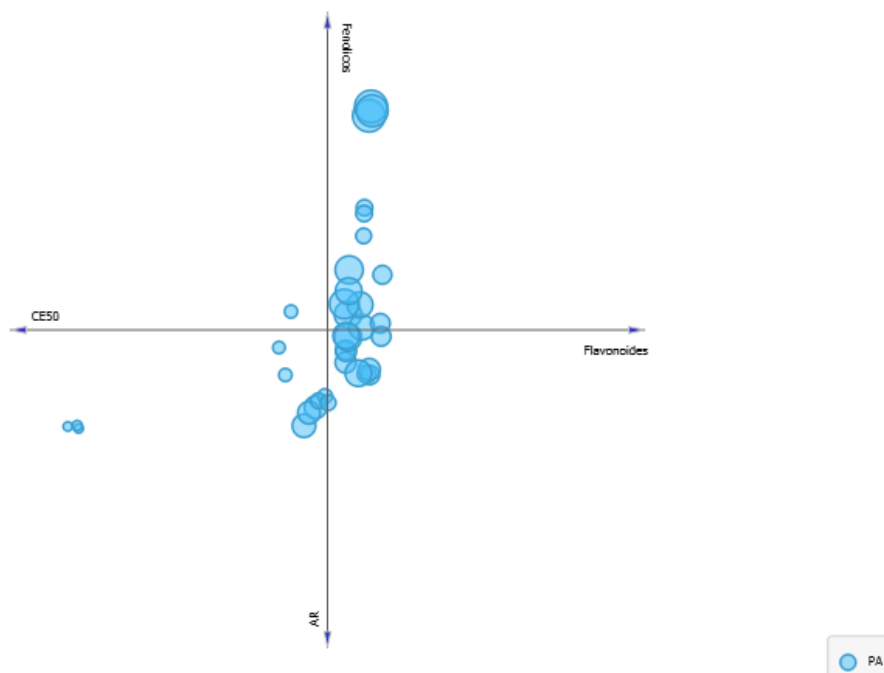


Figura 35. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides, ácido rosmarínico, CE50 de *P. amboinicus* pelos meses, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.

Outro parâmetro observado, foi a influência da radiação solar na produção dos metabólitos secundários estudados e as consequências ocasionadas ao FPS. Assim, avaliando a projeção linear apresentada na Figura 36 é visto que a radiação solar parece não ter uma influência tão direcionada, pois embora em amostras que apresentam maiores incidências de radiação solar o FPS tenha sido alto comparado a outras, isso também acontece quando o teor de flavonoides e ácido rosmarínico é mais alto, e a amostra com maior valor de FPS é encontrada quando o teor de fenólicos totais é maior, mas o nível de radiação é menor.

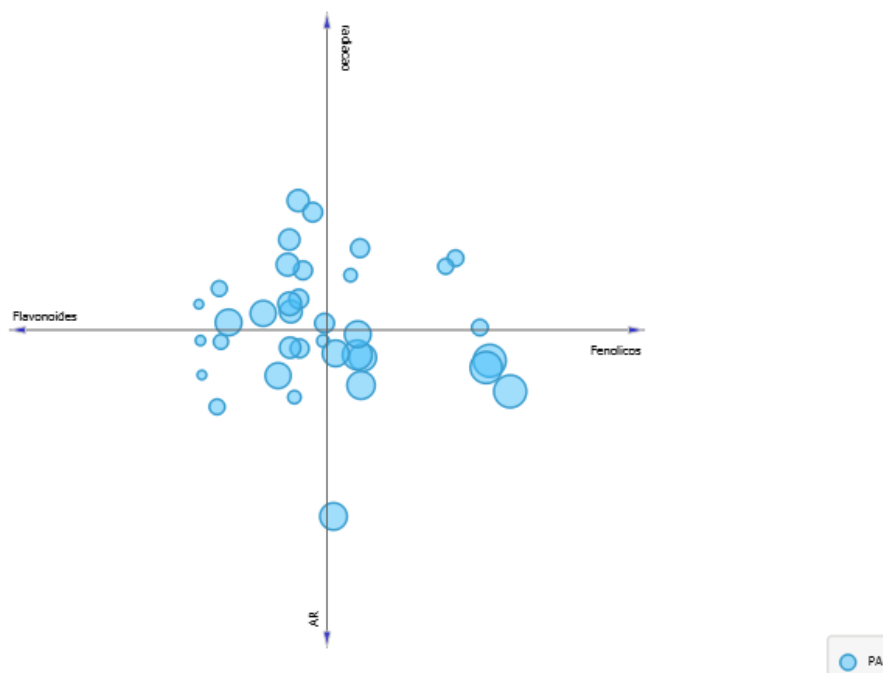


Figura 36. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de *P. amboinicus* pelos meses, com a radiação solar incidente, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.

Em um estudo feito por Takshak et al [52], foi visto que a suplementação de radiação UVB em *Coleus forskohlii* (ou *P. barbatus*) causou o favorecimento da via dos fenilpropanoides gerando a produção de compostos como flavonoides por exemplo. Por outro lado, foi visto no mesmo estudo, que a radiação UVB também induziu um aumento na produção de carotenoides nas folhas dessa espécie, como o licopeno e o β -caroteno para sua proteção. Dessa forma, embora sejam necessários mais estudos para confirmar o papel da radiação UV na produção dos metabólitos secundários de *P. amboinicus*, pode-se sugerir que outra via biossintética também pode está sendo favorecida para o aumento do seu FPS.

Por outro lado, é visto através da Figura 37, que a radiação é um fator importante para a atividade antioxidante de *P. amboinicus*, já que é mostrado que quando os níveis

de radiação solar são maiores, a CE₅₀ (representada pelo diâmetro dos círculos das amostras) diminui, o que significa uma melhor atividade antioxidante. Esse resultado é corroborado tanto pelo estudo de Takshak et al. [52], quanto pelo estudo anterior dos mesmos autores Takshak et al. [53] que mostrou que a atividade antioxidante dos extratos de *Coleus forskohlii* aumentou com suplementação de radiação UVB. A presença de ácido rosmarínico também pode ser considerado fator importante para a atividade sequestradora de radicais da planta.

Além disso, é importante ressaltar também, que como visto na revisão feita por GOBBO-NETO & LOPES [8], certos fenólicos podem ter suas produções aumentadas, como no caso da espécie *Marchantia polymorpha* em que a proporção de glicosídeos de luteolina / glicosídeos de apigenina aumenta pela influência da exposição à radiação UVB. Nessa situação, embora a capacidade de absorção dos raios UVB não aumente, como os derivados da luteolina são mais eficientes em dissipar a energia absorvida, isso aumenta os níveis de defesa antioxidante da planta. Isso também foi observado na relação *flavonóides/hidróxi-cinamatos*, sendo visto um aumento dessa proporção por indução da radiação UVB. Dessa forma, é visto que a capacidade de atuar como antioxidante e não somente ser capaz de absorver a radiação UVB é importante para definir os tipos de metabólitos e suas concentrações para agir contra raios UVB. Por isso, mais estudos precisam ser realizados para entender melhor as mudanças metabólicas em *P.amboinicus*.

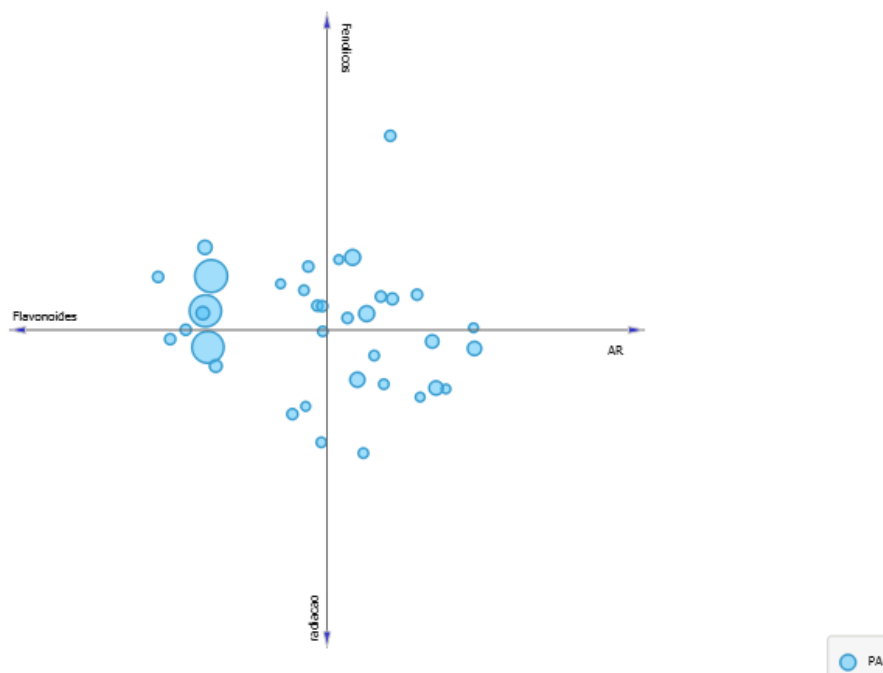


Figura 37. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de *P. amboinicus* pelos meses, com a radiação solar incidente, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de CE_{50} encontrado.

No caso da precipitação é observado na projeção linear da Figura 38, que de forma geral, ela não favorece o aumento do FPS, nem da atividade antioxidante Figura 39 do extrato, já que quanto menor a precipitação, maior o FPS e menor CE_{50} , indicando melhor atividade antioxidante.

Segundo GOBBO-NETO & LOPES [8], existem controvérsias sobre o que pode acontecer na produção de compostos fenólicos dependendo dos níveis de precipitação do ambiente, mostrando que essa produção pode ser aumentada ou diminuída, não havendo uma tendência ou padrão a ser seguido, sugerindo que não há uma correlação clara entre a concentração desses metabólitos e o estresse hídrico, mas que curtos períodos de seca podem levar a um aumento da produção desses metabólitos. Estudos como o de GOMES et al. [54], mostraram a predominância de flavonoides em folhas de *lippia alba* durante o

verão. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de RIBEIRO et al. [1], onde foi visto que a maior concentração de compostos fenólicos totais na casca interna de *Secondatia floribunda* A. DC. Durante a estação seca.

Dessa forma, atividades biológicas como a atividade antioxidante pode ser afetada, já que muitos estudos comprovam a relação direta dessa atividade com compostos fenólicos. Por isso, são necessários mais estudos para esclarecer melhor o que acontece com o metabolismo dessa planta estudada.

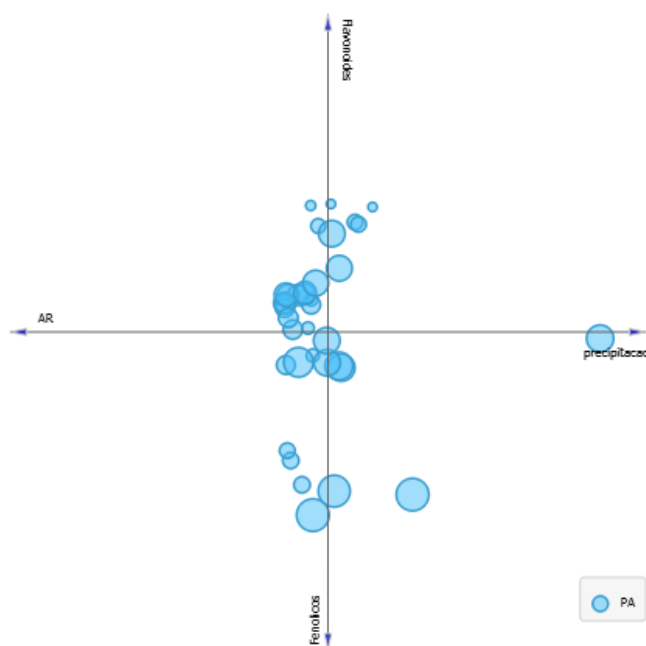


Figura 38. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de *P. amboinicus* pelos meses, com a precipitação, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de FPS encontrado.

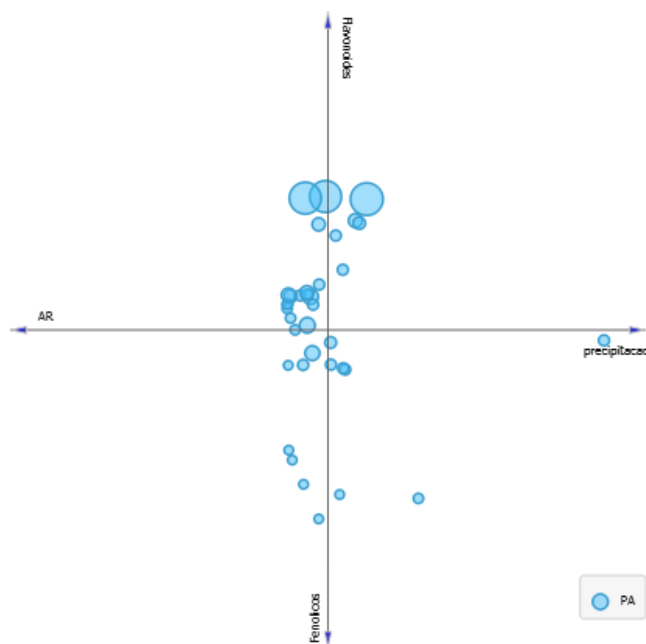


Figura 39. Projeção linear correlacionando o teor de fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico, de *P. amboinicus* pelos meses, com a precipitação, onde o diâmetro dos círculos correspondente a um maior ou menor valor de CE50 encontrado.

4 Conclusão

De acordo com todos os resultados obtidos, é possível concluir que no geral, a sazonalidade não afetou diretamente a produção de polifenóis, flavonoides e ácido rosmarínico quantitativamente, embora a produção de ácido rosmarínico tenha demonstrado uma certa estabilidade durante o ano. O melhor mês de coleta para *P. amboinicus* foi Julho. Também foi possível concluir que a presença de flavonoides e AR mantiveram os valores de FPS parecidos e quando a concentração de fenólicos foi máxima para a espécie, o maior valor de FPS do estudo foi encontrado (FPS = 14,79). Além disso, foi possível observar que a radiação solar não tem uma influencia tão clara na produção de compostos fenólicos de *P. amboinicus*, mas favorece o aumento da atividade antioxidante da mesma. No caso da precipitação, ela parece não favorecer nem a atividade fotoprotetora, nem antioxidante de *P. amboinicus*.

Contribuição dos autores: J.G. e M.T. foram responsáveis pela coleta de material vegetal, produção de extratos vegetais, ensaio de fotoproteção, quantificação do ácido rosmarínico por CLAE, determinação dos teores totais de fenólicos e flavonóides e interpretação dos resultados. S.d.S. contribuiu para a interpretação dos dados, uso do software e produção gráfica. J.T. e M.d.S. foram responsáveis pela coordenação do projeto, captação de recursos, interpretação dos resultados e ensaio antioxidante. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pelo Programa dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT-Rennofito, nº 465536 / 2014-0), CNPq (nº 141383 / 2018-6 e nº 141208 / 2016-3) e código CAPES 001.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável

Declaração de consentimento informado: Não aplicável

Declaração de Disponibilidade de Dados: Os dados apresentados neste estudo estão disponíveis no Material Suplementar.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer à farmácia Genuspharma® pelo fornecimento de materiais para este trabalho e suas instalações, para que formulações cosméticas pudessem ser produzidas. Agradecemos também a Tainá Souza Silva e Jarllys Nóbrega de Souza por nos auxiliarem nas análises realizadas.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

5 Referências

1. Ribeiro, D.A.; Camilo, C.J.; Nonato, C.F.A.; Rodrigues, F.F.G.; Menezes, I.R.A.; Ribeiro-filho, J.; Xiao, J.; Souza, M.M.A.; Costa, J.G.M. Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro anti-oxidant activity of *Secundaria floribunda* A. DC. (Apocynaceae). *Food Chem.* **2020**, *315*, 126277.
2. Karimi, A.; Krähmer, A.; Herwig, N.; Hadian, J.; Schulz, H.; Meiners, T. Metabolomics Approaches for Analyzing Effects of Geographic and Environmental Factors on the Variation of Root Essential Oils of *Ferula assa-foetida* L. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 9940–9952, doi:10.1021/acs.jafc.0c03681.
3. Beer, D.; Miller, N.; Joubert, E. Production of dihydrochalcone-rich green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract taking into account seasonal and batch-to-batch variation in phenolic composition of plant material. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *110*, 138–143.
4. Lemos, M.F.; Lemos, M.F.; Pacheco, H.P.; Guimarães, A.C.; Fronza, M.; Endringer, D.C.; Scherer, R. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *95*, 543–548, doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.008.
5. Nenadis, N.; Llorens, L.; Koufogianni, A.; Díaz, L.; Font, J.; Gonzalez, J.A.; Verdager, D. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *153*, 435–444.
6. Bundy, J.G.; Davey, M.P.; Viant, M.R. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics* **2009**, *5*, 3–21, doi:10.1007/s11306-008-0152-0.
7. Ferraz, E.D.O.; Vieira, M.A.R.; Ferreira, M.I.; Junior, A.F.; Marques, M.O.M.; Minatel, I.O.; Albano, M.; Sambo, P.; Lima, G.P.P. Seasonality effects on chemical composition, antibacterial activity and essential oil yield of three species of *Nectandra*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204132, doi:10.1371/journal.pone.0204132.
8. Gobbo-neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374–381.
9. Matos, F.J.A. *Farmácias Vivas*; Edições UFC: Fortaleza, Brazil, 2001.
10. Matos-Rocha, T.; Cavalcanti, M.D.S.; Barbosa-Filho, J.; Lúcio, A.; Veras, D.; Feitosa, A.; Júnior, J.D.S.; De Almeida, R.; Marques, M.O.M.; Alves, L.; et al. In Vitro Evaluation of Schistosomicidal Activity of Essential Oil of *Mentha x villosa* and Some of Its Chemical Constituents in Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 1307–1312, doi:10.1055/s-0033-1350732.
11. Guedes, D.N.; Silva, D.; Barbosa-Filho, J.; Medeiros, I.A. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 490–497, doi:10.1016/j.phymed.2004.04.002.
12. Sousa, P.J.C.; Linard, C.F.B.M.; Azevedo-Batista, D.; Oliveira, A.C.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2009**, *42*, 655–659.
13. Amaral, R.G.; Fonseca, C.S.; Silva, T.K.M.; Andrade, L.N.; França, M.E.; Barbosa-Filho, J.M.; Sousa, D.P.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.Ó.; Carvalho, A.A.; et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 1100–1106.

14. Shen, D.; Pan, M.-H.; Wu, Q.; Park, C.-H.; Juliani, H.R.; Ho, C.-T.; Simon, J.E. A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from *Mentha* spp. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C900–C908, doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02281.x.
15. Brahmi, F.; Khodir, M.; Mohamed, C.; Pierre, D. Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. In *Aromatic and Medicinal Plants—Back to Nature*; El-Shemy H.A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 47–80.
16. Hanafy, D.M.; Prenzler, P.D.; Burrows, G.E.; Ryan, D.; Nielsen, S.; Sawi, S.A.E.; Alfay, T.S.E.; Ab-delrahman, E.H.; Obied, H.K. Biophenols of mints: Antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment. *J. Funct. Foods* **2017**, *33*, 345–362.
17. Hsu, K.-P.; Ho, C.-L. Antimildew Effects of *Plectranthus amboinicus* Leaf Essential Oil on Paper. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*, doi:10.1177/1934578x19862903.
18. Manjamalai, A.; Alexander, T.; Berlin Grace, V.M. Bioactive evaluation of the essential oil of *plectranthus amboinicus* by gc-ms analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*, 205–211.
19. Shubha, J.; Bhatt, P. *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *166*, 220–227, doi:10.1016/j.jep.2015.02.055.
20. Gurgel, A.P.A.D.; Da Silva, J.G.; Grangeiro, A.R.S.; Oliveira, D.C.; Lima, C.M.; Da Silva, A.C.; Oliveira, R.A.; Souza, I.A. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125*, 361–363, doi:10.1016/j.jep.2009.07.006.
21. Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva-Filho, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 77–82.
22. Yulianto, W.; Andarwulan, N.; Giriwono, P.E.; Pamungkas, J. Bioactive compounds from torbangun (*plectranthus amboinicus* (lour.) spreng) chloroform fraction induce apoptosis in breast cancer (mcf-7 cells) in vitro. *Tradit. Med. J.* **2017**, *22*, 37–44.
23. Gurgel, A.P.A.D.; da Silva, J.G.; Grangeiro, A.R.S.; Xavier, H.S. Antibacterial Effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, *28*, 460–464.
24. Olszewska, M.A.; Gędas, A.; Simões, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Res. Int.* **2020**, *134*, 109214.
25. Kumar, P.; Singh, S.; Kumar, N. *Plectranthus amboinicus*: A review on its pharmacological and, pharmacognostical studies. *Am. J. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2020**, *10*, doi:10.5455/ajpbp.20190928091007.
26. Balakrishnan, A. Therapeutic uses of peppermint—A review. *J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *7*, 474–476.
27. Lima, T.C.; Silva, T.K.M.; Silva, F.L.; Barbosa-Filho, J.M.; Marques, M.O.M.; Santos, R.L.C.; Cavalcanti, S.C.H.; Sousa, D.P. Larvicidal activity of *Mentha villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere* **2014**, *104*, 37–43.
28. Fialova, S.; Veizerova, L.; Nosalova, V.; Drabikova, K.; Tekelova, D.; Grancai, D.; Sotnikova, R. Water Extract of *Mentha × villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 937–940, doi:10.1177/1934578x1501000636.
29. Arumugam, G.; Swamy, M.K.; Sinniah, U.R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules* **2016**, *21*, 369, doi:10.3390/molecules21040369.

