



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

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



JULIANA DE MEDEIROS GOMES

Atividade fotoprotetora e antioxidante do extrato otimizado de *Mentha x villosa* e estudo sazonal de suas atividades e metabólitos secundários

JOÃO PESSOA – PB

2022

JULIANA DE MEDEIROS GOMES

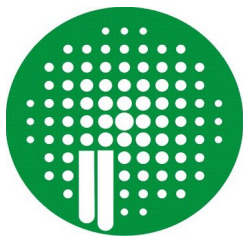
Avaliação da atividade fotoprotetora, antioxidante e variação sazonal do extrato padronizado de *Mentha x villosa*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de doutora em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA – PB

2022



PgPNsb

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 348ª (trecentésima quadragésima oitava) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Juliana de Medeiros Gomes**, candidata ao Título de “Doutora” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às oito horas (08h00) do dia onze de outubro do ano dois mil e vinte e dois (11/10/2022), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/hmj-rskf-sqf>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Juliana de Medeiros Gomes**, candidata ao Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Edemilson Cardoso da Conceição, Ph.D em Ciências Farmacêuticas, Márcio Ferrari, Ph.D em Ciências Farmacêuticas, Luciana Scotti, Ph.D em Cosmetologia e Modelagem Molecular, José Maria Barbosa Filho, Ph.D em Química de Produtos Naturais e Josean Fachine Tavares, Ph.D em Farmacoquímica. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Goiás; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; e os demais, integrantes do corpo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Josean Fachine Tavares, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Juliana de Medeiros Gomes**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Avaliação da atividade fotoprotetora, antioxidante e variação sazonal do extrato padronizado de *Mentha x villosa*”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se a examinada **Juliana de Medeiros Gomes**, legalmente habilitada a receber o Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.



Documento assinado digitalmente
JOSEAN FACHINE TAVARES
Data: 11/10/2022 15:27:51-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (Orientador)

Documento assinado digitalmente



EDEMILSON CARDOSO DA CONCEICAO
Data: 11/10/2022 15:13:35-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição (Examinador)

Documento assinado digitalmente



MARCIO FERRARI
Data: 11/10/2022 18:47:10-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Márcio Ferrari (Examinador)

Prof.^a Dr.^a Luciana Scotti (Examinadora)

Documento assinado digitalmente



LUCIANA SCOTTI
Data: 11/10/2022 18:55:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Examinador)

Documento assinado digitalmente



JOSE MARIA BARBOSA FILHO
Data: 11/10/2022 22:29:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Juliana de Medeiros Gomes (Discente)

Documento assinado digitalmente



JULIANA DE MEDEIROS GOMES
Data: 11/10/2022 15:03:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G633a Gomes, Juliana de Medeiros.

Atividade fotoprotetora e antioxidante do extrato
otimizado de *Mentha x villosa* e estudo sazonal de suas
atividades e metabólitos secundários / Juliana de
Medeiros Gomes. - João Pessoa, 2022.
169 f. : il.

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

1. Lamiaceae - Fotoproteção. 2. Sazonalidade. 3.
FPS. 4. PFUVA. 5. Antioxidante. 6. Radiação
ultravioleta. I. Tavares, Josean Fechine. II. Título.

UFPB/BC

CDU 582.929.4(043)

Agradecimentos

À **banca examinadora** por aceitar o convite e fazer parte da minha defesa, bem como por todo o conhecimento passado e todas as contribuições realizadas nessa data.

Ao Professor Dr. **Josean F. Tavares** pela orientação neste trabalho e contribuição na minha vida acadêmica, bem como pelo apoio e confiança depositados em mim para a realização dessa pesquisa tão desafiadora para todos nós.

Ao Professor Dr. **Marcelo Sobral** por todo apoio, incentivo, conhecimento e suporte estrutural e financeiro para a realização dessa pesquisa.