30. Dalmagro, A.P.; Camargo, A.; Filho, H.H.D.S.; Valcanaia, M.M.; De Jesus, P.C.; Zeni, A.L.B. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *123*, 323–330, doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.085.
31. Henriques, A.C.R. Estudo dos Efeitos Antioxidante e Anti-Inflamatório do Chocolate Preto e da Pasta de Cacao; Master's Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2017.
32. Ko, H.C.; Lee, J.Y.; Jang, M.G.; Song, H.; Kim, S.-J. Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *122*, 506–512, doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.031.
33. Sousa, C.M.D.M.; E Silva, H.R.; Vieira, G.M., Jr.; Ayres, M.C.C.; Da Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.D.M.; Brandão, M.S.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351–355, doi:10.1590/s0100-40422007000200021.
34. León-chan, R.G.; López-meyer, M.; Osuna-enciso, T.; Sañudo-barajas, A.; Heredia, J.B.; León-félix, J. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environ. Exp. Bot.* **2017**, *139*, 143–151.
35. Takshak, S.; Agrawal, S. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *193*, 51–88, doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002.
36. Amoah, S.K.S.; Sandjo, L.P.; Kratz, J.M.; Biavatti, M.W. Rosmarinic Acid—pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Med.* **2016**, *82*, 388–406.
37. Psotova, J.; Svobodová, A.R.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *84*, 167–174, doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.02.012.
38. Sánchez-campillo, M.; Gabaldon, J.A.; Castillo, J.; Benavette-garcía, O.; Del baño, M.J.; Alcaraz, M.; Vicente, V.; Alvarez, N.; Lozano, J.A. Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 386–392.
39. Blackman, B.K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 16–26.
40. Terto, M.V.C.; Gomes, J.M.; Araújo, D.I.A.F.; Silva, T.S.; Ferreira, J.M.; Souza, J.J.N.; Da Silva, M.S.; Tavares, J.F. Photoprotective Activity of *Plectranthus amboinicus* Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid. *Rev. Bras. Farm.* **2020**, *30*, 183–188, doi:10.1007/s43450-020-00040-6.
41. GOMES, J.M. Estudo Preliminar da Potencial Atividade Fotoprotetora e Antioxidante de *Mentha X Villosa*, Master's Thesis, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, 2018, unpublished.
42. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols content and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **1999**, *299*, 152–177.
43. Schmidt, P.C.; Ortega, G.G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1999**, *133*, 17–26.
44. Marques, G.S.; Monteiro, R.P.M.; Leão, W.F.; Lyra, M.A.M.; Peixoto, M.S.; Rolim-neto, P.J.; Xavier, H.S.; Soares, L.A.L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 517–522.
45. Garcez, F.R.; Garcez, W.S.; Hamerski, L.; Migueta, C.H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 407–411, doi:10.1590/s0100-40422009000200026.

46. Mansur, J.S.; Breder, M.N.R.; Mansur, M.C.A.; Azulay, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* **1986**, *61*, 121–124.
47. Woźniak, M.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Rogoziński, T.; Ratajczak, I. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. *Rev. Bras. Farm.* **2019**, *29*, 301–308, doi:10.1016/j.bjp.2019.02.002.
48. Oliveira, M.B.; Valentim, I.B.; Rocha, T.S.; Santos, J.C.; Pires, K.S.; Tanabe, E.L.; Borbely, K.S.; Borbely, A.U.; Goulart, M.O.F. *Schinus terebenthifolius* Raddi extracts: from sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *152*, 112503, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112503.
49. Mota, M.D.; Morte, A.N.D.B.; Silva, L.C.R.C.E.; Chinalia, F.A. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *205*, 111837, doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111837.
50. Mota, M.D.; Costa, R.Y.S.; Guedes, A.A.S.; Silva, L.C.R.C.E.; Chinalia, F.A. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *201*, 111639, doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111639.
51. Anvisa, 2012. RDC nº 30, de 01 de junho de 2012. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da União, DF.
52. Takshak, S.; Agrawal, S.B. Interactive effects of supplemental ultraviolet-B radiation and indole-3- acetic acid on *Coleus forskohlii* Briq.: Alterations in morphological-, physiological-, and biochemical characteristics and essential oil content. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 313–326.
53. Takshak, S.; Agrawal, S. The role of supplemental ultraviolet-B radiation in altering the metabolite profile, essential oil content and composition, and free radical scavenging activities of *Coleus forskohlii*, an indigenous medicinal plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *23*, 7324–7337, doi:10.1007/s11356-015-5965-6.
54. Gomes, A.F.; Almeida, M.P.; Leite, M.F.; Schwaiger, S.; Stuppner, H.; Halabalaki, M.; Amaral, J.G.; David, J.M. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. *Food Chem.* **2019**, *273*, 186–193, doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.089.

Supplementary Materials:

Table S1. Results of month-to-month quantification of rosmarinic acid in mg / g, *Mentha x villosa*.

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate		37.16	14.85	12.40	31.38	22.73	7.66	17.50	28.89	39.70	26.18	24.52	32.97
		37.17	15.64	11.55	34.11	23.05	7.12	18.04	28.38	38.92	28.46	25.46	31.10
		37.52	15.76	12.45	33.36	22.52	7.29	18.40	28.29	39.23	26.66	25.81	33.04
Mean		37.29	15.42	12.21	32.95	22.77	7.35	17.98	28.52	39.28	27.10	25.26	32.37
Error		0.21	0.49	0.58	1.41	0.27	0.28	0.45	0.32	0.39	1.20	0.67	1.10
Relative error		0.56	3.21	4.77	4.28	1.17	3.74	2.50	1.14	1.00	4.44	2.64	3.39

Table S2. Results of month-to-month quantification of rosmarinic acid in mg / g, *Plectranthus amboinicus*

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate		39.30	6.03	24.52	29.10	35.65	41.09	37.79	28.33	32.37	41.82	44.65	42.91
		42.22	6.12	25.82	28.65	38.66	41.50	41.44	28.08	32.55	43.20	44.38	44.12
		40.40	5.86	25.83	29.95	37.92	42.90	39.02	28.86	32.54	39.52	43.70	44.18
Mean		40.64	6.00	25.39	29.23	37.41	41.83	39.46	28.43	32.49	41.51	44.24	43.73
Error		1.47	0.14	0.76	0.66	1.57	0.95	1.92	0.40	0.10	1.86	0.49	0.71
Relative error		3.63	2.25	2.98	2.26	4.19	2.27	4.87	1.42	0.32	4.48	1.11	1.63

Table S3. SPF results month by month, *Mentha x villosa*.

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate		13.05	10.00	10.08	12.20	10.81	9.03	9.15	11.65	13.60	13.26	12.52	11.82
		12.94	10.58	10.14	12.70	10.93	9.54	9.81	11.72	13.78	13.20	12.61	11.91
		13.31	10.38	10.23	12.77	10.96	9.55	9.87	11.75	13.81	12.93	12.67	11.93
Mean		13.10	10.32	10.15	12.55	10.90	9.38	9.61	11.71	13.73	13.13	12.60	11.89
Error		0.19	0.29	0.08	0.31	0.08	0.30	0.40	0.05	0.12	0.18	0.07	0.06
Relative error		1.45	2.81	0.75	2.50	0.71	3.15	4.15	0.46	0.84	1.34	0.59	0.52

Table S4. SPF results month by month, *Plectranthus amboinicus*.

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate		12.58	9.77	11.04	13.28	13.92	13.52	14.67	10.50	11.89	11.19	11.78	11.81
		12.26	9.85	11.12	13.40	14.18	13.62	14.82	10.56	12.25	11.30	11.92	11.91
		12.60	9.91	11.15	13.45	13.52	13.65	14.88	10.61	12.30	11.35	12.55	11.93
Mean		12.65	9.84	11.10	13.37	13.88	13.60	14.79	10.56	12.15	11.28	12.08	11.89
Error		0.10	0.07	0.05	0.09	0.33	0.07	0.11	0.05	0.22	0.08	0.41	0.06
Relative error		0.80	0.73	0.50	0.67	2.40	0.50	0.75	0.50	1.85	0.74	3.40	0.52

Table S5. Results of total phenolic content month by month mg GAE/ g, *Mentha x villosa*.

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate	142.76	95.87	96.72	149.70	115.48	88.74	106.66	116,26	147,61	115,17	123,04	130,44
	142.65	94.94	91.60	143.27	108.31	88.00	107.11	113,16	146,06	120,60	124,63	133,54
	139.70	95.94	94.90	141.721	108.27	91.22	107.42	118,70	147,42	120,79	125,13	132,57
Mean	141.70	95.58	94.41	144.90	110.69	89.32	107.06	116,04	147,03	118,85	124,27	132,19
Error	1.73	0.56	2.59	4.23	4.15	1.68	0.38	2,78	0,84	0,64	1,09	1,59
Relative error	1.22	0.59	2.75	2.92	3.75	1.89	0.35	2,39	0,57	0,54	0,88	1,20

Table S6. Results of the total phenolic content month by month mg GAE/g, *Plectranthus amboinicus*.

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
Triplicate	115.44	79.16	102.84	118.50	134.51	129.01	163.12	114.86	118.19	146.88	126.49	141.33
	115.21	79.59	103.31	121.80	131.76	129.16	167.54	110.07	116.26	152.96	126.06	134.43
	115.64	79.47	103.00	111.60	133.31	134.36	163.46	121.41	118.19	148.31	126.18	132.30
Mean	115.43	79.41	103.05	117.30	133.19	130.84	164.70	115.43	117.55	149.38	126.24	136.02
Error	0.21	0.22	0.24	5.20	1.38	3.04	2.46	5.72	1.12	3.18	0.22	4.72
Relative error	0.18	0.28	0.23	4.43	1.03	2.33	1.49	4.95	0.95	2.13	0.17	3.47

Table S7. Results of total flavonoid content month by month mg querc/ g, *Mentha x villosa*

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec
Triplicate		16.21	15.73	18.26	29.44	10.49	Nd	21.49	24.52	20.06	16.92	21.38	20.76
		16.46	15.25	18.23	27.59	10.09	Nd	21.57	25.57	21.19	17.64	22.02	20.20
		17.51	15.33	18.40	29.12	10.41	Nd	21.57	25.49	21.35	18.37	22.59	20.03
Mean		16.73	15.44	18.30	28.72	10.33	Nd	21.54	25.20	20.87	17.64	22.00	20.33
Error		0.68	0.26	0.09	0.99	0.21	Nd	0.05	0.58	0.70	0.72	0.60	0.38
Relative error		4.10	1.68	0.47	3.45	2.06	Nd	0.22	2.32	3.37	4.11	2.75	1.87

*Nd = Not detected

Table S8. Results of total flavonoid content month by month mg querc/ g, *Plectranthus amboinicus*

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec
Triplicate		37.18	19.39	38.56	45.46	42.29	41.81	46.40	30.79	38.37	38.80	46.01	49.77
		37.10	19.22	39.68	45.87	40.20	42.37	46.08	31.51	38.21	38.23	46.40	49.77
		37.99	19.39	38.96	45.22	41.81	41.89	46.01	32.00	40.30	38.31	46.49	49.83
Mean		37.43	19.34	39.07	45.52	41.43	42.02	46.16	31.43	38.96	38.45	46.30	49.82
Error		0.49	0.09	0.57	0.32	1.10	0.30	0.21	0.61	1.17	0.30	0.26	0.09
Relative error		1.31	0.48	1.46	0.72	2.65	0.73	0.46	1.94	2.99	0.79	0.56	0.19

Table S9. EC₅₀ results month by month in µg/ml, *Mentha x villosa*.

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
TriPLICATE	76.47	114.78	117.96	80.70	104.29	153.76	105.31	94.99	79.85	99.96	85.18	75.73
	7446	116.11	122.15	79.89	106.14	150.10	105.99	97.09	79.59	101.88	86.59	73.88
	77.06	114.67	123.14	82.64	105.42	150.50	107.65	95.16	80.30	100.44	87.67	75.66
Mean	75.99	115.19	121.08	81.08	105.28	151.45	106.32	95.74	79.91	100.76	86.48	75.09
Error	1.37	0.80	2.75	1.41	0.93	2.00	1.20	1.17	0.36	1.00	1.25	1.04
Relative error	1.80	0.70	2.27	1.74	0.89	1.32	1.13	1.22	0.45	0.99	1.44	1.39

Table S10. EC₅₀ results month by month in µg/ml, *Plectranthus amboinicus*.

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
TriPLICATE	108.69	218,25	106.09	92.07	95.16	96.42	86.69	122.95	94.62	85.62	90.87	86.22
	114.57	223,83	110.50	93.38	95.43	96.07	86.70	120.28	93.94	84.62	89.49	87.30
	112.96	219.04	104.64	93.39	95.12	95.56	87.73	117.77	95.88	84.88	89.50	87.04
Mean	112.07	220.37	107.08	92.95	95.24	96.01	87.04	120.33	94.82	85.04	89.95	86.85
Error	3.04	3.02	3.05	0.76	0.17	0.43	0.60	2.59	0.99	0.52	0.79	0.56
Relative error	2.72	1.37	2.85	0.81	0.18	0.45	0.68	2.15	1.04	0.61	0.88	0.64

Table S11. Radiation data used (kJ/m²).

Mont hs	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
1	197641.0 60	203520.4 60	181576.3 22	196133.0 69	154980.2 28	173300.5 73	164603.5 83	182309.0 39	177154.3 11	224129.1 73	221421.1 93	260510.4 39
2	201835.6 71	163412.7 57	144502.0 35	160850.6 20	171977.4 00	80859.91 40	150842.7 13	150422.6 67	177392.4 23	189475.6 18	205187.5 61	191501.7 64
3	224238.6 60	182924.8 30	211545.2 21	190800.9 70	184121.1 31	170916.4 86	168212.9 62	219538.0 95	238614.4 00	228766.0 61	260510.4 39	254396.4 50

Table S12. Precipitation levels used (mm³).

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Setp	Oct	Nov	Dec
1	2.0	38.4	36.6	83.0	90.2	73.6	85.4	21.8	34.0	0.2	0.2	0.2
2	1.8	111.6	103.2	41.0	22.8	554.2	52.4	27.2	11.8	27.4	0.0	13.6
3	32.6	2.6	109.2	71.4	71.0	101.0	225.0	30.6	24.0	4.0	0.0	5.6

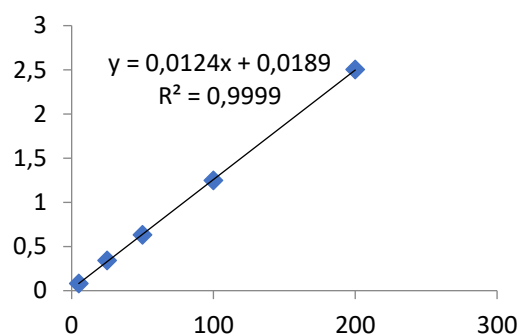


Figure S1. Calibration curve of Quercetin.

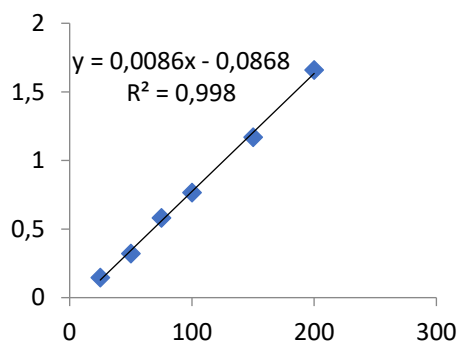


Figure S2. Calibration curve of Gallic acid standard.

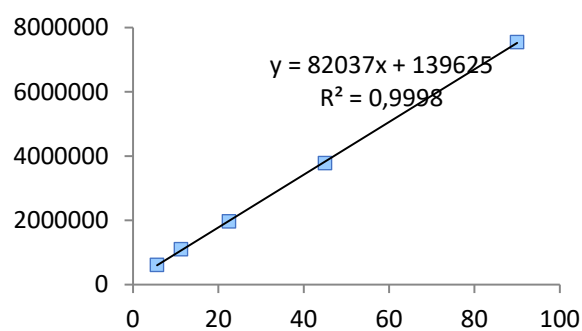


Figure S3. Rosmarinic acid standard linear regression for its quantification in *P. amboinicus*.

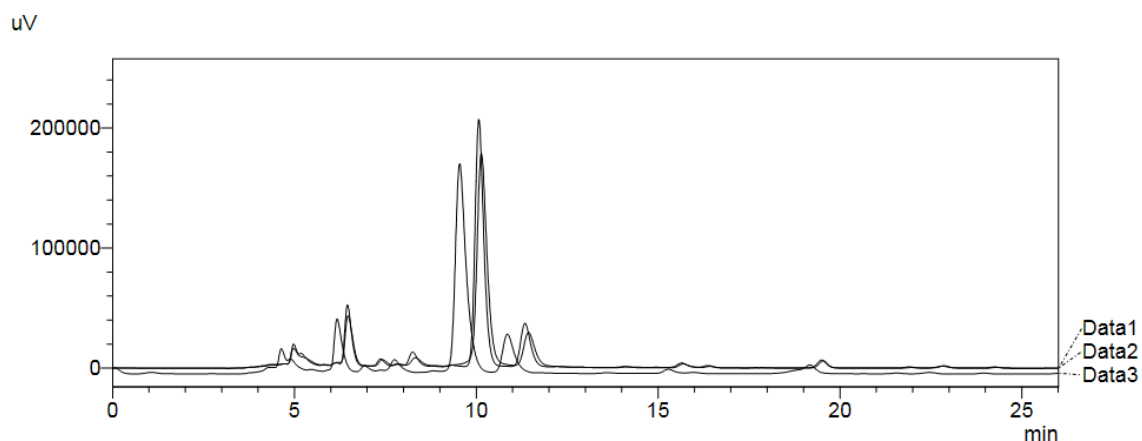


Figure S4. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 10.07; 9.54; 10.07 min) for its quantification in January, *Pectranthus amboinicus*.

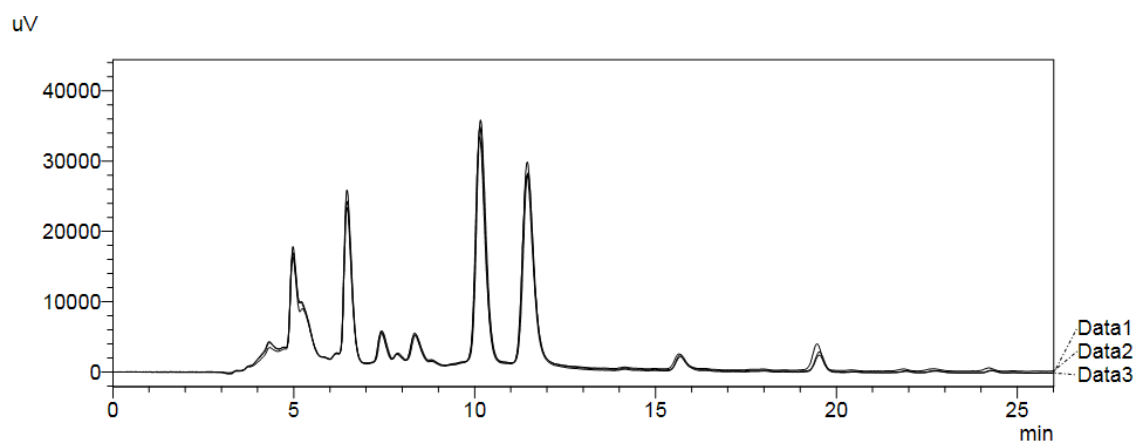


Figure S5. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 10.14 min) for its quantification in February, *Pectranthus amboinicus*.

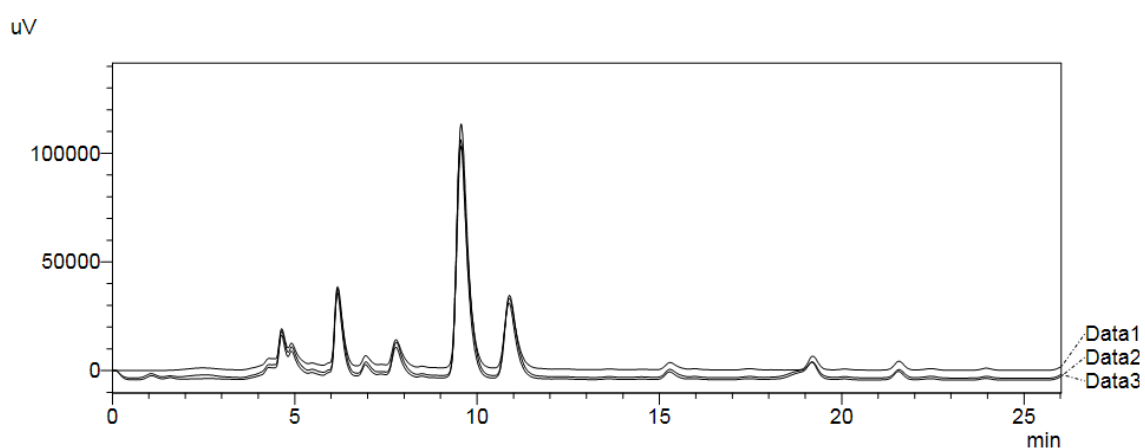


Figure S5. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.55 min) for its quantification in March, *Pectranthus amboinicus*.

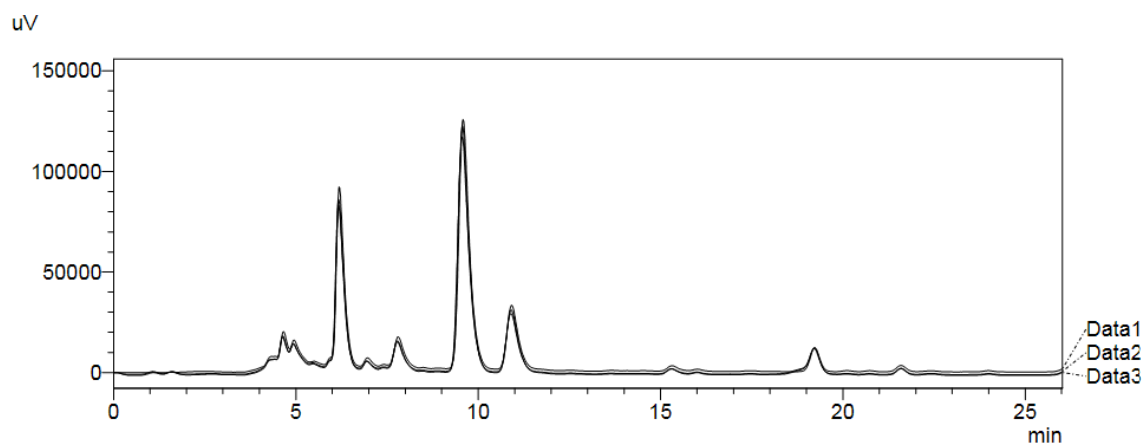


Figure S6. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.56 min) for its quantification in April, *Pectranthus amboinicus*.

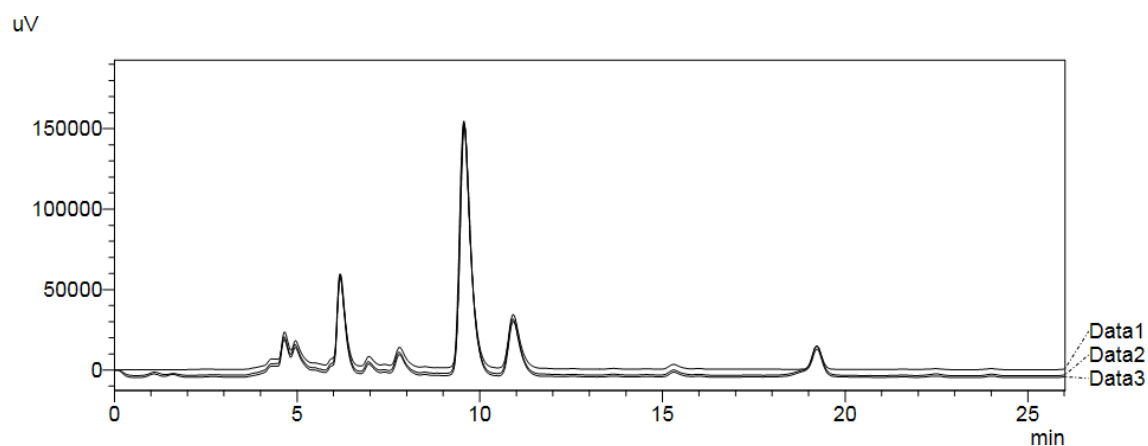


Figure S7. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.57 min) for its quantification in June, *Pectranthus amboinicus*.

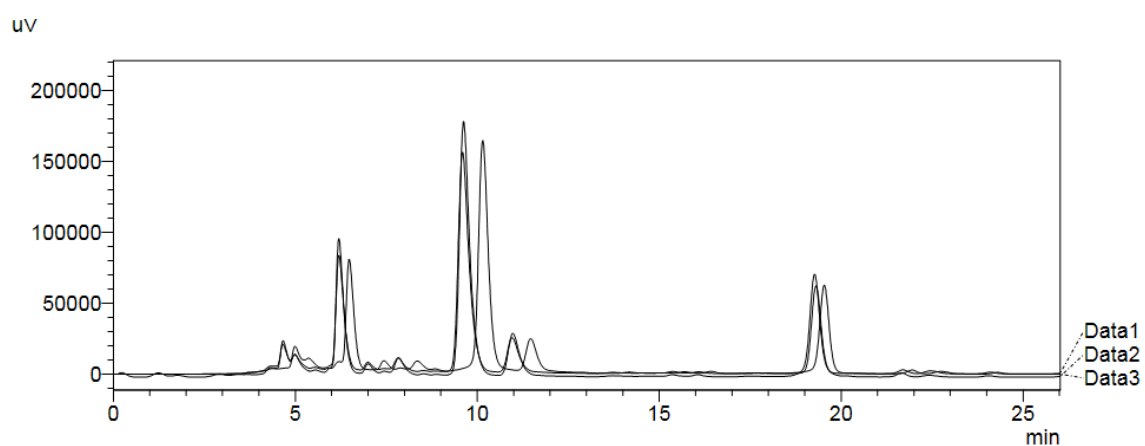


Figure S7. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 9.60; 9.62; 10.15 min) for its quantification in July, *Pectranthus amboinicus*.

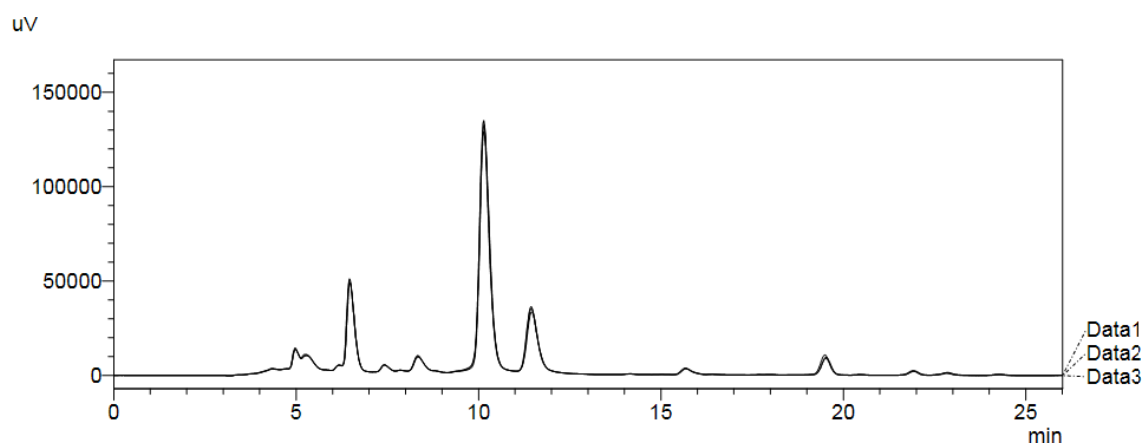


Figure S8. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 10.14 min) for its quantification in August, *Pectranthus amboinicus*.

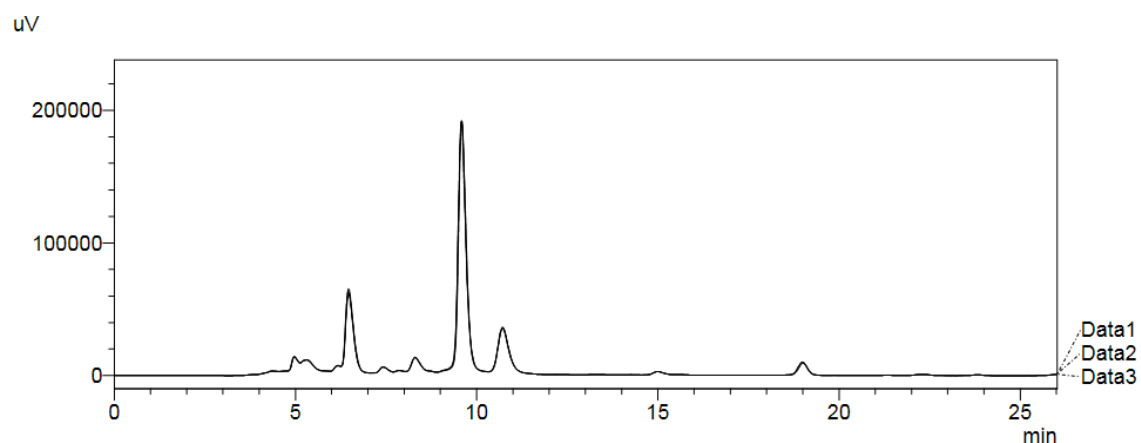


Figure S9. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.58 min) for its quantification in September, *Pectranthus amboinicus*.

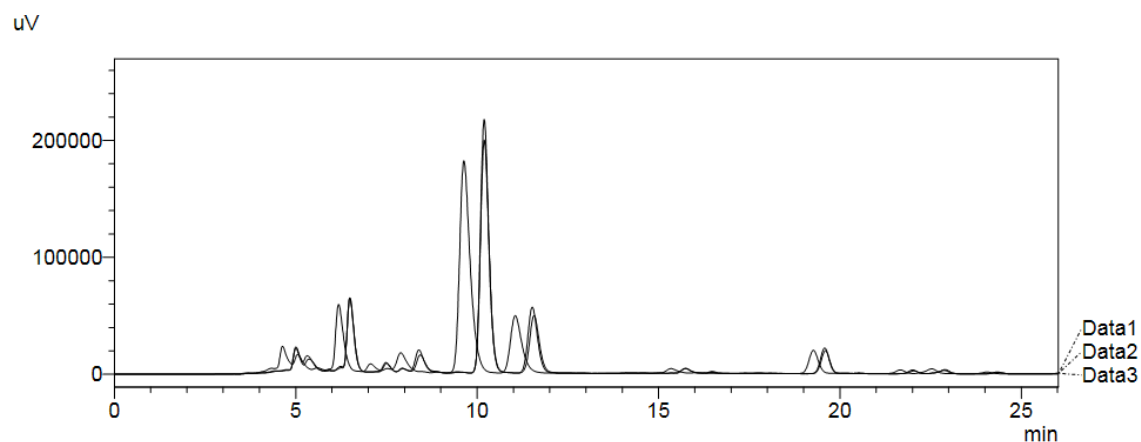


Figure S10. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 9.64; 10.19; 10.19 min) for its quantification in October, *Pectranthus amboinicus*.

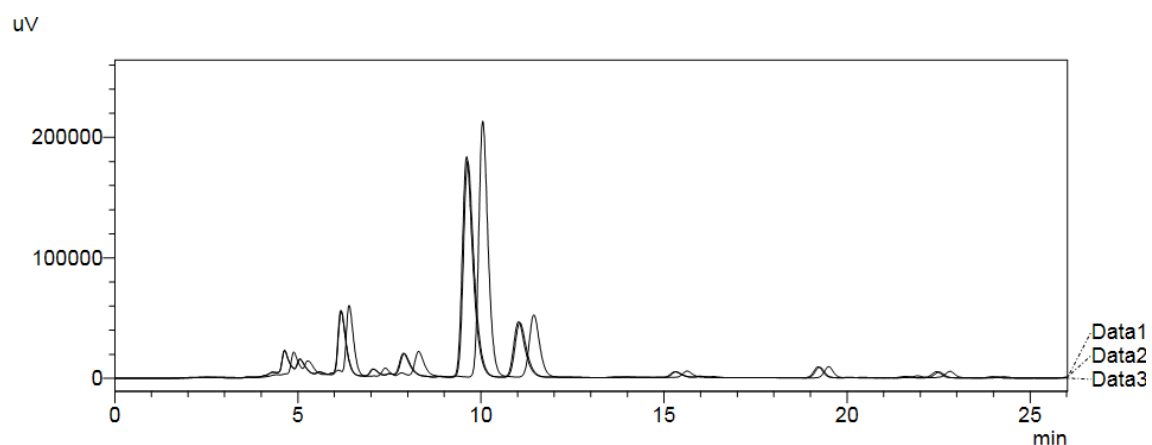


Figure S11. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 10.05; 9.64; 9.61 min) for its quantification in November, *Pectranthus amboinicus*.

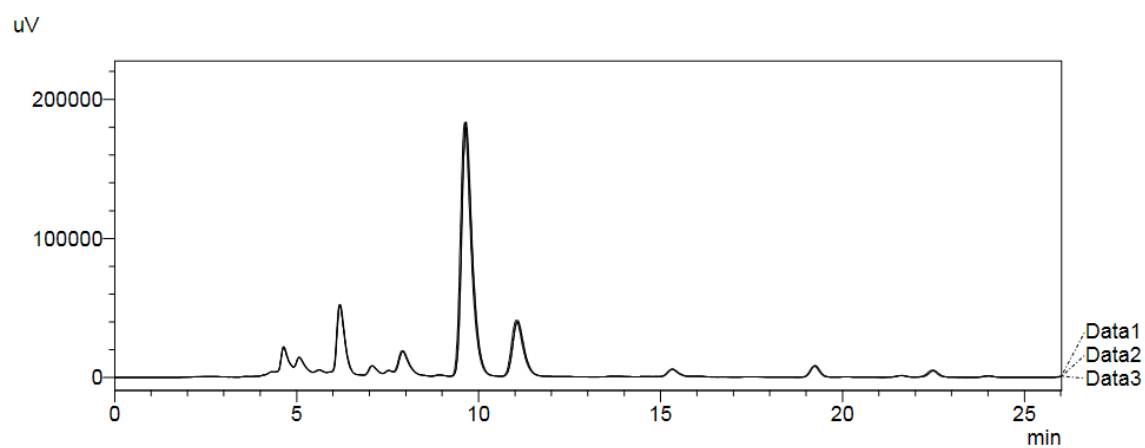


Figure S12. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.65 min) for its quantification in December, *Pectranthus amboinicus*.

Conclusão

6 - Conclusão

A partir de todos os resultados encontrados, é possível concluir que houve a identificação de 31 compostos no extrato etanólico bruto de *P. amboinicus*, sendo estes compostos fenólicos, onde 18 estão sendo reportados pela primeira vez na espécie, são eles: um dissacarídeo, ácido siríngico-O-hexosídeo, taxifolin hexosídeo, ácido *p*-Cumárico-O-hexosídeo, ácido tuberónico hexosídeo, ácido Prolithospermico, ácido Lithospermico, Siringaresinol hexosídeo, ácido salvianólico B/E, ácido rosmarínico-O-hexosídeo, luteolina-O-hexosídeo, luteolina-O-glucuronídeo, apigenina-7-O-hexosídeo, apigenina-7-O-glucuronídeo, crisoeriol-7-O-glucuronídeo, tricina-O-hexosídeo, luteolina acetil hexosídeo, ácido salvianólico F e tricina.. Foi visto também que o extrato possui como composto majoritário o ácido rosmarínico.

Foi desenvolvido e validado uma metodologia analítica por CLAE-DAD para a quantificação do Ácido rosmarínico no extrato. Ele demonstrou também atividade antioxidante *in vitro*, alta presença de compostos fenólicos e um fator de proteção solar bastante significativo para uma espécie vegetal (FPS = 12,63).

Além disso, também foi concluído que no estudo sazonal, avaliando a espécie mês a mês, no geral, a sazonalidade não afetou diretamente a produção de polifenóis, flavonoides e ácido rosmarínico quantitativamente, mas foi observada que a produção de ácido rosmarínico apresenta uma certa estabilidade durante o ano.

O melhor mês de coleta para *P. amboinicus* foi Julho. Também foi possível concluir que quando a concentração de fenólicos foi máxima para a espécie, o maior valor de FPS do estudo foi encontrado (FPS = 14,79). Foi visto que a radiação solar não tem uma influência tão clara na produção de compostos fenólicos de *P. amboinicus*, mas favorece o aumento da atividade antioxidante da mesma. No caso da precipitação, ela parece não favorecer nem a atividade fotoprotetora, nem antioxidante de *P. amboinicus*.

Dessa forma, *P. amboinicus* demonstra ter um grande potencial para ser utilizado no desenvolvimento de um produto cosmético fotoprotetor,

apresentando proteção à pele tanto por meio da filtração dos raios ultravioleta como pela inibição de radicais livres e com danos mínimos ao meio ambiente.

Referências

7 - Referências

- ABU-REIDAH, I. M. et al. Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. **Food Chemistry**, v. 279, maio 2019.
- AFAQ, F.; KATIYAR, S. K. Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. **Mini Rev Med Chem**, v. 11, n. 14, p. 1200–1215, 2011.
- AGIĆ, D. et al. Polyphenolic Flavonoids and Metalloprotease Inhibition: Applications to Health and Disease. In: **Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease**. Elsevier, 2018.
- AHN, J.; ALFORD, A. R.; NIEMEYER, E. D. Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 3, 24 jun. 2020.
- AJITHA, B.; ASHOK KUMAR REDDY, Y.; SREEDHARA REDDY, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, jul. 2014.
- ALÍAS, J. C. et al. Seasonal Variation of *Cistus ladanifer* L. Diterpenes. **Plants**, v. 1, n. 1, 26 jul. 2012.
- ALKAFIFY, M. et al. Ethanolic extract of sharah, *Plectranthus aegyptiacus*, enhances healing of skin wound in rats. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 4, p. 627–638, maio 2014.
- ALMUTAWA, F.; BUABBAS, H. Photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, jul. 2014.
- ANTAR, G. M. *Plectranthus* in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23333>>. Acesso em: 03 set. 2020 , 2020.
- ANVISA, A. DE V. S. M. DA S. B. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 69, DE 23 DE MARÇO DE 2016**. Distrito Federal.
- ANVISA, A. N. DE V. S. M. DA S. B. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA- RDC Nº 30, DE 1 DE JUNHO DE 2012**. Distrito Federal.
- ANVISA, A. N. DE V. S. M. DA S. B. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Distrito Federal.

ARUMUGAM, G.; SWAMY, M.; SINNIHA, U. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 369, 30 mar. 2016.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

BACCARIN, T. et al. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, dez. 2015.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção*. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.

BANDEIRA, J. M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 2, p. 157–164, 2011.

BARREIRA, J. C. M. et al. Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments. **Food Chemistry**, v. 163, nov. 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, fev. 2006.

BATISTA, C. M. et al. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, mar. 2018.

BAZYLKO, A.; BORZYM, J.; PARZONKO, A. Determination of in vitro antioxidant and UV-protecting activity of aqueous and ethanolic extracts from *Galinsoga parviflora* and *Galinsoga quadriradiata* herb. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 149, ago. 2015.

BEANI, J.-C. Ultraviolet A-induced DNA damage: role in skin cancer. **Bull Acad Natl Med**, v. 198, n. 2, p. 273–295, 2014.

BEKUT, M. et al. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 301–314, jul. 2018.

BÉRUBÉ, R. et al. Persistence and Tolerance of DNA Damage Induced by Chronic UVB Irradiation of the Human Genome. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 2, fev. 2018.

BHATT, P. et al. Chemical Composition and Nutraceutical Potential of Indian Borage (*Plectranthus amboinicus*) Stem Extract. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

BOCHAROVA, O. New evidence of appropriate fruit juice redox conditions for citric acid acting as a proton-carrier on Pt electrode: the effect on evaluating antioxidant properties. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 6, 24 jun. 2018.

BRAMLEY, G. L. C.; FOREST, F.; DE KOK, R. P. J. Troublesome tropical mints: re-examining generic limits of Vitex and relations (Lamiaceae) in South East Asia. **Taxon**, v. 58, p. 500–510, 2009.

BRIDI, H. et al. Terpenes from Cantinoa (Lamiaceae) native to Rio Grande do Sul, South Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 89, p. 103992, abr. 2020.

BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, 29 out. 2014.

BRITO, E. et al. Bioactivities of decoctions from Plectranthus species related to their traditional use on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, p. 147–154, jun. 2018.

BURGER, J.; EDWARDS, G. E. Photosynthetic Efficiency, and Photodamage by UV and Visible Radiation, in Red versus Green Leaf Coleus Varieties. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 3, p. 395–399, 1 abr. 1996.

BYSTROM, L. M. et al. Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. ‘Montgomery’ fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, 15 dez. 2008.

CAMELO, A. L. M. et al. Discrimination of VOCs of the Plectranthus grandis by hydrodistillation, HS-SPME and cytotoxic activity. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 225–231, jan. 2019.

CAMPELO, F. et al. Study of Thermoplastic Extrusion and Its Impact on the Chemical and Nutritional Characteristics and Two Sorghum Genotypes SC 319 and BRS 332. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

CAROVIĆ-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven Ocimum taxa. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 196–201, 2010.

CATELAN, T. B. S. et al. Evaluation of the in vitro photoprotective potential of ethanolic extracts of four species of the genus Campomanesia. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 197, ago. 2019.

CAVINATO, M. et al. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, 12 ago. 2017.

CEFALI, L. C. et al. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 4, ago. 2016.

CEFALI, L. C. et al. Evaluation of In Vitro Solar Protection Factor (SPF), Antioxidant Activity, and Cell Viability of Mixed Vegetable Extracts from *Dermophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinifera* L. **Plants**, v. 8, n. 11, 26 out. 2019a.

CEFALI, L. C. et al. Evaluation of In Vitro Solar Protection Factor (SPF), Antioxidant Activity, and Cell Viability of Mixed Vegetable Extracts from *Dermophandra mollis* Benth, *Ginkgo biloba* L., *Ruta graveolens* L., and *Vitis vinifera* L. **Plants**, v. 8, n. 11, 26 out. 2019b.

CHARLES DORNI, A. I. et al. Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 7, p. 1–26, dez. 2017.

CHEIRAN, K. P. et al. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 286, jul. 2019.

CHEN, G. et al. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 21, n. 10, 23 set. 2016.

CHEN, H. et al. Qualitative Analysis and Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSⁿ. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 3, maio 2011.