Ao doutor **Márcio Cahino** por toda a parceria durante todos esses anos de pós graduação, pela sua dedicação, incentivo e conhecimento em torno dessa pesquisa, bem como pelo apoio em todos os momentos, tanto no trabalho quanto na vida, que foram essenciais para que esse trabalho fosse feito, muito obrigada por fazer parte de tudo isso.

A **todos os alunos do LMCA**, pois todos contribuíram em alguma etapa da realização deste trabalho, reforçando a máxima de que não se faz pesquisa sozinha.

Em especial aos doutorandos **Joanda Paolla, Thalisson Amorim e Pedro Thiago** por toda a ajuda, suporte emocional e amizade compartilhada durante a pós graduação e a vida. Esse suporte foi essencial para a conclusão deste trabalho.

A **Anderson, Kaio, Roseana, Sabrina, Laiane e Lucas Abreu**, ex alunos do grupo e hoje doutores, por toda a ajuda, conhecimento compartilhado e parceria durante os anos de pós e dia a dia no laboratório.

À **Tainá Souza Silva** que teve fundamental importância na minha formação como pesquisadora, bem como pelas parcerias da graduação ao doutorado.

À **Evandro Ferreira** pelo apoio e suporte durante todos os anos no laboratório, bem como por sua amizade e carinho.

Ao técnico **Marcelo Rodrigues** pelo apoio e conhecimento compartilhado, bem como pelas risadas e convivência laboratorial tão divertida e incentivadora.

Ao Dr. **Samuel Cibulski** pelas contribuições realizadas neste trabalho e toda ajuda cedida.

Aos colaboradores e professores **Sócrates Golzio - UFPB, Vera Isaac - UNESP, Luiz Alberto - UFPE** pelas parcerias e resultados obtidos.

À aluna de iniciação científica **Maria Beatriz Nunes** que foi essencial para a conclusão deste trabalho, sem a qual, não poderia ter terminado esta pesquisa.

À professora **Dr^a Marianna Sobral e toda sua equipe de pesquisa** por todo o auxílio e suporte estrutural para a realização de experimentos.

Ao agrônomo, **Fernando Antônio Cavalcanti**, pelo cuidado das plantas medicinais do horto do IpeFarm, nos possibilitando a coleta e execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES e ao Instituto Nacional Ciência e Tecnologia (INCT) por todo o auxílio financeiro fornecido a esta pesquisa.

À UFPB, por todas as oportunidades que me propiciou, pelo apoio estrutural e científico.

E à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização **e conclusão dessa pesquisa.**

Muito obrigada!