CHEN, L. L.; WANG, S. Q. Nanotechnology in Photoprotection. In: **Nanoscience in Dermatology**. [s.l.] Elsevier, 2016.

CHEN, Y.-S. et al. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1766–1772, mar. 2014.

CHIARI-ANDRÉO, B. G. et al. Can natural products improve skin photoprotection? **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

CHONG, Z. et al. Identification of polyphenols that repair the ultraviolet-B-induced DNA damage via SIRT1-dependent XPC/XPA activation. **Journal of Functional Foods**, v. 54, mar. 2019.

CIRLINI, M. et al. Phenolic and Volatile Composition of a Dry Spearmint (*Mentha spicata* L.) Extract. **Molecules**, v. 21, n. 8, 3 ago. 2016.

COHEN, L. E.; GRANT, R. T. Sun Protection: Current Management Strategies Addressing UV Exposure. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, jul. 2016.

CRETTON, S. et al. Anti-inflammatory and antiproliferative diterpenoids from *Plectranthus scutellarioides*. **Phytochemistry**, v. 154, p. 39–46, out. 2018.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576–2581, jun. 2000.

DALMAGRO, A. P. et al. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 123, nov. 2018.

DAVID, J. P. et al. LIGNANAS E TRITERPENOS DO EXTRATO CITOTÓXICO DE ERIOPE BLANCHETII. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730–733, 2001.

DE JAGER, T. L.; COCKRELL, A. E.; DU PLESSIS, S. S. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. In: [s.l.: s.n.].

DE MACÊDO, D. G. et al. Seasonality influence on the chemical composition and antifungal activity of *Psidium myrtilloides* O. Berg. **South African Journal of Botany**, v. 128, jan. 2020.

DELINASIOS, G. J. et al. Vitamin E inhibits the UVAI induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 11 dez. 2018.

DESTA, K. T. et al. Flavone polyphenols dominate in *Thymus schimperi* Ronniger : LC–ESI–MS/MS characterization and study of anti-proliferative effects of plant extract on AGS and HepG2 cancer cells. **Journal of Chromatography B**, v. 1053, maio 2017.

DI FERDINANDO, M. et al. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. **Environmental and Experimental Botany**, v. 103, jul. 2014.

EDDY, J. A.; NASA, N. A. AND S. ADMINISTRATION. U. STATES. **The Sun, The Earth, and Near-Earth Space: A Guide to the Sun-Earth System**. 1. ed. [s.l.] NASA (National Aeronautics and Space Administration), 2009. v. 1

EKLUND, P. C. et al. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, 30 ago. 2007.

EL AANACHI, S. et al. Phenolic contents and in vitro investigation of the antioxidant, enzyme inhibitory, photoprotective, and antimicrobial effects of the organic extracts of *Pelargonium graveolens* growing in Morocco. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, out. 2020.

EL-HAWARY, S. S. et al. Seasonal variation in the composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil and its biological activities. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, n. 2, p. 11–18, 2013.

ELSADIG KARAR, M. G.; KUHNERT, N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (*Crataegutt Tropfen*). **Journal of Chemical Biology & Therapeutics**, v. 01, n. 02, 2016.

ESTÉVEZ, M. et al. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 58–65, jan. 2007.

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, jun. 2001.

FACCIO, G. Plant Complexity and Cosmetic Innovation. **iScience**, v. 23, n. 8, ago. 2020.

FADEL, O.; EL KIRAT, K.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 12, dez. 2011.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, jul. 2013.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, jun. 2002.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Simple LC–MS Determination of Citric and Malic Acids in Fruits and Vegetables. **Chromatographia**, v. 72, n. 1–2, 8 jul. 2010.

FERNANDO, P. M. D. J. et al. Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 1, 1 jan. 2016.

FERREIRA CESTARI, T.; BAZANELLA DE OLIVEIRA, F.; CATUCCI BOZA, J. Photoprotection et maladies cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 139, nov. 2012.

FREITAS, J. V. et al. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, n. 1–2, abr. 2015.

FREZZA, C. et al. Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology, and Nutraceuticals of Lamiaceae. p. 125–178, 2019.

FRIŠČIĆ, M.; BUCAR, F.; HAZLER PILEPIĆ, K. LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 12, dez. 2016.

FUJIMOTO, A. et al. A novel ring-expanded product with enhanced tyrosinase inhibitory activity from classical Fe-catalyzed oxidation of rosmarinic acid, a potent antioxidative Lamiaceae polyphenol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7393–7396, dez. 2010.

FULLER, B. Role of PGE-2 and Other Inflammatory Mediators in Skin Aging and Their Inhibition by Topical Natural Anti-Inflammatories. **Cosmetics**, v. 6, n. 1, 21 jan. 2019.

GALANAKIS, C. M.; TSATALAS, P.; GALANAKIS, I. M. Implementation of phenols recovered from olive mill wastewater as UV booster in cosmetics. **Industrial Crops and Products**, v. 111, jan. 2018.

GALVÃO RODRIGUES, F. F. et al. Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, 2009.

GARCIA, C. et al. Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 36, p. 4207–4236, 15 fev. 2019.

GARNACHO SAUCEDO, G. M.; SALIDO VALLEJO, R.; MORENO GIMÉNEZ, J. C. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 92, n. 6, p. 377.e1-377.e9, jun. 2020.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, abr. 2007.

GOLLÜCKE, A. P. B. et al. Polyphenols as Supplements in Foods and Beverages: Recent Discoveries and Health Benefits, an Update. In: **Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease**. [s.l.] Elsevier, 2018.

GOMES, J. M. **Estudo preliminar da potencial atividade fotoprotetora e antioxidante de *Mentha x villosa***. João Pessoa, 2018.

GOUVEA, D. R. et al. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2012.

GRAYER, R. J. et al. Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 3, p. 335–341, jun. 2010.

GREGORIS, E. et al. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1–2, 28 fev. 2011.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I. et al. Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 117, jul. 2018.

GU, D. et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 1, 15 jan. 2012.

GULCIN, W. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, set. 2004.

GUO, M. ANTIOXIDANTS AND ANTIOXIDANT RICH FOODS. In: **Functional Foods**. [s.l.] Elsevier, 2009.

GURGEL, A. P. A. D. A importância de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng Como Alternativa terapêutica - Métodos Experimentais. **Dissertação de Mestrado, UFPE, Recife**, 2007.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Antibacterial Effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 406–409, 2009a.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Antibacterial Effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 460–464, 2009b.

GURGEL, A. P. A. D. et al. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 361–363, set. 2009c.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. v. 1

HARLEY, R. et al. Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. . **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>, 2015.

HOFMANN, T.; NEBEHAJ, E.; ALBERT, L. Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**, v. 87, set. 2016.

HSU, K.-P.; HO, C.-L. Antimildew Effects of *Plectranthus amboinicus* Leaf Essential Oil on Paper. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 7, p. 1934578X1986290, 16 jul. 2019.

HUSSAIN, A. I. et al. Antioxidant attributes of four lamiaceae essential oils. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 2, p. 1315–1321, 2011.

HYTER, S. et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 2, mar. 2013.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, mar. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, M. DA S. B. **Câncer de pele: saiba como prevenir, diagnosticar e tratar**.

JANAKIRAMAN, D.; SOMASUNDARAM, P. ACTIVE PHENOLIC CONSTITUENTS AND BRINE SHRIMP LETHALITY ASSAY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Plectranthus amboinicus*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2017.

JI, H.-S. et al. Low-density lipoprotein-antioxidant flavonoids and a phenolic ester from *Plectranthus hadiensis* var. *tomentosus*. **Applied Biological Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 58, 25 dez. 2019.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. et al. *Rosa rubiginosa* and *Fraxinus oxycarpa* herbal teas: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of the antioxidant activity. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 15, 2017.

JIN, J. et al. Simultaneous Identification and Dynamic Analysis of Saccharides during Steam Processing of Rhizomes of *Polygonatum cyrtoneura* by HPLC–QTOF–MS/MS. **Molecules**, v. 23, n. 11, 2 nov. 2018.

JUSTESEN, U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 2, dez. 2000.

KABASHIMA, K. et al. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 49–55, 2007.

KAMRA, P. et al. Scientific Basis for the Therapeutic use of *Plectranthus amboinicus*: A Review. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 7, n. 6, dez. 2019.

KANG, J. et al. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 211, nov. 2016.

KO, H. C. et al. Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, out. 2018.

KOJIMA-YUASA, A. Biological and Pharmacological Effects of Polyphenolic Compounds From *Ecklonia cava*. In: **Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease**. [s.l.] Elsevier, 2018.

KORAĆ, R.; KHAMBHOLJA, K. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 10, 2011.

KUBÍNOVÁ, R. et al. New diterpenoid glucoside and flavonoids from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 286–290, jan. 2019.

KUMAR, P.; SINGH, S.; KUMAR, N. PLECTRANTHUS AMBOINICUS: A REVIEW ON ITS PHARMACOLOGICAL AND, PHARMACOGNOSTICAL STUDIES. **American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 10, n. 2, 2020.

LAWRENCE, B. M. **Mint: the genus *Mentha*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles**. 1st. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

LEE, C.-J. et al. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 833–841, fev. 2011.

LI, B. et al. A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34343, 17 out. 2016a.

LI, C. et al. Precursor ion scan enhanced rapid identification of the chemical constituents of Danhong injection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: An integrated strategy. **Journal of Chromatography A**, v. 1602, set. 2019.

LI, Q. et al. Highly efficient free radical-scavenging property of phenolic-functionalized chitosan derivatives: Chemical modification and activity assessment. **International Journal of Biological Macromolecules**, set. 2020.

LI, Z.-H. et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, maio 2016b.

LIM, H. W.; ARELLANO-MENDOZA, M.-I.; STENGEL, F. Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, p. S91–S99, mar. 2017.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Fitos**, v. 3, n. 3, 2007.

LIU, A.-H. et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, ago. 2007.

LONGARAY DELAMARE, A. P. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 603–608, jan. 2007.

LUO, W. et al. Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from six Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 357–364, jul. 2019.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, dez. 2014.

MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, jul. 2014.

MANJAMALAI, A.; ALEXANDER, T.; BERLIN GRACE, V. M. BIOACTIVE EVALUATION OF THE ESSENTIAL OIL OF PLECTRANTHUS AMBOINICUS BY GC-MS ANALYSIS AND ITS ROLE AS A DRUG FOR MICROBIAL INFECTIONS AND INFLAMMATION. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 205–211, 2012.

MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermalogia**, v. 61, n. 4, p. 121–124, 1986.

MANURUNG, K. et al. In Silico Anticancer Activity and In Vitro Antioxidant of Flavonoids in *Plectranthus amboinicus*. **Pharmacogn J**, v. 12, n. 6, p. 1573–1577, 2020.

MAREE, J. E. et al. Bioactive acetophenones from *Plectranthus venteri*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. cxli–cxliv, dez. 2014.

MARIONNET, C. et al. A broader filtration of UVA1 wavelengths improves skin photoprotection. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 3, set. 2018.

MASKE, P. P. et al. In vitro determination of sun protection factor and chemical stability of *Rosa kordesii* extract gel. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 6, jun. 2013.

MATIAS, D. et al. Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities. **Biomolecules**, v. 9, n. 5, p. 179, 8 maio 2019.

MENAA, F.; MENAA, A.; TRÉTON, J. Polyphenols against Skin Aging. In: **Polyphenols in Human Health and Disease**. [s.l.] Elsevier, 2014.

MERCURIO, D. G. et al. In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, dez. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS Espécies vegetais**<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>, 2009.

MOORE, C. et al. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 34, 20 ago. 2013.

MOTA, M. D. et al. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 201, dez. 2019.

MOTHANA, R. A. et al. Comparative evaluation of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of the crude extracts of three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 2, p. 162–170, fev. 2019.

MOURET, S. et al. Individual Photosensitivity of Human Skin and UVA-Induced Pyrimidine Dimers in DNA. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 7, jul. 2011.

MURTHY, P. S.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1014–1018, jun. 2009.

NAPAGODA, M. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 800–809, fev. 2014.

NAPAGODA, M. T. et al. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 479, 24 dez. 2016.

NASCIMENTO, Y. M. **ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Zornia brasiliensis***. João Pessoa, 2016.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, 25 maio 2013.

NENADIS, N. et al. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, dez. 2015.

NGUYEN, N. Q. et al. Evaluation of total polyphenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Plectranthus amboinicus* leaves. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 736, p. 062017, 5 mar. 2020.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, 2015a.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, 2015b.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O. In vitro antimicrobial activity of plants in acute otitis externa. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 74, p. 118–124, 2008.

NUNES, A. R. et al. Use of Flavonoids and Cinnamates, the Main Photoprotectors with Natural Origin. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, 28 nov. 2018.

OLENNIKOV, D. N. et al. Bioactive Phenolics of the Genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS Profile of the Siberian Species and Their Inhibitory Potential Against α -Amylase and α -Glucosidase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 12 jul. 2018.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, mar. 2015.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77–82, 2006.

OLSZEWSKA, M. A.; GĘDAS, A.; SIMÕES, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. **Food Research International**, v. 134, p. 109214, ago. 2020.

OMS, O. M. DE S. **Radiation: Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer.**

OZAROWSKI, M. et al. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and in vitro cytotoxic potential on leukemia cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 2, mar. 2018.

PASSARI, L. M. Z. G. et al. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. **Food Chemistry**, v. 273, fev. 2019a.

PASSARI, L. M. Z. G. et al. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. **Food Chemistry**, v. 273, fev. 2019b.

PASSERON, T. et al. Sunscreen photoprotection and vitamin D status. **British Journal of Dermatology**, v. 181, n. 5, 15 nov. 2019.

PATON, A. J. et al. Nomenclatural changes in *Coleus* and *Plectranthus* (Lamiaceae): a tale of more than two genera. **PhytoKeys**, v. 129, p. 1–158, 23 ago. 2019.

PAULO, P. T. C. et al. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 68–76, 2009.

PEREIRA, O. R. et al. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. **Food Research International**, v. 54, n. 2, dez. 2013.

PERES, D. D. et al. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, ago. 2018a.

PERES, D. D. et al. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, ago. 2018b.

PETROVIĆ, J.; STOJKOVIĆ, D.; SOKOVIĆ, M. Terpene core in selected aromatic and edible plants: Natural health improving agents. In: [s.l: s.n.]. p. 423–451.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, 15 jan. 2015.

PIKULSKI, M.; BRODBELT, J. Differentiation of Flavonoid Glycoside Isomers by Using Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 14, p. 1437–1453, 2003.

PIRES, JANAÍNA. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1–5, 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, jun. 2015.

PORFÍRIO, S. et al. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 179–187, set. 2010.

PRASAD, R.; KATYAR, S. K. Prostaglandin E2 Promotes UV Radiation-Induced Immune Suppression through DNA Hypermethylation. **Neoplasia**, v. 15, n. 7, jul. 2013.

PREMI, S. et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, v. 347, n. 6224, 20 fev. 2015.

QUIRANTES-PINÉ, R. et al. Characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena extract by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17–18, set. 2010.

QUIST, S. et al. Kinetic Profile of Inflammation Markers in Human Skin In vivo Following Exposure to Ultraviolet B Indicates Synchronic Release of Cytokines and Prostanoids. **Acta Dermato Venereologica**, v. 96, n. 7, 2016.

RABINOVICH, L.; KAZLOUSKAYA, V. Herbal sun protection agents: Human studies. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 3, p. 369–375, maio 2018.

RADICE, M. et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. **Fitoterapia**, v. 114, out. 2016.

RAHIMMALEK, M. et al. Using HPLC and multivariate analyses to investigate variations in the polyphenolic compounds as well as antioxidant and antiglycative activities of some Lamiaceae species native to Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112640, out. 2020.

RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de Croton spp. da Caatinga. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, 30 maio 2018.

ROJAS, J.; LONDOÑO, C.; CIRO, Y. THE HEALTH BENEFITS OF NATURAL SKIN UVA PHOTOPROTECTIVE COMPOUNDS FOUND IN BOTANICAL SOURCES. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 13–23, 2016.

RUAN, M. et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC–DAD–ESI–MSn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, fev. 2012.

RUTKOWSKA, M. et al. Seasonal variation in phenylpropanoid biosynthesis and in vitro antioxidant activity of Sorbus domestica leaves: Harvesting time optimisation for medicinal application. **Industrial Crops and Products**, v. 156, nov. 2020.

RYAN, E. M. et al. Antioxidant properties of citric acid interfere with the uricase-based measurement of circulating uric acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, fev. 2019.

SAEWAN, N.; JIMTAISON, A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 14, n. 1, mar. 2015.

SAÉZ et al. Phenolic Profile of Grape Canes: Novel Compounds Identified by LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Molecules**, v. 24, n. 20, 18 out. 2019.

SAMANIEGO RASCÓN, D.; FERREIRA, A. D.; GAMEIRO DA SILVA, M. Cumulative and momentary skin exposures to solar radiation in central receiver solar systems. **Energy**, v. 137, out. 2017.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M. et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2, fev. 2009.

SANZ, M. et al. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (Fraxinus excelsior L. and F. americana L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 7, jul. 2012.

SAYRE, R. M. et al. A COMPARISON OF IN VIVO AND IN VITRO TESTING OF SUNSCREENING FORMULAS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, mar. 1979.

SBD, S. B. DE D. M. DA S. B. **Classificação dos fototipos de pele.**

SCHALKA, S. et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 6 suppl 1, dez. 2014.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. DOS. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, jun. 2011.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; GONZÁLEZ, B. Phenolic Profiling of the South American “Baylahuen” Tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 1, 8 jan. 2015.

SHAO, S.-Y. et al. Characterization and identification of the major flavonoids in *Phyllostachys edulis* leaf extract by UPLC–QTOF–MS/MS. **Acta Chromatographica**, v. 32, n. 4, dez. 2020.

SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, 2018.

SHARMA, T.; TYAGI, V.; BANSAL, M. Determination of sun protection factor of vegetable and fruit extracts using UV–Visible spectroscopy: A green approach. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, dez. 2020.

SHUBHA, J. R.; BHATT, P. *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 166, p. 220–227, maio 2015.

SIK, B. et al. Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 184, p. 113173, maio 2020.

SILITONGA, M. et al. Levels of Apigenin and Immunostimulatory Activity of Leaf Extracts of Bangunbangun (*Plectranthus Amboinicus* Lour). **International Journal of Biology**, v. 7, n. 1, 22 out. 2014.

SILVA, D. B. et al. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 7 maio 2015.

SKENDI, A.; IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, set. 2017.

SKLAR, L. R. et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 12, n. 1, 2013.

SPÍNOLA, V. et al. *Myrica faya*: A New Source of Antioxidant Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, 8 out. 2014.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, abr. 2015.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 6, jun. 2003.

STANOEVA, J. P. et al. LC/DAD/MSⁿ and ICP-AES Assay and Correlations between Phenolic Compounds and Toxic Metals in Endemic *Thymus alsarensis* from the Thallium Enriched Allchar Locality. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2017.

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

SULAIMAN, C. T.; DEEPAK, M.; BALACHANDRAN, I. Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, dez. 2018.

SWAMY, M. K. et al. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

TAAMALLI, A. et al. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 5, set. 2015.

TAARIT, M. BEN et al. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 951–956, 1 abr. 2010.

TAGASHIRA, H. et al. UVB Stimulates the Expression of Endothelin B Receptor in Human Melanocytes via a Sequential Activation of the p38/MSK1/CREB/MITF Pathway Which Can Be Interrupted by a French Maritime Pine Bark Extract through a Direct Inactivation of MSK1. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, 1 jun. 2015.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defence strategies adopted by the medicinal plant *Coleus forskohlii* against supplemental ultraviolet-B radiation: Augmentation of secondary metabolites and antioxidants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 124–138, dez. 2015.

TAKSHAK, S.; BHUSHAN AGRAWAL, S. Interactive effects of supplemental ultraviolet-B radiation and indole-3-acetic acid on *Coleus forskohlii* Briq.: Alterations in morphological-, physiological-, and biochemical characteristics and essential oil content. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 313–326, jan. 2018.

TAYLOR, V. F. et al. A mass spectrometric study of glucose, sucrose, and fructose using an inductively coupled plasma and electrospray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 243, n. 1, maio 2005.

THIBANE, V. S. et al. The cosmetic potential of plants from the Eastern Cape Province traditionally used for skincare and beauty. **South African Journal of Botany**, v. 122, maio 2019.

TOMAZELLI, L. C. et al. SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, n. 1–2, dez. 2018.

TRIVELLINI, A. et al. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress.” **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 241–254, maio 2016.

TROALEN, L. G. et al. Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L.: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis. **Anal. Methods**, v. 6, n. 22, 2014.

TSOPMEJIO, J. P. et al. Bioactive secondary metabolites from *Plectranthus glandulosus* Hook. (Lamiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 133–137, abr. 2019.

VENKATESHAPPA, S. M.; SREENATH, K. P. Potential medicinal plants of Lamiaceae. **AJRFANS**, v. 239, p. 82–87, 2013.

VERARDO, G.; DUSE, I.; CALLEA, A. Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with post-column addition of formic acid. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 11, 15 jun. 2009.

VIJAYAKUMAR, S. et al. *Plectranthus amboinicus* leaf extract mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and its control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm and blood sucking mosquito larvae. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, fev. 2015.

WALDMAN, R. A.; GRANT-KELS, J. M. The role of sunscreen in the prevention of cutaneous melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 2, fev. 2019.

WALTERS, H. A.; ROBERTS, M. S. **Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches**. 1. ed. Nova York: Informa Healthcare, 2008. v. 1

WANG, P. et al. Cyclooxygenases mediate early induction of interleukin-6 expression by solar ultraviolet irradiation in human skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 87, n. 2, ago. 2017.