Resumo

Protetores solares tópicos podem ser constituídos por filtros químicos e/ou físicos, e compostos antioxidantes, visando uma proteção mais ampla. Entretanto, muitas vezes essa proteção deixa a desejar e, por isso, uma estratégia interessante é a adição de compostos naturais ou extratos vegetais ricos em polifenóis nessas formulações, já que eles podem apresentar atividade antioxidante e fotoprotetora. Dentro desse contexto, a família Lamiaceae torna-se bastante interessante, já que é a principal família vegetal utilizada na indústria cosmética e apresenta membros com quantidades expressivas de compostos fenólicos. Assim, *Mentha x villosa*, espécie de fácil cultivo e que apresenta como principais compostos não voláteis, ácido rosmarínico (AR) e flavonoides, vem sendo estudada na fotoproteção. Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de continuar avaliando a atividade fotoprotetora de *M. x villosa* através do estudo sazonal do fator de proteção solar (FPS), atividade antioxidante, teor de fenólicos, flavonoides e AR, avaliando também se a radiação UV e a precipitação poderiam influenciar na produção desses metabólitos. Posteriormente, foi feita a otimização da extração de polifenóis e AR através da utilização de um planejamento fatorial, variando a porcentagem de etanol e a razão pó/solvente utilizada. Após a otimização, análises de componentes principais (PCA), LC-HRMS e desreplicação (MS^n) do extrato foram executadas a fim de identificar os compostos presentes em *M. x villosa* e entender quais substâncias tiveram sua extração favorecida. Posteriormente, o FPS foi novamente determinado, bem como o fator de proteção UVA (FPUVA) e o comprimento de onda crítico (λ_c). Os testes para determinação do FPS, FPUVA e (λ_c) foram feitos a partir da preparação de 8 formulações diferentes contendo o extrato otimizado. Já a atividade antioxidante, foi avaliada através do teste do DPPH e ABTS. Como resultados, foi visto que o melhor mês para a coleta de *M. x villosa* foi setembro e, que maiores concentrações de polifenóis e flavonoides favorecem o aumento do FPS, bem como a concentração de AR influencia diretamente a atividade antioxidante da espécie. Além disso, observou-se que a radiação solar influencia na produção de fenólicos e aumento do FPS, enquanto que a precipitação parece não influenciar nos parâmetros estudados. Com relação a otimização da extração, foi visto que as melhores condições para a extração conjunta de polifenóis e AR foram etanol 70% e razão pó/solvente de 5%, promovendo a obtenção de 264,58 mg EAG/g e 101,96 mg/g de fenólicos totais e AR, respectivamente. A PCA revelou que 7 componentes principais contribuíram para diferenciar as amostras e, com base na análise de LC-MS, esses compostos foram identificados como polifenóis, juntamente com outros 23 compostos. Em relação a atividade antioxidante, o extrato otimizado apresentou $CE_{50} = 42,44 \mu\text{g/mL}$ no ensaio de inibição dos radicais DPPH e $CE_{50} = 322,87 \mu\text{g/mL}$ no ensaio com radicais ABTS. Na avaliação da atividade fotoprotetora, as formulações 5 e 6 apresentaram os melhores valores de FPS (23,20 e 30,63) e FPUVA (12,25 e 26,53), respectivamente. Dessa forma, corroborando com todos os resultados obtidos, esse trabalho demonstrou o grande potencial fotoprotetor de *M. x villosa*, que foi capaz de apresentar importante proteção de amplo espectro contra os raios UVA e UVB, associada à atividade antioxidante e ainda, diminuindo a concentração de filtro químico utilizado na formulação, sugerindo uma alternativa de um produto mais seguro.

Palavras-chave: Sazonalidade, FPS, PFUVA, fotoproteção, antioxidante, radiação ultravioleta.

Abstract

Topical sunscreens can consist of chemical and/or physical filters, and antioxidant compounds, aiming at a broader protection. However, this protection is often lacking and, therefore, an interesting strategy is the addition of natural compounds or plant extracts rich in polyphenols in these formulations, since they can present antioxidant and photoprotective activity. Within this context, Lamiaceae Family becomes quite interesting, since it is the main plant family used in the cosmetic industry and has members with a large amount of phenolic compounds. Thus, *Mentha x villosa* has been studied in photoprotection, since its a species of easy cultivation and presents as main non-volatile compounds, rosmarinic acid (RA) and flavonoids. Thus, this work aimed to continue evaluating the photoprotective activity of *M. x villosa* through the seasonal study of the sun protection factor (SPF), antioxidant activity, phenolic, flavonoid and RA content, and also evaluating whether UV radiation and precipitation could influence the production of these metabolites. Subsequently, optimization of the extraction of polyphenols and RA was carried out through the use of a factorial design, varying the percentage of ethanol and powder/solvent ratio used. After optimization, principal component analysis (PCA), LC-HRMS and dereplication (MSⁿ) of the extract were performed in order to identify the compounds present in *M. x villosa* and understand which substances had their extraction favored. Then, SPF, UVA protection factor (UVA-FP) and critical wavelength were determined. These tests were made from the preparation of 8 different formulations containing the optimized extract. Antioxidant activity was evaluated by performing scavenging DPPH and ABTS radicaais assays. As a result, it was seen that the best month for harvest of *M. x villosa* was September and that higher concentrations of polyphenols and flavonoids favor the increase of SPF, as well as, the concentration of RA directly influences antioxidant activity of the species. In addition, it was observed that solar radiation influences on the production of phenolics and the increase in SPF, while precipitation does not seem to influence parameters studied. Regarding the extraction optimization, it was seen that the best conditions for the joint extraction of polyphenols and RA were 70% ethanol and powder/solvent ratio at 5%, promoting the attainment of 264.58 mg GAE/g and 101.96 mg/ g of total phenolics and RA content, respectively. PCA revealed that 7 major components contributed to differentiating the samples and, based on LC-MS analysis, these compounds were identified as polyphenols, along with 23 other compounds. Regarding antioxidant activity, optimized extract showed EC₅₀ = 42.44 µg/mL in the DPPH radical inhibition assay and EC₅₀ = 322.87 µg/mL in the ABTS radical assay. In the evaluation of photoprotective activity, formulations 5 and 6 produced for these tests presented the best values of SPF (23.20 and 30.63) and UVA-PF (12.25 and 26.53), respectively. Thus, corroborating all the results obtained, this work demonstrated the great photoprotective potential of *M. x villosa*, which was able to provide important broad-spectrum protection against UVA and UVB rays, associated with antioxidant activity and also, reducing the concentration of chemical filter used in the formulation, suggesting an alternative to a safer product.