WANG, S. et al. Structural Characterization and Identification of Major Constituents in Jitai Tablets by High-Performance Liquid Chromatography/Diode-Array Detection Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 17, n. 9, 3 set. 2012.

WANG, S. Q.; LIM, H. W. (EDS.). **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, 31 out. 2012.

WATTS, C. G. et al. Sunscreen Use and Melanoma Risk Among Young Australian Adults. **JAMA Dermatology**, v. 154, n. 9, 1 set. 2018.

YEAGER, D. G.; LIM, H. W. What's New in Photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 2, p. 149–157, abr. 2019.

YOSHIDA, L. C. T. **Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica**. São Paulo, 2017.

YOSHIZUMI, M. et al. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. **Cell Biology International**, v. 32, n. 11, nov. 2008.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, mar. 2017.

YULIANTO, W. et al. BIOACTIVE COMPOUNDS FROM TORBANGUN (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) SPRENG) CHLOROFORM FRACTION INDUCE APOPTOSIS IN BREAST CANCER (MCF-7 CELLS) IN VITRO. **Trad. Med. J.**, v. 22, n. 1, p. 37–44, 2017.

ZENG, G. et al. Identification of phenolic constituents in *RadixSalvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 3, 15 fev. 2006.

ZHANG, B. et al. Growing medium amendments effect on growth, secondary metabolites and anti-streptococcal activity of two species of *Plectranthus*. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 5, p. 53–59, maio 2017.

ZHAO, Q. et al. Effect of Genotype and Environment on *Salvia miltiorrhiza* Roots Using LC/MS-Based Metabolomics. **Molecules**, v. 21, n. 4, 26 mar. 2016.

ZHONG, L. et al. An Optimized Method for Extraction and Characterization of Phenolic Compounds in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* Flower. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 23 dez. 2019.

ZHOU, Q.-M. et al. New triterpenoids from *Leonurus japonicus* (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 82, p. 27–30, fev. 2019.

ZHU, Z. et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *RadixSalvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, 30 jun. 2007.

ZOUARI-BOUASSIDA, K. et al. Seasonal Variation in Essential Oils Composition and the Biological and Pharmaceutical Protective Effects of *Mentha longifolia* Leaves Grown in Tunisia. **BioMed Research International**, v. 2018, 9 dez. 2018.

ŻUKOWSKI, P.; MACIEJCZYK, M.; WASZKIEL, D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. **Archives of Oral Biology**, v. 92, ago. 2018.

ZUNJAR, V.; MAMMEN, D.; TRIVEDI, B. M. Antioxidant activities and phenolics profiling of different parts of *Carica papaya* by LCMS-MS. **Natural Product Research**, v. 29, n. 22, 17 nov. 2015.

Apêndice A



Photoprotective Activity of *Plectranthus amboinicus* Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid

Márcio Vinícius C. Terto¹ · Juliana M. Gomes¹ · Diego Igor A. F. Araújo¹ · Taina S. Silva² · Jailson M. Ferreira³ · João Jarllys N. Souza⁴ · Marcelo S. Silva¹ · Josean F. Tavares¹

Received: 17 September 2019 / Accepted: 21 December 2019
© Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2020

Abstract

Overexposure to sunlight has harmful effects on the skin and can cause erythema and skin cancer. Photoprotective agents are important for preventing exposure to sunlight and are present in the composition of sunscreens. Globally, the use of filters based on natural products has gained interest in scientific studies; in addition to their sunscreen properties, these products demonstrate antioxidant, healing, and moisturizing activity. These favor adequate sun protection due to the wide spectrum of activities and are environmentally friendly. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, is used in traditional medicine to treat several conditions and is commonly known as “hortelã-da-folha-grossa” in Brazil. This species presents phenolic compounds, including rosmarinic acid, and has been studied for photoprotection and antioxidant activity. The aim of this study was to evaluate the photoprotection potential and antioxidant activity, and to develop analytic methodology for extract standardization and validation. Thus, maximum absorbance, sun protection factor, DPPH radical scavenging activity, and total phenolic contents of *P. amboinicus* crude ethanolic extract were determined, and an HPLC analytical methodology was developed and validated to quantify rosmarinic acid. Analyses revealed that the extract presented good photoprotection (SPF = 12.63), promising antioxidant activity ($EC_{50} = 112.39 \mu\text{g/ml}$), total phenolic content ($142.39 \pm 1.12 \text{ mg GAE/g}$), and rosmarinic acid concentrations ($22.5 \mu\text{g/ml}$). In addition, an HPLC analytical method was validated for marker quantification. These results show that the extract has potential photoprotective and antioxidant activity, and this favors the isolation of a final product with protective characteristics that encompass broad spectrum action and biological protection.

Keywords Photoprotection · Ultraviolet · Solar radiation · Skin damages · “hortelã-da-folha-grossa”

Introduction

Ultraviolet (UV) radiation can lead to acute and chronic skin problems. These processes are related to the action of UVA

and UVB radiation when the skin is exposed to excessive amounts of sunlight (Souza et al. 2011; Tosato et al. 2015).

For effective photoprotective action, a product must present broad-spectrum UV radiation protection, corresponding to UVB (290–320 nm) and UVA (320–400 nm) radiation. The world market now uses more filters of natural origin because they have reduced side effects, are less aggressive to the environment, present dermal hydration capacity, and are phenolic compounds with antioxidant activity that can eliminate harmful free radicals generated by excessive exposure to the sun (Ferdinando et al. 2014; Mercurio et al. 2015).

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., Lamiaceae, is a medicinal plant widely used in India, China, and Brazil, to treat several diseases (Murthy et al. 2009; El-hawary et al. 2012; Arumugam et al. 2016). In Brazil, this species is popularly known as “hortelã-da-folha-grossa” and is mainly used against respiratory diseases and microbial infections (França

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s43450-020-00040-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Josean F. Tavares
josean@lft.ufpb.br

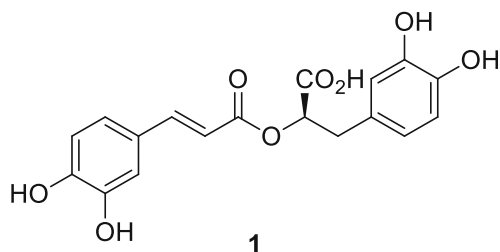
¹ Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

² Instituto Federal da Paraíba, Catolé do Rocha, PB, Brazil

³ Laboratório de Caracterização de Nanomateriais, Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

et al. 2008; Nogueira et al. 2008; Paulo et al. 2009). Studies have demonstrated that this plant possesses anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, and antimicrobial activities (Murthy et al. 2009; El-hawary et al. 2012; Arumugam et al. 2016), which may be related to the existence of phenolic compounds (El-hawary et al. 2012; Arumugam et al. 2016; Sulaiman et al. 2018). Among these, rosmarinic acid (**1**) is notable and has been the target of studies on photoprotection (Psotova et al. 2006; Sánchez-Campillo et al. 2009), with good antioxidant activity described (Gil ede et al. 2013; Amoah et al. 2015; Zhu et al. 2014).



Thus, considering the therapeutic potential of *P. amboinicus* extract, this study aimed to evaluate the potential photoprotective and antioxidant activity of *P. amboinicus*, and to develop and validate analytical methodology for extract standardization.

Materials and Methods

Plant Material

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng., Lamiaceae, was collected on April 4, 2017, at the Federal University of Paraíba, Institute of Pharmaceuticals Research Institute (coordinates 7° 8' 29.875" S/34° 50' 48.757" W), Campus I, João Pessoa, PB. A specimen was deposited at Lauro Pires Xavier Herbarium (JPB/UFPB) under accession number JPB0047239; this species was identified by Prof. Rita Baltazar de Lima and registered at the SISGEN (National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge) platform under reference number AAB0FA6.

Preparation of Crude Ethanol Extract

Fresh aerial parts (2150 kg) were coarsely ground and then macerated in 95% ethanol for three consecutive days; this process was repeated three times. Three-liters of ethanol were used for each repetition, for a total of 9 l of ethanol throughout the maceration process. After extraction, the extracted solution was concentrated on a rotary evaporator at 40 °C to give crude ethanolic extract (CEE). After evaporation of the solvent, 52 g of the extract was obtained.

Maximum Absorbance Determination

The extract was incorporated into a cosmetic base at a concentration of 10% and then diluted to obtain a concentration of 0.2 mg/ml using absolute ethanol as a solvent. The readings were obtained by scanning wavelengths from 200 to 400 nm on a visible UV spectrophotometer (UV-2550 Shimadzu), using a 1-cm quartz cell and absolute ethanol used as a blank. The analysis was performed in triplicate.

In Vitro Determination of Sun Protection Factor

According to the method described by Mansur et al. (1986), which is used widely because it is rapid and accessible and demonstrates good correlation with *in vivo* methods (Nascimento et al. 2014), SPF was calculated using formula 1. The formulation was prepared and diluted to determine the maximum absorbance using a UV-2550 Shimadzu visible UV spectrophotometer with a 1-cm quartz cell and absolute ethanol as a blank. The analysis was performed in triplicate.

Reference Chemical Substance

Rosmarinic acid was used as an analysis standard for high-performance liquid chromatography (HPLC). Rosmarinic acid (>95% purity) was obtained from Sigma Aldrich, and was also used as a chemical marker of the *P. amboinicus* extract.

Solvents and Reagents

The solvents used were HPLC-grade methanol (Tedia®, Brazil), formic acid (J. T. Baker®), acetic acid (J. T. Baker®), phosphoric acid (Proquimios®), and ultrapure water obtained from a purification system (Milli-Q-Millipore®).

HPLC Analytical Chromatographic Method Development

Analyses were performed using a Shimadzu HPLC system (Prominence) equipped with a SPD-M20A diode array detector, an oven temperature of 26 °C, and LC Solution® software. A Kromasil® C18 column (250 × 4.6 mm d.i. filled with 5-μm particles), with a Security Guard Gemini® C18 pre-column (4 × 3.0 mm d.i. filled with 5 μm particles) were used. The flow rate was 0.6 ml/min, the injection volume was 20 μl, and the detection was performed at 330 nm. Mobile phase A consisted of ultrapure water with 0.1% formic acid, and mobile phase B consisted of pure methanol. Both extract and standard RA solutions were prepared using MeOH:H₂O with 0.1% formic acid (50:50 v/v). The run was initiated with 50% solvent B, increased to 60% over 20 min, returned to 50% over 21 min, and remained at 50% of solvent B for the final 26 min.

Characterization of Crude Ethanolic Extract

Rosmarinic Acid Quantification

Using the HPLC analytical method, rosmarinic acid was quantified in *P. amboinicus* extract using the calibration curve made in method linearity parameter. The chromatograms were analyzed at 330 nm.

Total Phenol Content

The total phenol content was determined as described by Singleton et al. (1999), using gallic acid as a standard. Samples were solubilized in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml. The Folin-Ciocalteu reagent was added to each sample, and then after 8 min, Na_2CO_3 (7.5%) was added to the mixture; the absorbance was measured at 765 nm after 2 h. A linear regression equation was calculated from a calibration curve constructed with standard gallic acid solution (25, 50, 75, 100, and 150 $\mu\text{g/ml}$), and the results were expressed in milligrams of gallic acid equivalent per gram of extract (mg GAE/g sample). Analyses were performed in triplicate and repeated for 3 days.

Determination of Antioxidant Activity

Antioxidant activity was determined as described by Garcez et al. (2009), with few adaptations. Different concentrations of extract (10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g/ml}$) were chosen based on preliminary tests, and DPPH solution (0.3 mM) was used for the reaction. After 30 min at rest in the dark, absorbance was measured at 518 nm. Sample activity was expressed as EC_{50} . Ascorbic acid was used as a standard. Analyses were performed in triplicate and repeated for 3 days.

Validation of the Analytical HPLC Method

The analytical HPLC method was validated following procedures from Anvisa resolution 166/2017 (Anvisa 2017). Linearity, specificity, precision, intermediate precision, accuracy, matrix effect, and robustness were evaluated.

Linearity

According to Anvisa (2017), linearity confirms that the method is directly proportional to the concentration of the analyte used within a specified time interval. Concentrations used for this test were 5.6, 11.25, 22.5, 45, and 90 $\mu\text{g/ml}$.

Matrix Effect

According to Anvisa (2017), the comparison of angular coefficients from the calibration curves constructed with SRQ and

analyte-fortified with SRQ needs to indicate that there is no interference of the matrix constituents, and it can be seen through lines parallelism. Thus, five samples of 1 mg/ml *P. amboinicus* extract were prepared, and volumes of 20, 30, 40, 50, and 60 μl RA were added at a concentration of 1 mg/ml, corresponding to 45.93, 53.28, 62.07, 70.68, and 78.78 $\mu\text{g/ml}$ rosmarinic acid, respectively, from rosmarinic acid-fortified samples.

Specificity

This parameter demonstrates the ability of the method to analyze the analyte of interest in the presence of impurities, degradation products, and matrix components (Anvisa 2017). Thus, mobile phase, rosmarinic acid (standard) (22.5 $\mu\text{g/ml}$), extract (1 mg/ml), and diluent solution were subjected to HPLC analysis with the aid of a diode array detector (DAD) to observe wavelengths from 190 to 800 nm, to detect the coelution of any peaks with that of the chemical marker.

Precision

Precision was confirmed using six determinations at 100% of the concentration used (22.50 $\mu\text{g/ml}$). Intermediate precision was determined by analyzing the consistency between the results obtained with different analysts and/or different equipment, on different days, but in the same laboratory. For this, the maximum relative standard deviation could not exceed 5% (Anvisa 2017).

Accuracy

Three samples each of low, medium, and high concentrations were prepared in triplicate to evaluate accuracy. The standard was added in known quantities to solutions of the *P. amboinicus* extract. Accuracy was assessed using the percent recovery of rosmarinic acid marker solutions added to the extract solution samples. The acceptable recovery limits were 90–110%.

Detection and Quantification Limits

Detection and quantification limits were calculated according to Anvisa (2017) using a linearity curve and are defined as the minimum concentrations that can be detected and quantified by HPLC-DAD.

Robustness

Robustness is defined as the ability of the method to withstand slight variations in analytical parameters, with an acceptance limit of 90–110%. Triplicate samples were prepared for both

rosmarinic acid and extract at 100% concentrations (Anvisa 2017).

Statistical Analysis

Statistical analyses were compared through one-way analysis of variance (ANOVA). Results were considered statistically different when $p < 0.05$. Student's t test was also used when necessary, Tukey's test was performed as a post-test for ANOVA, using GraphPad Prism 6.07, with a 95% level of significance.

Results and Discussion

In Vitro Determination of Maximum Absorbance and SPF

Determination of maximum absorbance via spectrophotometric analysis of *P. amboinicus* extract revealed that the highest absorbance peak for UVB sunscreens was 1.402 at 290 nm, and this plateau also extended to the UVA region, with the highest absorbance (1.481) around 330 nm. These absorbances extended across the spectrum of UVB and UVA bands, thus indicating the broad-spectrum activity of this extract.

Thus, the photoprotective potential was found to be correlated with the ability of the extract to present adequate absorption bands for a sunscreen, which matches the restricted region of the electromagnetic radiation spectrum that encompasses UVA and UVB radiation. In the UVB spectrum region, information obtained from the *in vitro* tests indicated that SPF is responsible for preventing the formation of erythema and the development of skin cancer. Within the UVA spectrum, compounds with good absorption bands produce filters that can prevent photoaging and skin cancer. The SPF value, which was calculated based on values presented by the absorbance graph, was 12.63, which is higher than the minimum value recommended by Anvisa (SPF = 6) (Anvisa 2012). Therefore, the CEE preparation of *P. amboinicus* is promising for photoprotection compared with the other extracts, and has a high SPF. In a study with aqueous extracts, Rosa et al. (2008) calculated the SPF of *A. millefolium* (SPF = 8), *Brassica oleracea* var. *capitata* (SPF = 5), *C. rotundus* (SPF = 1), *P. barbatus* (SPF = 2), *P. ruderalis* Cass (SPF = 5), and *S. oleraceus* (SPF = 6). These values were lower than those reported in the present study, i.e., at 12.63.

Characterization of Crude Ethanolic Extract

Rosmarinic Acid Quantification

Using the calibration curve prepared with the rosmarinic acid standard developed in the linearity parameter, rosmarinic acid

in the extract was analyzed by comparing the rosmarinic acid peak area between the sample and the standard. The rosmarinic acid content was 22.48 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$, as indicated by standardization of the *P. amboinicus* extract. Based on the rosmarinic acid standard run, its retention time (T_R) was 9.623 min, which was the same as that observed in the *P. amboinicus* extract for this compound, in which the rosmarinic acid marker had a T_R of 9.619 min (Fig. 1).

Total Phenol Content

The phenol content in the *P. amboinicus* extract was 142.39 ± 1.12 mg GAE/g of extract, as determined following construction of the gallic acid curve. This was compared with the results of other studies on the plants of the *Plectranthus* genus. Mendonça (2016) evaluated the total phenolic content of *P. amboinicus*, *P. barbatus*, and *P. ornatos* leaves, and reported values of 9.31, 9.2, and 10.80 mg GAE/g fresh leaf, respectively, indicating that the values found in the present study are promising.

Thus, compared with previous reports, the CEE of *P. amboinicus* was found to present considerable amounts of phenolic compounds, highlighting the potential of this species for photoprotective use, since plant extracts rich in phenolic constituents, such as flavonoids, have been employed in photoprotective formulations associated with UV filters. In addition, the genus *Plectranthus* contains polyphenols such as rosmarinic acid, quercetin, caffeic acid (SPF = 28), cinnamic acid, and naringenin (SPF = 12.3); since they present absorption bands between 290 and 330 nm, species of this genus are important candidates for use in sunscreens (Stevanato et al. 2014).

Determination of Antioxidant Activity

The antioxidant activity, expressed as EC_{50} , was 112.39 $\mu\text{g/ml}$, while that of ascorbic acid was 10.87 $\mu\text{g/ml}$. Thus, the EC_{50} of *P. amboinicus* was promising, even though it was lower than that of the standard; further studies are needed to determine its antioxidant activity. Mendonça (2016) evaluated the radical scavenging activity of *P. amboinicus*, *P. ornatos*, and *P. barbatus* species against DPPH, and reported EC_{50} values of 510, 500, and 280 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Therefore, in the present study, the EC_{50} value was more effective, which may be due to higher concentrations of phenol compounds.

Validation of Analytical HPLC Methodology

Linearity Linearity was determined by constructing a rosmarinic acid standard curve using concentrations of 5.6–90 μg rosmarinic acid/ml diluent solution. Using the curve, it was possible to identify the equation of the line, which was

$y = 82,037x + 139,625$ and $R^2 = 0.9998$ ($r = 0.9998$). All analyses were performed in triplicate. The least-squares method was used for elaboration of the calibration curve, based on analyses of the different concentrations, taking the average of three repetitions per concentration level. Regression analysis of variance was performed, revealing significant angular coefficient and validity of the regression line.

These results indicate that the linearity is consistent with the recommendations of Anvisa (2017), with a minimum correlation coefficient value of 0.99.

Matrix Effect The matrix effect was calculated by constructing a curve of rosmarinic acid-fortified samples, considering the area of the rosmarinic acid peak formed at each concentration. Thus, the curve was compared with linearity to determine the existence of parallelism between the lines. Since its angular coefficient was equal to that of linearity, $\alpha = 82.037$, this indicated there is no matrix effect. All analyses were performed in triplicate.

Detection and Quantitation Limits The detection and quantification limits were calculated from the extrapolation of the calibration curve data following Anvisa (2017). The limit of detection for rosmarinic acid was 1.25 µg/ml, and the limit of quantitation was 4.18 µg/ml.

Specificity Analysis of the chromatograms obtained from the standard, sample, mobile phase, and diluent solutions, revealed that no peaks coeluted with those of the rosmarinic acid standard. This indicates that at the wavelength used, no other substances were present at the same retention time, and that the method was specific.

Precision The results obtained to confirm repeatability, which evaluated the accuracy of the method between runs performed by the same analyst, revealed that the relative standard deviation of analyses performed by analyst 1 was 1.73%, and by analyst 2 were 0.33%, meeting the requirements of Anvisa (2017), which indicates that $DPR < 5\%$. Thus, the relative deviations observed were not significant, demonstrating that the method was precise and that there was no variation among the analysts.

Intermediate precision data showed that the relative standard deviation was 1.32% between the results reported by analyst 1 and 2, which was also consistent with the limits required by Anvisa (2017); the t test revealed no statistical difference between the analyses. Therefore, these results indicate that the proposed method is precise.

Accuracy The average recovery values found for the concentrations of 5.6, 22.5, and 90 µg/ml were 95.28 ± 0.43 , 96.36 ± 0.05 , and 104.1 ± 0.17 , respectively. This demonstrates that the method is accurate for quantification of the standard

according to the recommended resolution, which allows 90–110% variation (Anvisa 2017).

Robustness The robustness test evaluated variables such as pH, temperature, composition of the mobile phase, column, and flow. CEE and standard samples were analyzed separately. The results showed that changes in the pH, temperature, column, and mobile phase composition did not influence the retention time of substances, comparing standard and samples. Thus, the method was considered to be robust based on the values obtained. The relative standard deviation was inferior to 1.03% in all determinations, which was consistent with the requirements of current legislation.

Conclusion

The *P. amboinicus* extract was quantified and validated in rosmarinic acid and demonstrated antioxidant activity *in vitro*, the presence of phenolic compounds, and the ability to filter solar radiation in the UVB and UVA wavelengths. Thus, it presents great potential for development of a differentiated cosmetic based on a natural product, which has benefits for skin protection through the ability to filter UV rays, inhibit free radicals, and with limited damage to the environment.