Keywords: Seasonality, SPF, PFUVA, photoprotection, antioxidant, ultraviolet radiation.

Figuras

Figura 1. Mapa de distribuição de espécies pertencentes a família Lamiaceae no mundo.....	19
Figura 2. Principais mono e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais de espécies de Lamiaceae.....	22
Figura 3. Principais tipos de polifenóis presentes em espécies de Lamiaceae.....	23
Figura 4. Distribuição mundial do gênero <i>Mentha</i>	25
Figura 5. <i>Mentha x Villosa</i> Huds.....	28
Figura 6. Estrutura química da Rotundifolona.....	28
Figura 7. Fotoprodutos de DNA causados pela radiação UVB.....	32
Figura 8. Representação das camadas da pele e até onde cada tipo de radiação UV pode penetrar.....	33
Figura 9. Índice Ultravioleta.....	34
Figura 10. Esquema de ações causadas pelas EROs induzidas por radiação UV na pele.....	37
Figura 11. Tipos de metabólitos secundários caracterizados como polifenóis.....	40
Figura 12. Estrutura química do ácido rosmarínico.....	42
Figura 13. O tautomerismo enol-ceto da avobenzona.....	46
Figura 14. Exemplos de fatores externos que influenciam a produção de metabólitos secundários pelas plantas.....	50
Figura 15. Teor de polifenóis de <i>M. villosa</i> e <i>P. amboinicus</i> ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. ns = não significativo. * diferença estatística....	74
Figura 16. Teor de flavonóides de <i>M. villosa</i> e <i>P. amboinicus</i> ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. *diferença estatística.....	75
Figura 17. Teor de AR dos extratos de <i>M. villosa</i> e <i>P. amboinicus</i> ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. ns = não significativo. *diferença estatística.....	75
Figura 18. CEE de <i>M. villosa</i> e <i>P. amboinicus</i> CE ₅₀ em µg/mL e sua comparação estatística ao longo de 12 meses. ns = não significativo. * diferença estatística.....	76
Figura 19. FPS de CEE de <i>M. villosa</i> e <i>P. amboinicus</i> e sua comparação estatística ao longo de 12 meses. ns = não significativo. * diferença estatística.....	76
Figura 20. Análise de componentes principais mostrando a correlação dos grupos de PC4 versus PC1 usando dados obtidos da análise do teor de fenólicos e flavonóides totais, teor de RA, CE ₅₀ , FPS, incidência de radiação solar e nível de precipitação.....	77
Figura 21. Projeção linear em quatro eixos correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides, ácido rosmarínico, CE ₅₀ de <i>M. villosa</i> (círculos azuis) e <i>P. amboinicus</i> (círculos vermelhos). O tamanho dos círculos corresponde a um valor de FPS maior ou menor encontrado.....	78
Figura 22. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de <i>M. villosa</i> (círculos azuis) e <i>P. amboinicus</i> (círculos vermelhos) à radiação solar. O tamanho dos círculos corresponde a um valor SPF maior ou menor encontrado.....	79