Authors' Contributions MVCT and JMG were responsible for collecting plant material, producing crude ethanolic extract, formulation production, and interpretation of results. MSS and JFT contributed to determining phenolic contents and antioxidant activity, interpretation of results, and coordinated the project. MVCT, JMG, and DIAFA developed and validated the analytical HPLC method. TSS, JJNS, and JMF were responsible for determining the SPF of the extract. All the authors have read the final manuscript and approve the submission.

Funding Information This work was supported by Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (UFPB), Lanano (IFPB) and GenusPharma®, National Institutes of Science and Technology Program (INCT); CNPq and CAPES code 001, Brazil, in the form of a PhD scholarship to MVCT.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amoah SKS, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW (2015) Rosmarinic acid – pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Med* 82:388–406
- Anvisa (2012) Resolução RDC N° 30 de 1° de junho de 2012, Ministério da Saúde, Brasília, DF 2012
- Anvisa (2017) Resolução RE n° 166 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF

- Arumugam G, Swamy MK, Sinniah UR (2016) *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
- El-Hawary SS, El-Sofany RH, Abdel-Monem AR, Ashour RS, Sleem AA (2012) Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Phcog J* 4:45–54
- Ferdinando MD, Brunettia C, Agatib G, Tattinic M (2014) Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ Exp Bot* 103:107–116
- França ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VR (2008) Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev Bras Enferm* 61: 201–208
- Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Miguita CH (2009) Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Química Nova* 32(2):407–411
- Gil Ede S, Enache TA, Oliveira-Brett AM (2013) Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. *Comb Chem High Throughput Screen* 16:92–97
- Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD (1986) Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol* 61:121–124
- Mendonça SC (2016) Atividades antioxidantes, anti-candida e inibitórias da lipoxigenase e alfaamilase de espécies medicinais do gênero *plectranthus*. MSc. Dissertation, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG
- Mercurio DG, Wagemaker TAL, Alves VM, Benevenuto CG, Gaspar LR, Maia PMBG (2015) *In vivo* photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. *J Photochem Photobiol B* 153:121–126
- Murthy PS, Ramalakshmi K, Srinivas P (2009) Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chem* 114:1014–1018
- Nascimento LF, Santos EP, Aguiar AP (2014) Fotoprotetores orgânicos: pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. *Rev Virtual Quim* 6:190–223
- Nogueira JCR, Diniz MFM, Lima EO (2008) *In vitro* antimicrobial activity of plants in acute otitis externa. *Rev Bras Otorrinolaringol* 74: 118–124
- Paulo PTC, MFFM D, De Moraes LCSL, Andrade FB, Santos HB (2009) Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). *Rev Bras Farmacogn* 19:68–76
- Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, Walterova D (2006) Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 84:167–174
- Rosa MB, Oliveira TG, Carvalho CA, Silva FD, Carvalho LM, Nascimento PC, Peres RL (2008) Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. *Rev Eletrônica Farm* 5:101–110
- Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavette-García O, Del Bão MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA (2009) Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol* 47:386–392
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols content and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299:152–177
- Souza RJSP, Mattedi AP, Correa MP, Rezende ML, Ferreira ACA (2011) An estimate of the cost of treating non-melanoma skin cancer in the state of Sao Paulo, Brazil. *An Bras Dermatol* 86:657–662
- Stevanato R, Bertelle M, Fabris S (2014) Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69(1):71–77
- Sulaiman CT, Deepak M, Balachandran I (2018) Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. *Beni-Suef Univ J Bas Appl Sci* 7:471–473
- Tosato MG, Orallo DE, Ali SM, Churio MS, Martin AA, Dixelio L (2015) Confocal Raman spectroscopy: in vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. *J Photochem Photobiol B* 153:51–58
- Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H (2014) Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. *J Agric Food Chem* 62:885–892

Apêndice B

Article

Seasonal Variations of Polyphenols Content, Sun Protection Factor and Antioxidant Activity of Two Lamiaceae Species

Juliana de Medeiros Gomes, Márcio Vinícius Cahino Terto, Sócrates Golzio do Santos, Marcelo Sobral da Silva and Josean Fechine Tavares * 

Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil; juliana@ltf.ufpb.br (J.d.M.G.); cahino@ltf.ufpb.br (M.V.C.T.); socratesgolzio@ltf.ufpb.br (S.G.d.S.); marcelosobral.ufpb@gmail.com (M.S.d.S.)

* Correspondence: josean@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-98802-7809

Abstract: Secondary metabolite production by plants is influenced by external environmental factors that can change depending on the seasons, which makes it important to know how the plant, through its metabolism, is able to adapt to these variations. *Mentha x villosa* and *Plectranthus amboinicus* present in their chemical composition polyphenols, and through previous studies, it has been seen that these two species present promising in vitro photoprotective activity. The aim of this study was to evaluate seasonal alterations in photoprotective and antioxidant activities and the influence of factors such as precipitation levels and sun radiation incidence. Thus, polyphenol quantification, chromatographics (HPLC-DAD) and multivariate (PCA) analyses of extracts of the two species through twelve months were done. It was observed that the best months for photoprotective and antioxidant activities were September for *M. villosa* and July for *P. amboinicus* (SPF = 14.79). It was possible to conclude that solar radiation more clearly influences the production of phenolics and the increase of SPF in *M. villosa*, in addition to favoring the antioxidant activity of the two species, while precipitation seems to have no influence.



Citation: de Medeiros Gomes, J.; Cahino Terto, M.V.; Golzio do Santos, S.; Sobral da Silva, M.; Fechine Tavares, J. Seasonal Variations of Polyphenols Content, Sun Protection Factor and Antioxidant Activity of Two Lamiaceae Species. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 110. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010110>

Received: 5 December 2020

Accepted: 13 January 2021

Published: 16 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: photoprotection; *M. villosa*; *P. amboinicus*; ultraviolet radiation; PCA; seasonality

1. Introduction

Seasonal variations of secondary metabolites produced by plants, both qualitatively and quantitatively, can occur throughout the year in response to modifications in plant environmental conditions, including climatic [1,2]. This variation can also modify the biological activity that plant extracts have, since samples of the same plant collected in different months will present, or not, some compounds, as well as their concentration can also be different, thus, the extract can even present different pharmacological properties throughout the year [3,4].

It is known that an increase of UVB radiation incidence and a decrease of precipitation can cause an increase in the production of free radicals, causing cellular damage that forces the plant to respond to this stimulus, altering morphological characteristics until the content of metabolites produced change, i.e., the increase of polyphenols [5]. Therefore, by evaluating environmental factors such as temperature, water availability, solar radiation incidence, among others, we can better understand the metabolic alterations happening in plants [6–8].

Mentha x villosa Hudson and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng are two species from the Lamiaceae Family that, in Brazil, that are popularly called “hortelã da folha miúda” and “hortelã da folha grossa”, respectively. They are used in folk medicine mainly as antimicrobials, but *M. x villosa* is also used in the form of infusion or decoction of its leaves to treat stomach problems and menstrual cramps, in addition to being used as a sedative [9] and an antiparasitic [10]. Scientifically, its endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant

effects have been demonstrated [11], as well as its antimicrobial, antinociceptive [12], antitumor [13], anti-inflammatory [14] and antioxidant activities [15,16]. *P. amboinicus* is used for the treatment of colds, coughs, asthma, and diseases of the respiratory tract in general, as well as to treat headaches, fever, skin diseases, and gastrointestinal disorders [17–19]. Thus, because it is a well-known species and used by the population, many studies on its effects already exist and demonstrate its antimicrobial and antiviral activities in vitro [20,21], activity against respiratory and gastrointestinal disorders, anticonvulsant, antitumor [22,23], analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant activities [24,25]. These two species are also used in culinary as flavorings and in the preparation of some foods [17,26].

Many of the biological activities presented by *M. villosa* and *P. amboinicus* are due to the presence of essential oils that are widely studied and have monoterpenes and sesquiterpenes in their composition [17,27]. However, its nonvolatile extracts also have a large amount of biologically interesting compounds, such as phenolic compounds. In *M. villosa*, several phenolic acids have been identified, such as rosmarinic acid, quinic acid, and chlorogenic acid, as well as several flavonoids, such as luteolin and apigenin derivatives, hesperidin, kaempferol-3-O-glucuronide, eriocitrin and chrysoeriol-7-O-rutinoside [28]. In *P. amboinicus*, many polyphenols have also been identified, such as caffeic acid, gallic acid, rosmarinic acid, crisimaritin, luteolin, and apigenin derivatives, p-cumaric acid, taxolifin, among others [29].

Therefore, these species present in their chemical composition an interesting quantity of phenolic compounds, that are a secondary metabolite class mainly known because of their anti-inflammatory, antioxidant and photoprotective properties [30–32]. Their antioxidant properties are closely linked to their stable chemical structures, making them capable of neutralizing reactive oxygen species (ROS), inhibiting lipid peroxidation, and even preventing the production of free radicals [33].

A relevant property attributed to this metabolite class is the solar protection activity, since they are capable of filtering the incident ultraviolet radiation. Therefore, when UVB and UVA rays intensity is high, plants can be stimulated to produce phenolic compounds so they can absorb or disperse solar energy and make it harder to damage plant tissues [34,35].

M. villosa and *P. amboinicus* have rosmarinic acid (RA) as the majority compound in their ethanolic extracts. Studies related to photoprotective activity of this acid have showed a favorable future for this metabolite, since its photoprotective capacity has been observed, besides having good antioxidant activity and contributing to lipid peroxidation inhibition [36–38], which places it in a relevant position in the development of new sunscreens.

Thus, based on the extensive literature demonstrating *M. x villosa* and *P. amboinicus* therapeutic aspects, these two species deserve attention, mainly in areas where they are not well explored, such as in photoprotection and seasonality of nonvolatile extracts, since plants employ many mechanisms to adapt themselves to its environmental conditions in order to regulate its metabolism [39] and it can directly impact in secondary metabolites production. Therefore, understanding the annual variations of secondary metabolites of these two species can help us to better use them in terms of pharmaceutical product development. A previous study by Terto et al. [40], as well as unpublished data [41], showed that these two species have promising photoprotective activity in vitro since they presented a sun protection factor (SPF) of around 13. Thus, we evaluated the seasonal variations that occurred in *M. x villosa* and *P. amboinicus*, by monitoring the quantitative production of polyphenols, flavonoids, and rosmarinic acid month by month, the role of solar radiation, and precipitation in the production of these metabolites and their implications for the SPF and antioxidant activity of these extracts.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Aerial parts of *Mentha x villosa* Hudson and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, were collected at 8 am on the 20th of every month, from January to December 2019, where they were cultivated at the Federal University of Paraiba, Institute of Pharma-

ceuticals Research (coordinates 7°8'29.875" S/34°50'48.757" W), Campus I, João Pessoa, PB. A specimen of *M. villosa* was placed in the Herbário Prisco Bezerra, from the Federal University of Ceará, Fortaleza—CE, under n 14.996. This plant is registered at the SISGEN (National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge) platform under reference number A3BA60D. A specimen of *P. amboinicus* species is deposited at Lauro Pires Xavier Herbarium (JPB/UFPB) under number identification JPB0047239 and its register at SISGEN is under reference number AAB0FA6.

2.2. Preparation of Crude Ethanol Extracts

Fresh aerial parts (500 g) of *M. villosa* and *P. amboinicus* were crushed and submitted to maceration in 96% ethanol for three consecutive days; this process was repeated three times. 4 l of ethanol was used in the maceration process of *M. villosa* and 3 l of ethanol for *P. amboinicus*. After maceration, extracted solutions were concentrated using rotary evaporator equipment at 40 °C to obtain the crude ethanolic extracts (CEE) of the two species, weighing approximately 11.5 g for *M. villosa* and 12.37 g for *P. amboinicus*. The maceration process was repeated every month of 2019 right after aerial parts harvest, resulting in 12 *M. x villosa* ethanolic extracts and 12 *P. amboinicus* ethanolic extrats. All of these extracts were used in every test made.

2.3. Reagents and Equipment

Solvents used were HPLC-grade methanol (Tedia[®], Rio de Janeiro, Brazil), formic acid (J. T. Baker[®], Aparecida de Goiânia, Brazil), acetic acid (J. T. Baker[®], Aparecida de Goiânia, Brazil), phosphoric acid (Proquimios[®], Rio de Janeiro, Brazil), and type I water obtained by a purification system (Milli-Q-Millipore[®]), besides absolute ethanol (Neon[®], Suzano, Brazil), Polawax[®] cream (João Pessoa, Brazil), Folin-Ciocalteu reagent, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), aluminum chloride (AlCl₃) and Rosmarinic acid (RA) obtained from Sigma Aldrich[®], São Paulo, Brazil, with 96% of purity.

The used equipments were a UV-visible spectrophotometer (UV-2550, Shimadzu[®], Barueri, Brazil) and an HPLC system from Shimadzu[®] (prominence) equipped with LC-20AT quaternary solvent pumping module, SIL-20A HT auto-injector, DGU-20A5R degassing system, CTO-20A column oven, detector SPD-M20A diode array and CBM-20A controller. The column used was Kromasil[®] C18 (250 mm × 4.6 mm a.i. filled with 5 µm particles) (Sigma Aldrich[®], São Paulo, Brazil), with SecurityGuard Gemini[®] C18 pre-column (4 mm × 3.0 mm a.i. filled with 5 µm particles). The LC Solution[®] software (Shimadzu[®], Barueri, Brazil) was used for equipment control, data acquisition, and analysis.

2.4. HPLC Analytical Chromatographic Methods

The method used for quantification of RA in *M. villosa* begins at 38% of solvent B, reaching 42% in 5 min and remains at this concentration until 9 min. From 9 to 12 min, the gradient is altered from 42 to 45% of solvent B and it reaches 50% in 15 min. From 15 to 17 min, the gradient returns to 45%, and it remains unchanged until 20 min, when it returns to the initial condition at 38% of mobile phase B, and the run stops at 24 min at this concentration. The flow rate used was 1 mL/min, oven temperature at 26 °C, the injection volume of 20 µL, the detection was performed at 330 nm by a diode array UV (DAD). In addition, extract and standard samples were made in triplicate and filtered with the diluent solution at a concentration of 50% : 50% MeOH : acidified water (0.1% of H₃PO₄).

For extract samples of *P. amboinicus*, a diluent solution used was MeOH:acidified water (0.1% of formic acid) 1:1, the run starts at 50% of solvent B and reaches 60% in 20 min, returning to 50% in 21 min and remaining at this concentration until the end, at 26 min. In this case, the flow rate used was 0.6 mL/min [40].

2.5. Solar Radiation and Precipitation Treatments

The exposure consisted of submitting plants to naturally occurring solar radiation and precipitation during 2019 at their harvest place at the Institute of Pharmaceuticals

Research—UFPB and collecting adult plants to observe changes in the content of investigated compounds among each month of harvest. Solar radiation incidence and precipitation data were collected on the website (<https://portal.inmet.gov.br/>) of the National Meteorologic Institute of Brazil (INMET).

2.6. Total Polyphenol Content Determination

In this assay [42], 120 µL of samples (from the two plants, for each month) at a concentration of 1 mg/mL were treated with 500 µL of Folin–Ciocalteu (10%) reagent and gallic acid was used as standard. Time reaction was 8 min, and at this moment, the reaction was maintained at rest. Later, 400 µL of sodium carbonate (7.5%) was added to neutralize the mixture. Then, triplicate samples were kept at room temperature, in the dark for 120 min. Meanwhile, they were transferred to 96 well plates for later reading on a UV-visible spectrophotometer (UV-2550, Shimadzu) at 765 nm.

Linear regression was used to calculate the total phenolic content of samples, it was made through gallic acid calibration curve (25, 50, 75, 100, 150 and 200 µg/mL), and results were expressed as mg GAE/g of the sample.

2.7. Rosmarinic Acid Quantification

RA quantification was made through the construction of a calibration curve using the standard concentrations of 5.6, 11.25, 22.5, 45 and 90 µg/mL for extracts of both species. Samples of each month were prepared in triplicate, at a concentration of 1 mg/mL and were injected in HPLC according adequate analytical method described.

2.8. Flavonoids Total Content Determination

Flavonoids content was evaluated by the spectrophotometric method proposed by Schmidt and Ortega, [43] with adaptations, using aluminum chloride (AlCl₃) as a reagent. Thus, 0.1 mL of AlCl₃ (2.5%) was added to 0.1 mL of samples (1 mg/mL) in 96 well plates. The mixture was kept away from light for 30 min, and later, absorbance was measured at 410 nm, using a spectrophotometer UV-Visivel (UV-2550, Shimadzu) [44]. The assay was made in triplicate and flavonoids total content was calculated through a linear regression equation obtained from the quercetin calibration curve (5; 25; 50; 100 and 200 µg/mL). Results were expressed as mg of quercetin/g of sample.

2.9. Determination of Antioxidant Activity

DPPH method was applied for this assay [45], using methanol as a solvent. Thus, in 96 well plates, DPPH solution at 0.3 mM (100 µL) was added to 100 µL of different concentrations of extracts of both plants studied (usually 10, 20, 40, 80, and 160 µg/mL were used, but in certain samples, it was also necessary to use 320 µg/mL). This reaction remained at rest and away from light for 30 min and subsequently, the reading was done on a spectrophotometer UV-Visivel (UV-2550, Shimadzu) at 518 nm. This assay was performed on samples of all months in triplicate and, free radical scavenging activity (SA) of each concentration used was calculated by the following Equation (1). After calculating SA, calibration curves were done and results were expressed as CE₅₀.

$$SA (\%) = (A_{\text{negative control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{negative control}} \times 100 \quad (1)$$

Equation (1) Free radical scavenging activity formula.

where,

SA (%) = percentage of free radical scavenging activity

A_{negative control} = negative control absorbance

A_{sample} = sample absorbance

2.10. In Vitro Determination of Sun Protection Factor (SPF)

SPF was determined according to an in vitro method [46], known for being practical and presenting a good correlation with in vivo methodologies. Thus, formulations were prepared using polawax[®] cream as a cosmetic base and extracted samples from all months harvested of both species, separately, were incorporated at a concentration of 10%. For spectrophotometric analyses, liquid samples of each formulation were prepared at 0.2 mg/mL, using absolute ethanol as solvent. Subsequently, a scan was made between the wavelengths of 200–400 nm using a spectrophotometer UV-Vis, UV-2550 Shimadzu, with a 1 cm optical path length quartz cell, analyses was done in triplicate and absolute ethanol was also used as blank. SPF was calculated by Equation (2), and an assay was made in triplicate.

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \Sigma 320-290 \times \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{ABS}(\lambda) \quad (2)$$

Equation (2) SPF formula.

where,

CF = 10 (correction factor)

EE(λ) = erythemogenic effect

I(λ) = Sun intensity

ABS(λ) = absorbance

2.11. Statistical Analyses

The data were obtained in triplicate, calculating the mean, standard error, and relative standard error. The statistical analysis was performed by comparison established through the analysis of variance (ANOVA one way), where the results were considered statistically different when $p < 0.05$, the level of significance adopted was 95% and also the post-test Tukey, using Graphpad Prism 6.01 software, San Diego, CA, USA. The calibration curves and correlation coefficients (r) were obtained and calculated by linear regression using Excel[®] 2010. Principal component analysis (PCA) was used to obtain the correlation between the different data sets and a more distinct view of the relationship between the variables, as well as the variability of antioxidant activity and SPF. This analysis was performed with the Orange statistics 3.4 program.

3. Results

3.1. Seasonality Effects on Polyphenols, Flavonoids, and RA Content

In a seasonal analysis of polyphenol content between *M. villosa* and *P. amboinicus*, statistical difference ($p < 0.05$) was found between the two species in every month of the year, except in August, November, and December, as shown in Figure 1. The best month for *M. villosa* harvest producing the highest total polyphenols content was September (147 mg GAE/g of crude extract). In *P. amboinicus* case, it was observed that the best month for its harvest was July (164.7 mg GAE/g of crude extract).

When the two species were evaluated individually, it was possible to observe that there was no statistical difference in total polyphenols content in several months of different seasons of the year in both *M. villosa* and *P. amboinicus*, showing that their production does not obey a specific trend for each season, e.g., January, which belongs to summer season did not show statistical difference ($p > 0.05$) when compared to April (autumn), August (winter), or October (spring). Thus, these results added to the fact that there are no well-defined seasons at the region where plants were collected, justified by their geographical location close to the equator line, seasons seem to have less influence in the variation of these metabolites concentration. Similar results were observed in a study by Woźniak et al. [47], where the concentrations of most polyphenols remained constant during different seasons, showing that they did not influence the variation of these metabolites.

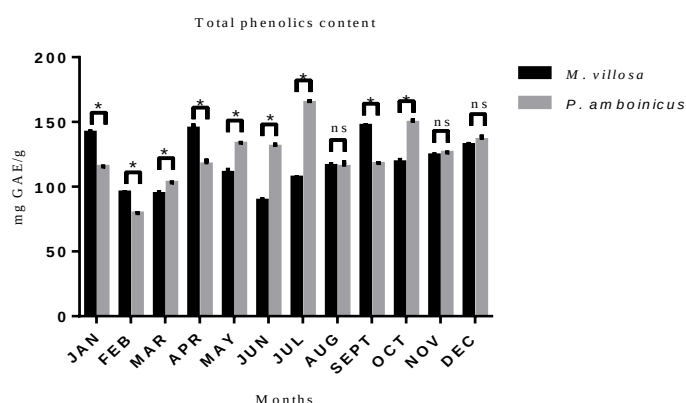


Figure 1. Polyphenols content of *M. villosa* and *P. amboinicus* throughout 12 months and their statistical differences. ns = nonsignificant. * statistical difference.