Figura 23. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de <i>M. villosa</i> (círculos azuis) e <i>P. amboinicus</i> (círculos vermelhos) à radiação solar. O tamanho dos círculos corresponde a um valor CE ₅₀ maior ou menor encontrado.....	80
Figura 24. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de <i>M. villosa</i> (círculos azuis) e <i>P. amboinicus</i> (círculos vermelhos) à precipitação. O tamanho dos círculos corresponde a um valor FPS maior ou menor encontrado.....	81
Figura 25. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de <i>M. villosa</i> (círculos azuis) e <i>P. amboinicus</i> (círculos vermelhos) à precipitação. O tamanho dos círculos corresponde a um valor CE50 maior ou menor encontrado.....	81
Figura 26. Efeitos da porcentagem de etanol e proporção vegetal sobre o teor de AR, polifenóis e resíduo seco e, eficiência extrativa. A) Gráfico de superfície de resposta do teor de RA. B) Gráfico de superfície de resposta do teor total de polifenóis. C) Gráfico de superfície de resposta do teor de resíduos secos. D) Gráfico de superfície de resposta da eficiência de extração.....	106
Figura 27. Resultados da PCA usando amostras do planejamento fatorial. A) Gráfico de pontos da análise PCA. B) Gráfico de loadings da análise de PCA. EXP = experimento; M = massa; T = tempo.....	107

Tabelas

Tabela 1 Composição das formulações preparadas.....	103
Tabela 2. Intervalo de comprimento de onda crítico e sua relação com o nível de proteção e relação UVA/UVB.....	104
Tabela 3. Matriz de planejamento Fatorial 2 ² com pontos centrais.....	105
Tabela 4. Compostos tentativamente identificados do extrato de <i>M. x villosa</i> por HPLC-ESI-MSn.....	109
Tabela 5. FPS, FPUVA e Comprimento de Onda Crítico das formulações.....	115

Quadros

Quadro 1. Classificação dos antioxidantes de acordo com sua natureza, fonte e mecanismo de ação.....	38
Quadro 2. Estudos da literatura sobre fotoproteção com produtos naturais.....	48
Quadro 3. Relação da quantidade de extrato obtida em cada mês.....	55
Quadro 4. Parâmetros cromatográficos utilizados para análise do extrato de <i>Mentha x villosa</i>	57
Quadro 5. Ponderação empregada no cálculo de fator de proteção solar <i>in vitro</i>	59
Quadro 6. Composição das formulações preparadas.....	65
Quadro 7. Intervalo de comprimento de onda crítico e sua relação com o nível de proteção e relação UVA/UVB.....	66

Equações

Equação 1. Fórmula do fator de proteção solar.....	58
Equação 2. Fórmula da atividade de sequestradora.....	60
Equação 3. Eficiência extrativa.....	61
Equação 4. Fórmula de descoloração do radical ABTS.....	64
Equação 5. Cálculo do fator de proteção monocromático.....	65
Equação 6. Cálculo do FPS.....	65
Equação 7. Cálculo do PFUVA.....	66
Equação 8. Cálculo do comprimento de onda crítico.....	66

Lista de abreviaturas e siglas

6-4PPs	Pirimidina 6-4 pirimidona
AA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ácido rosmarínico
ATM	Serina-treonina quinase
ATR	ATR Serina-treonina quinase
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração eficaz de 50%
CL-EMAR	Cromatografia líquida-Espetrometria de Massas de Alta Resolução
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
DCPs	Dímeros de ciclobutano pirimidina
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EAG	Equivalente de ácido gálico
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Eletron spray
FEC	Fator estimulador de colônia
FPS	Fator de proteção solar
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutathione peroxidase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUV	Índice ultravioleta

LC-HRMS	Liquid chromatography acoppeld to High Resolution Mass spectromety
LC-MS	Liquid chromatography acoppeld to Mass spectromety
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MMP	Metaloproteinase
NOS	Óxido nítrico sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pró análise
PCA	Análise de componentes principais
PGE ₂	Prostaglandina 2
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RDC	Resolução de diretoria colegiada
RE	Resolução
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1. FAMÍLIA LAMIACEAE.....	19
2.2. GÊNERO <i>MENTHA</i>	24
2.3. <i>MENTHA X VILLOSA</i>	27
2.4. RADIAÇÃO SOLAR.....	30
2.5. RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES.....	35
2.6. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	39
2.7. ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	42
2.8. FOTOPROTEÇÃO E PRODUTOS NATURAIS.....	44
2.9. SAZONALIDADE.....	49
3. OBJETIVOS.....	52
3.1. OBJETIVO GERAL.....	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4. METODOLOGIA.....	54
4.1. COLETA DO MATERIAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>MENTHA X VILLOSA</i> DE JANEIRO A DEZEMBRO	55
4.2. ESTUDO DA SAZONALIDADE DE <i>MENTHA X VILLOSA</i>	56
4.3. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE AR NOS EXTRATOS	56
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	57
4.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	58
4.6. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS).....	58
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS.....	59
4.7.1. Método de sequestro de radicais DPPH.....	59
4.7.2. Coleta do material vegetal para a etapa de otimização do extrato.....	60
4.8. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE POLIFENÓIS EM <i>M. X VILLOSA</i>	61
4.8.1. Eficiência extrativa.....	61
4.8.2. Resíduo Seco.....	61
4.8.3. Condições das análises por espectrometria de massas.....	62
4.8.4. Análise de componentes principais (PCA).....	62
4.9. QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	63
4.10. QUANTIFICAÇÃO DE AR.....	63
4.11. MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS DPPH.....	63
4.12. MÉTODO DE SEQUESTRO DE RADICAIS ABTS.....	63
4.13. DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS), FATOR DE PROTEÇÃO UVA (UVA-PF) E COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.....	64
4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5. RESULTADOS.....	67
5.1. ARTIGO 1.....	68
5.1. ARTIGO 2.....	96
6. CONCLUSÃO.....	151
7. REFERÊNCIAS.....	152

Introdução

1. Introdução

A radiação ultravioleta (UV) que é emitida pelo sol tem várias implicações na saúde humana, tanto positivas, quanto negativas. Ela pode ser dividida em três tipos, de acordo com seu comprimento de onda, em UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm), mas apenas os raios UVB e UVA passam pela camada de ozônio. Como ações benéficas, a radiação UVB, por exemplo, é essencial para a produção de vitamina D e contribui para melhora de doenças como a psoríase. Porém, ela também é responsável por causar queimaduras, insolação, manchas e até câncer de pele, já que o DNA é capaz de absorver essa radiação diretamente, sofrendo mutações (PERUGINI et al., 2019).

Os raios UVA também podem ser prejudiciais e como principais efeitos negativos, têm – se a sua grande capacidade de induzir a produção de radicais livres e, a longo prazo, fotoenvelhecimento ou envelhecimento acelerado e câncer de pele. Por esses motivos, e devido à alta exposição ao sol continuamente, o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente na população mundial, bem como na brasileira, correspondendo a 30% de todos os casos de câncer registrados no país (BRASIL, 2022).

Os efeitos do sol, principalmente àqueles relacionados ao câncer de pele são cumulativos, por isso, esse tipo de câncer é mais comum em adultos acima de 40 anos, embora essa faixa etária média venha diminuindo, devido à alta exposição solar das pessoas quando jovens. Dessa forma, a prevenção é imprescindível, devendo ser sempre utilizada. Ela pode ser feita por meio do uso de bonés, óculos de sol, barracas, sombrinhas, roupas de proteção solar e, principalmente, o protetor solar (BRASIL, 2020). Estima-se que utilizar protetor solar rotineiramente pode reduzir o aparecimento de carcinoma de células escamosas em 40%, além de ser capaz de reduzir também o aparecimento de melanoma (GHIA SVAND et al., 2016; SANDER et al., 2020; WATTS et al., 2018).