In the evaluation of flavonoids content, statistical difference ($p < 0.05$) was found among every month of the year between *M. villosa* and *P. amboinicus*, as shown in Figure 2. It was also observed that *P. amboinicus* presented the highest values of these metabolites during the whole year, when compared to the other studied species. The best month for *M. villosa* harvest was April (28.72 mg querc/g of crude extract) and for *P. amboinicus*, December (49.82 mg querc/g of crude extract).

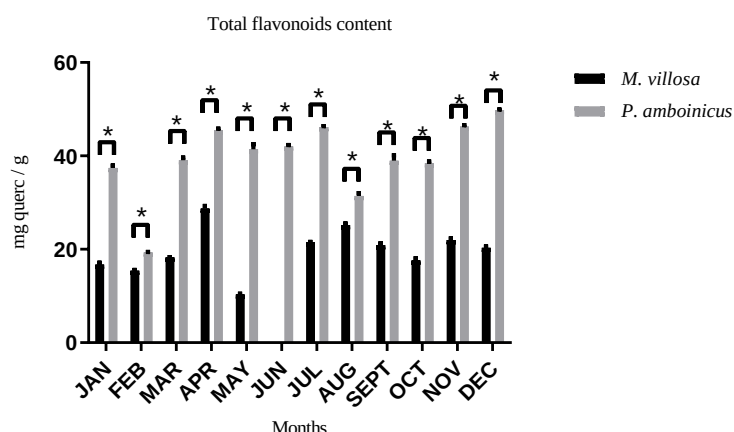


Figure 2. Flavonoids content of *M. villosa* and *P. amboinicus* throughout 12 months and their statistical differences. * statistical difference.

As observed for total polyphenols content, when the two species are evaluated individually, it was seen that there was no statistical difference of flavonoids concentration in several months of different seasons in *M. villosa* and *P. amboinicus*, indicating that their production also did not obey a specific trend to each season, which shows that seasons seem to have less influence in variation of flavonoids quantitatively production.

According to a previous study by Terto et al. [40] and unpublished data [41], it was seen that RA was the most produced compound in CEE of aerial parts of *M. villosa* and *P. amboinicus*, and so because of this, its variation was also evaluated. Thus, it was observed that *P. amboinicus* had the highest concentrations of this metabolite in a good part of the year and the only month that there was no statistical difference in RA content between the two species was August, when they showed statistically equal production, as shown in Figure 3. The best month for *M. villosa* harvest was September (39.28 mg/g) and to *P. amboinicus*, it was observed that in six months of the year, RA concentrations remained practically constant, and it did not show statistical difference among them. These months were January, May, June, July, October, November, and December. Absolute values ranged from 39.46 to 44.24 mg/g, tables containing values of polyphenols, flavonoids and RA content of all months can be found in Supplementary Material.

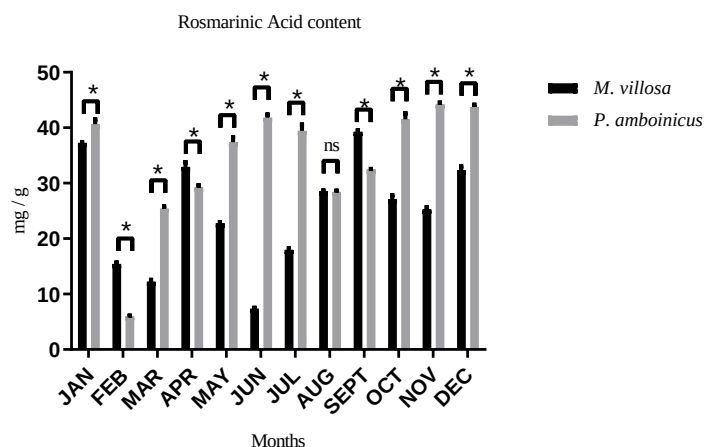


Figure 3. RA content of *M. villosa* and *P. amboinicus* extracts throughout 12 months and their statistical differences. ns = nonsignificant. * statistical difference.

As observed to polyphenols and flavonoids content, when the two plants are evaluated individually, no statistical difference was found in RA concentrations in several months of different seasons of the year, indicating that seasons seem to have less influence on RA content variation in both species, although *P. amboinicus* has shown to be more stable in this metabolite production.

Thus, according to obtained results, it is possible to observe that other factors may have a better influence on the production of polyphenols, flavonoids and RA than only seasons of the year, and it was possible to conclude that the best month to harvest *M. villosa* is September and July for *P. amboinicus*.

3.2. Seasonality Effects on Antioxidant Activity

Samples antioxidant activities were evaluated by DPPH test, and results were expressed as EC₅₀. From Figure 4, a statistical difference is seen among all months, except for November, when samples of both plants showed statistically similar EC₅₀. The month in which *M. villosa* extract showed better action against DPPH radicals is December (75.09 µg/mL) and for *P. amboinicus* is October (85.04 µg/mL), other results can be found in Supplementary Material.

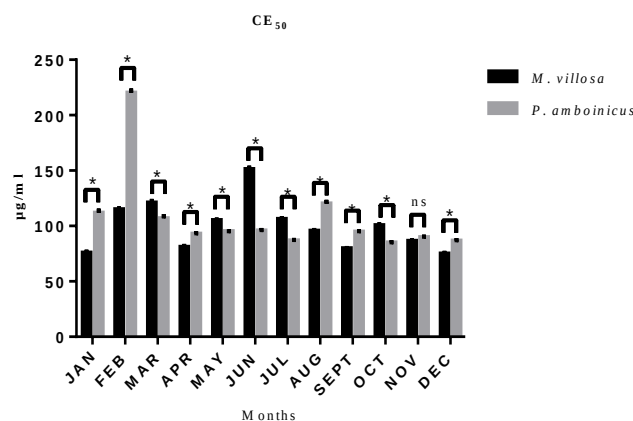


Figure 4. CEE of *M. villosa* and *P. amboinicus* EC₅₀ in µg/mL and their statistical comparisons throughout 12 months. ns = nonsignificant. * statistical difference.

3.3. Seasonality Effects on SPF

From Figure 5, it was possible to evaluate monthly variations occurred on SPF. It was observed that January, February and December did not presented statistical difference between the two species, while in the rest of the year, this difference is significant. The best month for *M. villosa* harvest aiming the highest value of SPF was September (SPF = 13.73).

Regarding *P. amboinicus*, it was observed that April, May, June and July showed the best values of SPF, what may indicate that autumn favors photoprotective activity of this plant, and SPF reaches its maximum of 14.79, other results can also be found in Supplementary Material.

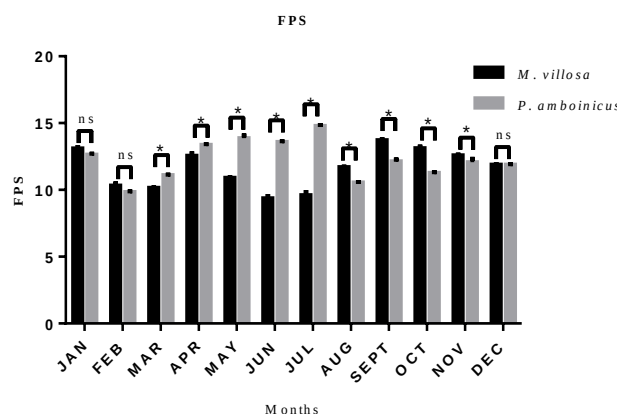


Figure 5. SPF of CEE of *M. villosa* and *P. amboinicus* and their statistical comparisons throughout 12 months. ns = nonsignificant. * statistical difference.

When is considered that in this test were only used plant extracts of the two studied species incorporated at 10% in Polawax[®] cream, it is possible to suggest that these results are promising in the photoprotection area, since reaching SPF levels close to 15 without the addition of any synthetic sunscreen is not easy, as shows the study made by Oliveira et al. [48], that evaluated the SPF of *Schinus terebinthifolius* Raddi ethanolic extracts and none formulation composed only but extracts had SPF above 5.08. In another study made by Mota et al. [49], it was evaluated SPF of *Psidium guajava* ethanolic extract and they found SPF = 1. Similarly, Mota et al. [50] evaluated SPF of *Nephelium lappaceum* L. ethanolic extract (peels) and its SPF = 0.4.

Thus, the two studied plants show significant values of SPF throughout the year, which are higher than what is required by the Brazilian Regulatory Agency (ANVISA) in its Resolution of the Collegiate Board of Directors of June, the 30th (2012) [51], that determines that only photoprotective formulations with SPF ≥ 6 are valid.

3.4. Principal Components Analysis (PCA)

To assess the relationship among all existing variables, multivariate analysis of main components was used, which made it possible to observe several correlations between the concentration of RA, phenolic and total flavonoid content, SPF and EC₅₀, as well as the relationship of these variables with the rainfall index and solar radiation during the year.

As shown in Figure 6, the correlation between PC4 $\times$ PC1 of the PCA explained 80% of the existing groups. For a better understanding of the results, SPF values were categorized through colors to differentiate the value of this parameter in each species. In this figure, it is possible to observe that samples that showed the highest SPF values were grouped more to the left in green, for both *M. villosa* and *P. amboinicus*, in addition, it is possible to observe that something beyond the SPF influence in these groups and it is the phenolic content.

According to the linear projection in four axes represented in Figure 7, it is possible to observe blue and red circles, that represents *M. villosa* (MV) and *P. amboinicus* (PA), respectively. Larger and smaller circles represent higher or lower SPF values. Thus, it is seen that the greater the amount of phenolics and flavonoids, the greater the diameter of the blue circles and, consequently, the greater the SPF of *M. villosa* extracts. It is also observed that RA presence favors a lower EC₅₀, indicating better antioxidant activity, when it occurs.

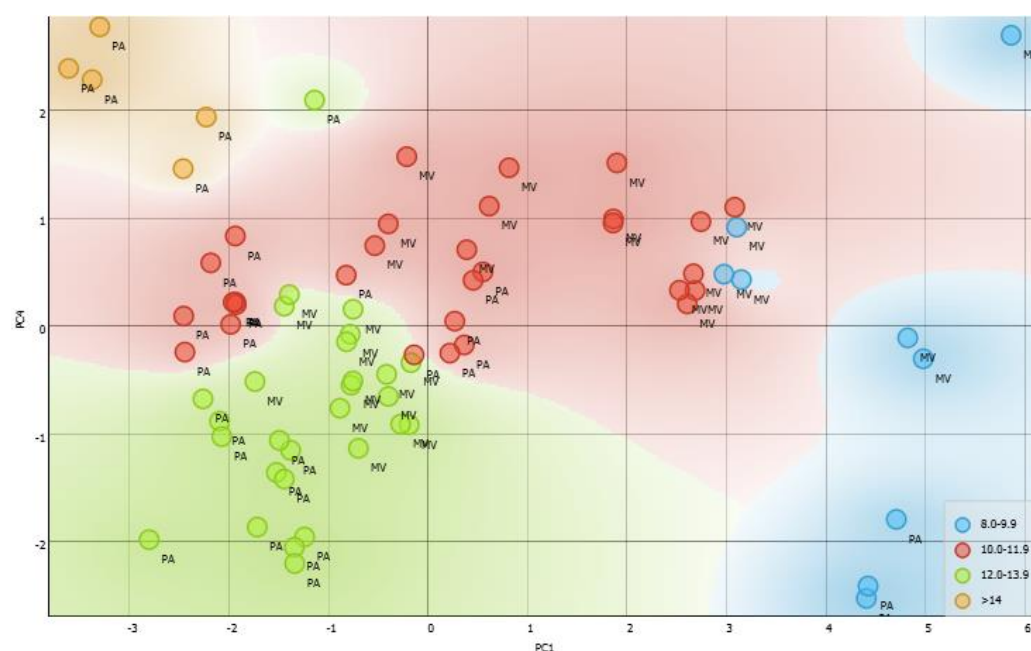


Figure 6. Principal components analysis showing correlation of groups of PC4 versus PC1 using obtained data from the analysis of phenolic and total flavonoid content, RA content, EC₅₀, SPF, the incidence of solar radiation, and level of precipitation.

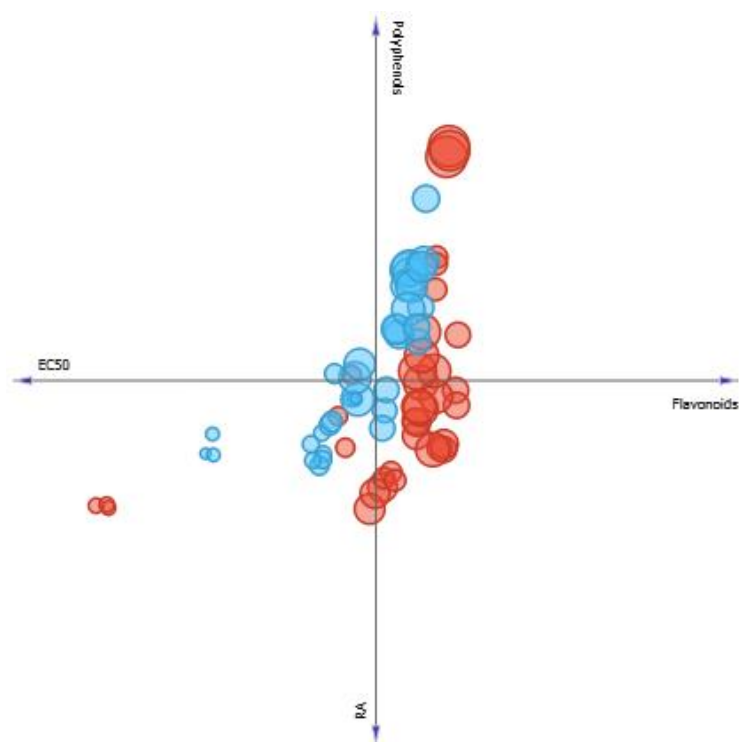


Figure 7. Four axes linear projection correlating the content of phenolics, flavonoids, rosmarinic acid, EC₅₀ of *M. villosa* (blue circles) and *P. amboinicus* (red circles). Circles size correspond to a greater or lesser SPF value found.

When it comes to *P. amboinicus*, in general, it is seen that flavonoids and RA presence keep SPF values similar and low polyphenols concentrations do not favor this factor as much, however, when they reach the maximum concentration found in the species, the highest SPF (14.79) value observed in the present study was found.

Another parameter observed was the influence of the solar radiation on the concentration of studied secondary metabolites and its consequences to SPF. Thus, evaluating the linear projection presented in Figure 8, it is seen that the solar radiation has great influence on increasing or decreasing SPF in *M. villosa*. In months when both solar radiation and polyphenols production are higher, SPF of *M. villosa* extracts increases. However, in months when production of flavonoids and RA is high, but the level of solar radiation is lower, SPF is also lower, suggesting that production of specific components with photoprotective properties is stimulated by solar radiation.

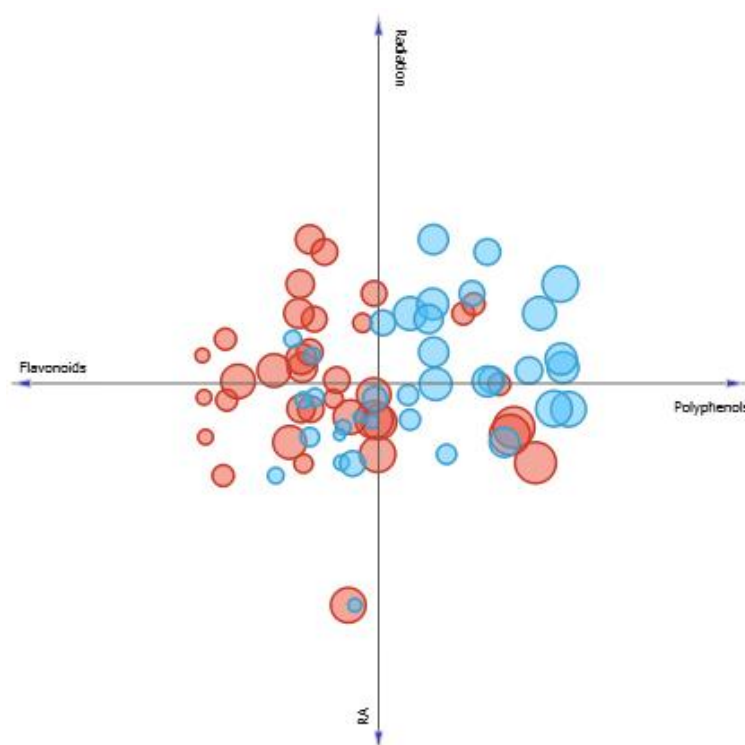


Figure 8. Linear projection correlating the content of phenolics, flavonoids and rosmarinic acid of *M. villosa* (blue circles) and *P. amboinicus* (red circles) to solar radiation. Circles size correspond to a greater or lesser SPF value found.

These results are corroborated by Dolzhenko et al. [52], who evaluated the influence of UVB radiation on polyphenols production in *Mentha x piperita* L. species. In their study, it was seen that polyphenols content increased after irradiation of the plant with UVB radiation, and it stimulated the production of flavonoids with light-absorbing properties at the wavelength corresponding to UVB radiation, such as eriocitrin, hesperidin, and kaempferol 7-O-rutinoside, and it also caused production decrease of narirutin, 4'-methoxykaempferol 7-O-rutinoside, suggesting a possible transformation of these latest flavonoids cited in those with increased production. The same study also showed that there is a decrease in essential oils production in *M. piperita* and an increase on polyphenols production and suggests a correlation between these results, showing that UVB radiation may favor one biosynthetic path over another.

In *P. amboinicus* samples, different observations were made. Through Figure 8, it is seen that the solar radiation does not seem to have an influence as directed as in *M. villosa*, because although SPF was high in samples when solar radiation was higher compared to others, the same observation was made when RA and flavonoids concentrations are higher, and the sample with the highest SPF is found when polyphenols content is higher, but radiation level is lower.

In a study by Takshak et al. [53], it was seen that supplementation of UVB radiation in *Coleus forskohlii* (or *P. barbatus*) favored phenylpropanoid paths generating production

of flavonoids, for example. On the other hand, it was seen on the same study, that UVB radiation also induced an increase of carotenoids production in the leaves of this species, such as lycopene and β -carotene for its protection. So, although it is necessary more studies to confirm UV radiation role in secondary metabolites production in *P. amboinicus*, it is possible to suggest that another biosynthetic path may be favored to increase its SPF.

On the other hand, it is seen in Figure 9, that radiation is an important factor in *P. amboinicus* antioxidant activity since it is showed that when solar radiation levels are higher, EC_{50} (represented by sample circles size) decreases, which means a better antioxidant activity. This result is corroborated with both Takshak et al. [53] and Takshak et al. [54] that showed an increase of antioxidant activity of *Coleus forskohlii* extracts when it was supplemented by UVB radiation. A similar result was observed to *M. villosa* through Figure 9.

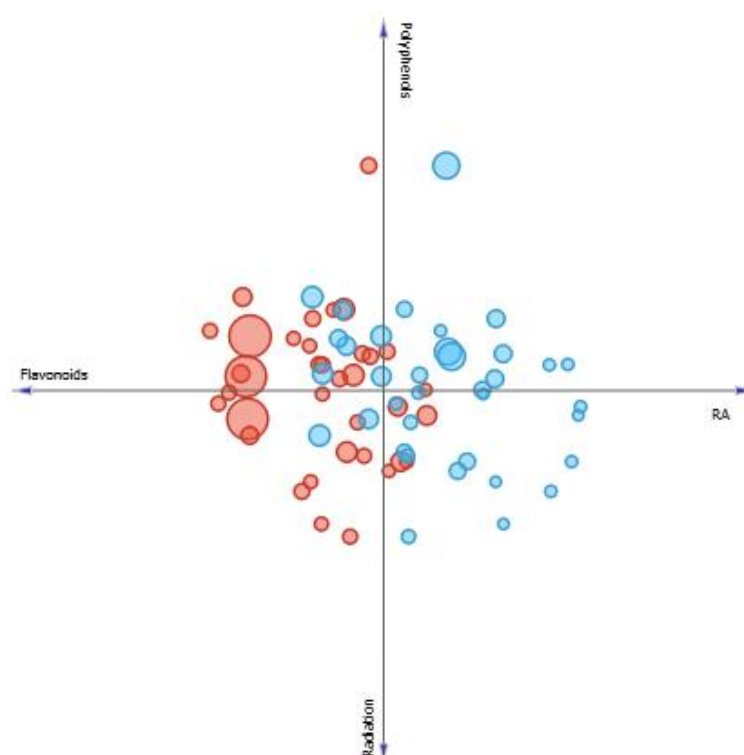


Figure 9. Linear projection correlating the content of phenolics, flavonoids, and rosmarinic acid of *M. villosa* (blue circles) and *P. amboinicus* (red circles) to solar radiation. Circles size corresponds to a greater or lesser EC_{50} value found.

In addition, it is also important to highlight that as seen in a review made by Gobboneto and Lopes [8], certain polyphenols may have their production increased, as in the case of *Marchantia polymorpha* in which the proportion of luteolin glycosides/apigenin glycosides increases by the influence of exposure to UVB radiation. In this situation, although the absorption capacity of UVB rays does not increase, because luteolin derivatives are more efficient in disperse observed energy, it causes an increase of defense antioxidant levels in the plant. The same observation was made in the flavonoids/hydroxycinnamates ratio, with an increase in this proportion being seen by induction of UVB radiation. So, it is seen that the ability to act as an antioxidant and not only as an absorber of UVB radiation, it is important to define which metabolites will be produced to act against UVB rays. Thus, more studies need to be done to better understand the metabolic changes mainly in *P. amboinicus*.