O protetor solar além de oferecer proteção contra a radiação UV diretamente, filtrando os raios que incidem sobre a pele, ainda pode oferecer proteção antioxidante contra os radicais livres induzidos por eles, promovendo uma proteção adequada, agindo em duas linhas de defesa, a primária e secundária. Sendo a primária justamente aquela com capacidade filtrante da radiação solar e a secundária, a de neutralização dos radicais livres (PERUGINI et al., 2019).

Dessa forma, a incorporação de extratos vegetais em formulações fotoprotetoras têm ganhado destaque, principalmente aqueles que apresentam em sua composição química, compostos fenólicos, que podem ser capazes de guardar tanto as propriedades de filtrar a radiação UV, quanto de agir como antioxidantes. Já que muitas vezes, formulações contendo apenas filtros químicos podem não apresentar uma proteção tão adequada, principalmente quando se considera efeitos a longo prazo, como é o caso do envelhecimento precoce e câncer de pele (EL AANACHI et al., 2020; FACCIO, 2020).

Por isso, levando em consideração a forte presença de compostos fenólicos em espécies da família Lamiaceae, bem como no gênero *Mentha*, que se apresenta como um gênero de grande importância para o bem estar humano em várias áreas, bem como na medicina popular e científica, esse trabalho buscou avaliar o potencial fotoprotetor e antioxidante de *Mentha x villosa*, conhecida popularmente como hortelã-da-folha-miúda e que possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, anti hipertensiva, entre outras, sendo demonstradas na literatura (FATIH et al., 2017; HANAFY et al., 2017; NUNES GUEDES et al., 2004; SHEN et al., 2011). Em trabalho anterior nosso (GOMES, 2018), *M. x villosa* também demonstrou interessante potencial fotoprotetor, apresentando fator de proteção solar (FPS) *in vitro* de 12,79, o que nos incentivou a continuar essa investigação. Agora também, realizando um estudo sazonal de suas atividades, avaliando como isso poderia alterar seu FPS e sua atividade antioxidante.