In the case of precipitation levels, it was observed in Figure 10, that in general, it does not favor both SPF and antioxidant activity increase (Figure 11) of extracts of both plants studied, since the lower precipitation levels, the higher SPF and lower EC_{50} , indicating a better antioxidant activity.

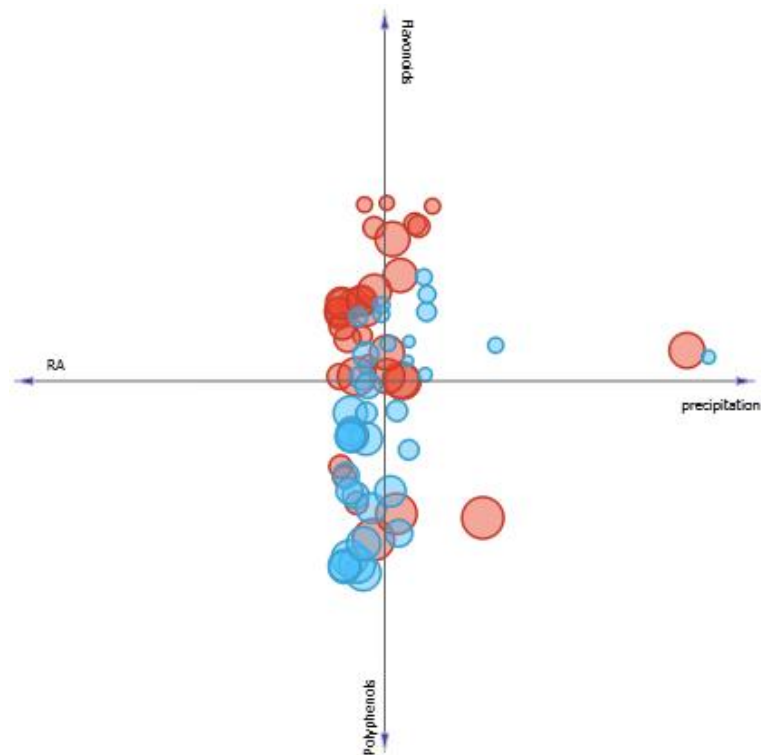


Figure 10. Linear projection correlating the content of phenolics, flavonoids, and rosmarinic acid of *M. villosa* (blue circles) and *P. amboinicus* (red circles) to precipitation. Circles size correspond to a greater or lesser SPF value found.

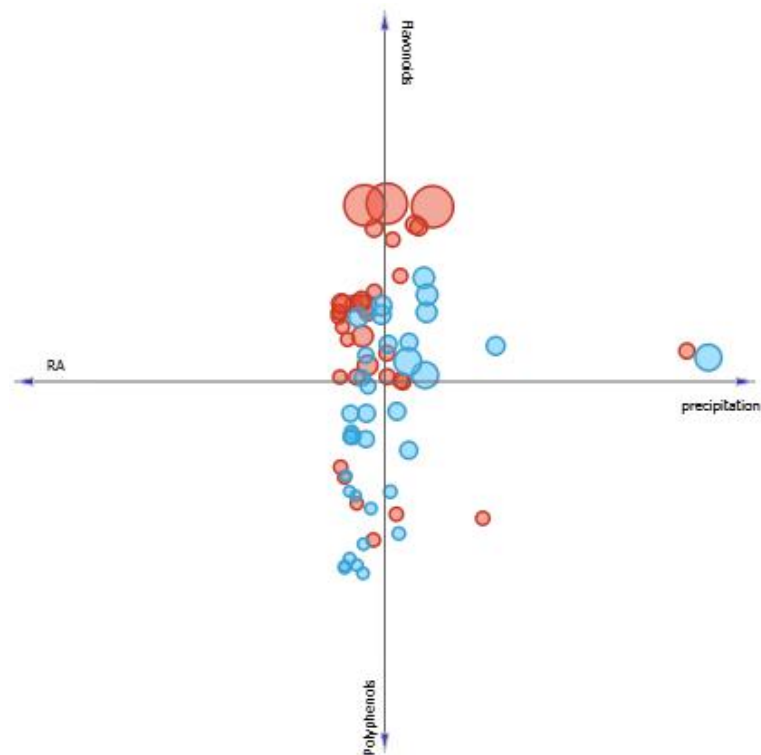


Figure 11. Linear projection correlating the content of phenolics, flavonoids, and rosmarinic acid of *M. villosa* (blue circles) and *P. amboinicus* (red circles) to precipitation. Circles size corresponds to a greater or lesser EC₅₀ value found.

According to Gobbo-neto and Lopes [8], there are controversies about what can occur in polyphenol production depending on environmental levels of precipitation, showing that its production can be increased or decreased, with no trend or pattern to be followed, suggesting that there is no clear correlation between these metabolites concentrations and hydric stress, but short periods of dryness can lead to an increase of phenolic compounds production. Studies such as Gomes et al. [55] showed a predominance of flavonoids during summer in *Lippia alba* leaves. A similar result was found by Ribeiro et al. [1], where it was found that the highest concentration of total phenolic compounds in the inner bark of *Secondatia floribunda* A. DC. during the dry season.

Thus, biological activities such as antioxidant activity can be affected since several studies confirm a direct correlation between this activity with phenolic compounds. Because of that, more studies are necessary to establish a better knowledge about what occurs in *M. villosa* and *P. amboinicus* metabolism.

4. Conclusions

In agreement with all obtained results, it was possible to conclude that, in general, seasonality did not directly affect polyphenols, flavonoids, and RA quantitative production in both species. The best month to harvest *M. villosa* was September and *P. amboinicus* was July. It could also be concluded that higher concentrations of polyphenols and flavonoids favor the increase of SPF in *M. villosa* and concentration of RA influences the antioxidant activity of this species, while in *P. amboinicus*, the presence of flavonoids and RA maintained SPF values similar and when the phenolic compounds reached the maximum concentration in this species, the highest SPF value of the study was found (SPF = 14.79). Moreover, it was observed that solar radiation has a clearer influence in phenolic compound production and in the increase of SPF in *M. villosa* than in *P. amboinicus*, and it favors the improvement of antioxidant activities of both species. In the case of precipitation, it does not seem to favor either photoprotective or antioxidant activities of both species studied.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/1/110/s1>, Figure S1: Calibration curve of Quercetin, Figure S2: Calibration curve of Gallic acid standard, Figure S3: Rosmarinic acid standard linear regression for its quantification in *M. x villosa* and *P. amboinicus*, Figure S4: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 18.24; 17.65; 17.69 min) for its quantification in January, *Mentha x villosa*, Figure S5: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in February, *Mentha x villosa*, Figure S6: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in March, *Mentha x villosa*, Figure S7: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 17.65; 17.53; 17.52 min) for its quantification in April, *Mentha x villosa*, Figure S8: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in May, *Mentha x villosa*, Figure S9: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.53 min) for its quantification in June, *Mentha x villosa*, Figure S10: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in July, *Mentha x villosa*, Figure S11: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in August, *Mentha x villosa*, Figure S12: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in September, *Mentha x villosa*, Figure S13: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.63 min) for its quantification in October, *Mentha x villosa*, Figure S14: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.72 min) for its quantification in November, *Mentha x villosa*, Figure S15: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 17.72; 17.71; 17.92 min) for its quantification in December, *Mentha x villosa*, Figure S16: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 10.07; 9.54; 10.07 min) for its quantification in January, *Pectranthus amboinicus*, Figure S17: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 10.14 min) for its quantification in February, *Pectranthus amboinicus*, Figure S18: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.55 min) for its quantification in March,

Pectranthus amboinicus, Figure S19: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.56 min) for its quantification in April, Pectranthus amboinicus, Figure S20: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.57 min) for its quantification in June, Pectranthus amboinicus, Figure S21: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 9.60; 9.62; 10.15 min) for its quantification in July, Pectranthus amboinicus, Figure S22: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 10.14 min) for its quantification in August, Pectranthus amboinicus, Figure S23: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 9.64; 10.19; 10.19 min) for its quantification in October, Pectranthus amboinicus, Figure S24: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 10.05; 9.64; 9.61 min) for its quantification in November, Pectranthus amboinicus, Figure S25: Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 9.65 min) for its quantification in December, Pectranthus amboinicus, Table S1: Results of month-to-month quantification of rosmarinic acid in mg/g, *Mentha x villosa*, Table S2: Results of month-to-month quantification of rosmarinic acid in mg/g, *Plectranthus amboinicus*, Table S3: SPF results month by month, *Mentha x villosa*, Table S4: SPF results month by month, *Plectranthus amboinicus*, Table S5: Results of total phenolic content month by month mg GAE/g, *Mentha x villosa*, Table S6: Results of the total phenolic content month by month mg GAE/g, *Plectranthus amboinicus*, Table S7: Results of total flavonoid content month by month mg querc/g, *Mentha x villosa*, Table S8: Results of total flavonoid content month by month mg querc/g, *Plectranthus amboinicus*, Table S9: Radiation data used (kJ/m²), Table S10. Precipitation levels used (mm³).

Author Contributions: J.d.M.G. and M.V.C.T. were responsible for collecting plant material, producing plant extracts, photoprotection assay, rosmarinic acid quantification by HPLC, determining phenolic and flavonoid total content, and interpretation of results. S.G.d.S. contributed to the interpretation of data, software usage, and graphics production. J.F.T. and M.S.d.S. were responsible for coordinating the project, funding acquisition, interpretation of results, and antioxidant assay. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Institutes of Science and Technology Program (INCT-Rennofito, n° 465536/2014-0), CNPq (n° 141383/2018-6 and n° 141208/2016-3) and CAPES code 001.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Material.

Acknowledgments: Authors would like to acknowledge Genuspharma[®] pharmacy for providing materials for this work and their facilities, so cosmetic formulations could be produced. We also thank Tainá Souza Silva and Jarllys Nóbrega de Souza for helping us with a few analyses made.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ribeiro, D.A.; Camilo, C.J.; Nonato, C.F.A.; Rodrigues, F.F.G.; Menezes, I.R.A.; Ribeiro-filho, J.; Xiao, J.; Souza, M.M.A.; Costa, J.G.M. Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro anti-oxidant activity of *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae). *Food Chem.* **2020**, *315*, 126277. [CrossRef] [PubMed]
2. Karimi, A.; Krämer, A.; Herwig, N.; Hadian, J.; Schulz, H.; Meiners, T. Metabolomics Approaches for Analyzing Effects of Geographic and Environmental Factors on the Variation of Root Essential Oils of *Ferula assa-foetida* L. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 9940–9952. [CrossRef] [PubMed]
3. Beer, D.; Miller, N.; Joubert, E. Production of dihydrochalcone-rich green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract taking into account seasonal and batch-to-batch variation in phenolic composition of plant material. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *110*, 138–143. [CrossRef]
4. Lemos, M.F.; Lemos, M.F.; Pacheco, H.P.; Guimarães, A.C.; Fronza, M.; Endringer, D.C.; Scherer, R. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *95*, 543–548. [CrossRef]
5. Nenadis, N.; Llorens, L.; Koufogianni, A.; Díaz, L.; Font, J.; Gonzalez, J.A.; Verdager, D. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *153*, 435–444. [CrossRef]
6. Bundy, J.G.; Davey, M.P.; Viant, M.R. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics* **2009**, *5*, 3–21. [CrossRef]

7. Ferraz, E.D.O.; Vieira, M.A.R.; Ferreira, M.I.; Junior, A.F.; Marques, M.O.M.; Minatel, I.O.; Albano, M.; Sambo, P.; Lima, G.P.P. Seasonality effects on chemical composition, antibacterial activity and essential oil yield of three species of *Nectandra*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204132. [\[CrossRef\]](#)
8. Gobbo-neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova* **2007**, *30*, 374–381. [\[CrossRef\]](#)
9. Matos, F.J.A. *Farmácias Vivas*; Edições UFC: Fortaleza, Brazil, 2001.
10. Matos-Rocha, T.; Cavalcanti, M.D.S.; Barbosa-Filho, J.; Lúcio, A.; Veras, D.; Feitosa, A.; Júnior, J.D.S.; De Almeida, R.; Marques, M.O.M.; Alves, L.; et al. In Vitro Evaluation of Schistosomicidal Activity of Essential Oil of *Mentha x villosa* and Some of Its Chemical Constituents in Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 1307–1312. [\[CrossRef\]](#)
11. Guedes, D.N.; Silva, D.; Barbosa-Filho, J.; Medeiros, I.A. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 490–497. [\[CrossRef\]](#)
12. Sousa, P.J.C.; Linard, C.F.B.M.; Azevedo-Batista, D.; Oliveira, A.C.; Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2009**, *42*, 655–659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Amaral, R.G.; Fonseca, C.S.; Silva, T.K.M.; Andrade, L.N.; França, M.E.; Barbosa-Filho, J.M.; Sousa, D.P.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.Ó.; Carvalho, A.A.; et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumor effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 1100–1106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Shen, D.; Pan, M.-H.; Wu, Q.; Park, C.-H.; Juliani, H.R.; Ho, C.-T.; Simon, J.E. A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from *Mentha* spp. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C900–C908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Brahmi, F.; Khodir, M.; Mohamed, C.; Pierre, D. Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. In *Aromatic and Medicinal Plants—Back to Nature*; El-Shemy, H.A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 47–80.
16. Hanafy, D.M.; Prenzler, P.D.; Burrows, G.E.; Ryan, D.; Nielsen, S.; Sawi, S.A.E.; Alfay, T.S.E.; Ab-delrahman, E.H.; Obied, H.K. Biophenols of mints: Antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment. *J. Funct. Foods* **2017**, *33*, 345–362. [\[CrossRef\]](#)
17. Hsu, K.-P.; Ho, C.-L. Antimildew Effects of *Plectranthus amboinicus* Leaf Essential Oil on Paper. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*. [\[CrossRef\]](#)
18. Manjamalai, A.; Alexander, T.; Berlin Grace, V.M. Bioactive evaluation of the essential oil of *plectranthus amboinicus* by gc-ms analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*, 205–211.
19. Shubha, J.; Bhatt, P. *Plectranthus amboinicus* leaves stimulate growth of probiotic *L. plantarum*: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *166*, 220–227. [\[CrossRef\]](#)
20. Gurgel, A.P.A.D.; Da Silva, J.G.; Grangeiro, A.R.S.; Oliveira, D.C.; Lima, C.M.; Da Silva, A.C.; Oliveira, R.A.; Souza, I.A. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125*, 361–363. [\[CrossRef\]](#)
21. Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S.; Silva-Filho, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 77–82. [\[CrossRef\]](#)
22. Yulianto, W.; Andarwulan, N.; Giriwono, P.E.; Pamungkas, J. Bioactive compounds from torbangun (*plectranthus amboinicus* (lour.) spreng) chlo-roform fraction induce apoptosis in breast cancer (mcf-7 cells) in vitro. *Tradit. Med. J.* **2017**, *22*, 37–44. [\[CrossRef\]](#)
23. Gurgel, A.P.A.D.; da Silva, J.G.; Grangeiro, A.R.S.; Xavier, H.S. Antibacterial Effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, *28*, 460–464.
24. Olszewska, M.A.; Gędas, A.; Simões, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Res. Int.* **2020**, *134*, 109214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Kumar, P.; Singh, S.; Kumar, N. *Plectranthus amboinicus*: A review on its pharmacological and, pharmacognostical studies. *Am. J. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2020**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
26. Balakrishnan, A. Therapeutic uses of peppermint—A review. *J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *7*, 474–476.
27. Lima, T.C.; Silva, T.K.M.; Silva, F.L.; Barbosa-Filho, J.M.; Marques, M.O.M.; Santos, R.L.C.; Cavalcanti, S.C.H.; Sousa, D.P. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere* **2014**, *104*, 37–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Fialova, S.; Veizerova, L.; Nosalova, V.; Drabikova, K.; Tekelova, D.; Grancai, D.; Sotnikova, R. Water Extract of *Mentha x villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 937–940. [\[CrossRef\]](#)
29. Arumugam, G.; Swamy, M.K.; Sinniah, U.R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules* **2016**, *21*, 369. [\[CrossRef\]](#)
30. Dalmagro, A.P.; Camargo, A.; Filho, H.H.D.S.; Valcanaia, M.M.; De Jesus, P.C.; Zeni, A.L.B. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *123*, 323–330. [\[CrossRef\]](#)
31. Henriques, A.C.R. Estudo dos Efeitos Antioxidante e Anti-Inflamatório do Chocolate Preto e da Pasta de Cacao; Master's Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2017.
32. Ko, H.C.; Lee, J.Y.; Jang, M.G.; Song, H.; Kim, S.-J. Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *122*, 506–512. [\[CrossRef\]](#)

33. Sousa, C.M.D.M.; E Silva, H.R.; Vieira, G.M., Jr.; Ayres, M.C.C.; Da Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.D.M.; Brandão, M.S.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351–355. [\[CrossRef\]](#)
34. León-chan, R.G.; López-meyer, M.; Osuna-enciso, T.; Sañudo-barajas, A.; Heredia, J.B.; León-félix, J. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environ. Exp. Bot.* **2017**, *139*, 143–151. [\[CrossRef\]](#)
35. Takshak, S.; Agrawal, S. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *193*, 51–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Amoah, S.K.S.; Sandjo, L.P.; Kratz, J.M.; Biavatti, M.W. Rosmarinic Acid—pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Med.* **2016**, *82*, 388–406. [\[PubMed\]](#)
37. Psotova, J.; Svobodová, A.R.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *84*, 167–174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Sánchez-campillo, M.; Gabaldon, J.A.; Castillo, J.; Benavette-garcía, O.; Del baño, M.J.; Alcaraz, M.; Vicente, V.; Alvarez, N.; Lozano, J.A. Rosmarinic acid, a photoprotective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 386–392. [\[CrossRef\]](#)
39. Blackman, B.K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 16–26. [\[CrossRef\]](#)
40. Terto, M.V.C.; Gomes, J.M.; Araújo, D.I.A.F.; Silva, T.S.; Ferreira, J.M.; Souza, J.J.N.; Da Silva, M.S.; Tavares, J.F. Photoprotective Activity of *Plectranthus amboinicus* Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid. *Rev. Bras. Farm.* **2020**, *30*, 183–188. [\[CrossRef\]](#)
41. GOMES, J.M. Estudo Preliminar da Potencial Atividade Fotoprotetora e Antioxidante de *Mentha x villosa*, Master's Thesis, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, 2018, unpublished.
42. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols content and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* **1999**, *299*, 152–177.
43. Schmidt, P.C.; Ortega, G.G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamt flavonoid gehaltes von Passiflorae herba. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1999**, *133*, 17–26.
44. Marques, G.S.; Monteiro, R.P.M.; Leão, W.F.; Lyra, M.A.M.; Peixoto, M.S.; Rolim-neto, P.J.; Xavier, H.S.; Soares, L.A.L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 517–522. [\[CrossRef\]](#)
45. Garcez, F.R.; Garcez, W.S.; Hamerski, L.; Miguita, C.H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapota* (Myrtaceae). *Quim. Nova* **2009**, *32*, 407–411. [\[CrossRef\]](#)
46. Mansur, J.S.; Breder, M.N.R.; Mansur, M.C.A.; Azulay, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* **1986**, *61*, 121–124.
47. Woźniak, M.; Mrówczyńska, L.; Waśkiewicz, A.; Rogoziński, T.; Ratajczak, I. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. *Rev. Bras. Farm.* **2019**, *29*, 301–308. [\[CrossRef\]](#)
48. Oliveira, M.B.; Valentim, I.B.; Rocha, T.S.; Santos, J.C.; Pires, K.S.; Tanabe, E.L.; Borbely, K.S.; Borbely, A.U.; Goulart, M.O.F. *Schinus terebinthifolius* Raddi extracts: from sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *152*, 112503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Mota, M.D.; Morte, A.N.D.B.; Silva, L.C.R.C.E.; Chinalia, F.A. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) ethanolic extract. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *205*, 111837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Mota, M.D.; Costa, R.Y.S.; Guedes, A.A.S.; Silva, L.C.R.C.E.; Chinalia, F.A. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *201*, 111639. [\[CrossRef\]](#)
51. Anvisa. RDC nº 30, de 01 de Junho de 2012; Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da União, DF: Brasília, Brazil.
52. Dolzhenko, Y.; Berteau, C.M.; Occhipinti, A.; Bossi, S.; Maffei, M.E. UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha piperita* L.). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *100*, 67–75. [\[CrossRef\]](#)
53. Takshak, S.; Agrawal, S.B. Interactive effects of supplemental ultraviolet-B radiation and indole-3-acetic acid on *Coleus forskohlii* Briq.: Alterations in morphological-, physiological-, and biochemical characteristics and essential oil content. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 313–326. [\[CrossRef\]](#)
54. Takshak, S.; Agrawal, S. The role of supplemental ultraviolet-B radiation in altering the metabolite profile, essential oil content and composition, and free radical scavenging activities of *Coleus forskohlii*, an indigenous medicinal plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *23*, 7324–7337. [\[CrossRef\]](#)
55. Gomes, A.F.; Almeida, M.P.; Leite, M.F.; Schwaiger, S.; Stuppner, H.; Halabalaki, M.; Amaral, J.G.; David, J.M. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. *Food Chem.* **2019**, *273*, 186–193. [\[CrossRef\]](#)