Fundamentação teórica

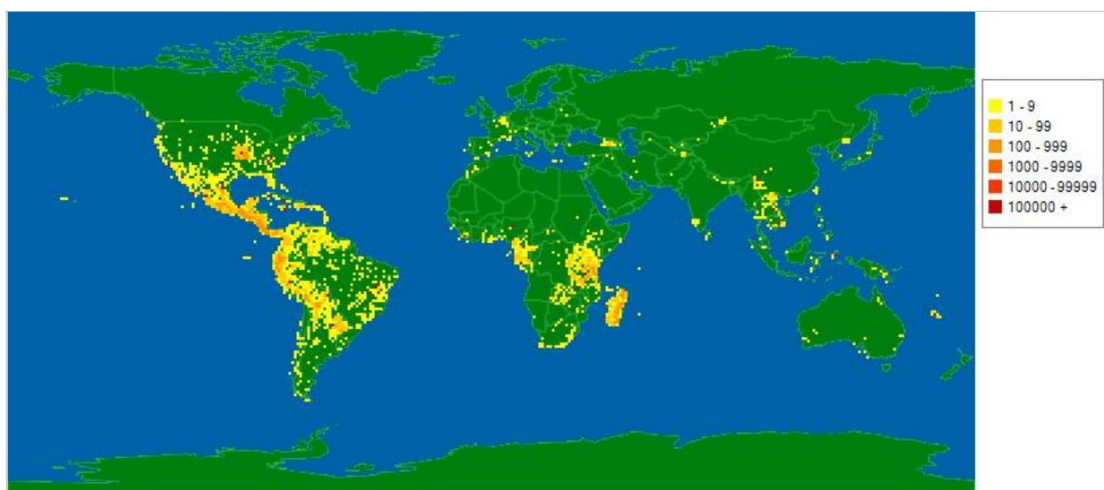
2. Fundamentação teórica

2.1. Família Lamiaceae

A família Lamiaceae compreende uma das maiores famílias de vegetais existentes e, por muito tempo, ela foi conhecida como Labiatae e como “*mint Family*”, tendo seu nome alterado por volta de 1820 (MICHEL; ABD RANI; HUSAIN, 2020; NAPOLI; SIRACUSA; RUBERTO, 2020). Ela apresenta 245 gêneros e cerca de 22.576 espécies já foram incorporadas a essa família, porém, apenas 7.886 espécies são consideradas verdadeiras pertencentes a ela, pois muitos sinônimos e atribuições erradas foram retiradas (NAPOLI; SIRACUSA; RUBERTO, 2020).

Essa família compreende 12 subfamílias, sendo estas: Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Callicarpoideae, Cymaroideae, Tectonoideae, Peronematoideae, Premnoideae Prostantheroideae, Scutellarioideae, Symphorematoideae e Viticoideae (FREZZA et al., 2019). No geral, suas espécies estão distribuídas em quase todo o mundo Figura 1 e, apresentam crescimento típico em zonas tropicais e temperadas, sendo na bacia mediterrânea o lugar onde essas espécies encontram as melhores condições para se desenvolver plenamente (FREZZA et al., 2019; NAPOLI; SIRACUSA; RUBERTO, 2020; SKENDI et al., 2020). Lamiaceae é conhecida por apresentar o maior número de plantas aromáticas dentre todas, possuindo membros com grande produção de óleos essenciais (KUMAR et al., 2019; NAPOLI; SIRACUSA; RUBERTO, 2020; SKENDI et al., 2020).

Figura 1. Mapa de distribuição de espécies pertencentes a família Lamiaceae no mundo.



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

No Brasil, membros dessa família estão presentes por todo o território, havendo 46 gêneros (dos quais 6 são endêmicos) e 524 espécies (das quais 343 são endêmicas), sendo a região sudeste a que apresenta mais espécies pertencentes a Lamiaceae, que crescem como arbustos, árvores, ervas, volúvel/trepadeiras e subarbustos (HARLEY et al., 2015).

As espécies de Lamiaceae se apresentam como uma grande fonte de produtos consumidos pela população mundialmente, já que a utilização dessas espécies é diversa, passando por vários segmentos industriais. Segundo VAN WYK, 2014, 114 das 701 espécies usadas na culinária, são da família Lamiaceae. Elas podem ser utilizadas seja como tempero, condimentos e especiarias, a exemplo do alecrim (*Rosmarinus officinales*) e do orégano (*Origanum vulgare*), na salada e em sucos, como a hortelã (espécies do gênero *Mentha*), também como chás, como é o caso das espécies anteriores, bem como o boldo-pequeno (*Plectranthus ornatus*), falso-boldo (*Plectranthus barbatus*), incensos (*Tetradenia riparia*) e, até como conservantes alimentares, devido a atividade antioxidante que muitas apresentam (AHN; ALFORD; NIEMEYER, 2020; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; RATTRAY; VAN WYK, 2021).

Como nutraceuticas, as espécies são usadas através de chás, decocções, infusões e com o material vegetal bruto. Muitas das espécies com essa propriedade estão reunidas na subfamília Nepetoideae, embora algumas espécies em outras subfamílias também sejam utilizadas. A exemplo de espécies da subfamília Nepetoideae, tem-se: *Lepechinia caulescens* (usada contra hipertensão e pela sua atividade antioxidante), *Melissa officinalis* (usada contra distúrbios gastrintestinais e para distúrbios de sono), *Hypenia* spp (usadas como aromatizantes e para o tratamento de resfriados, gripes, etc), entre outras (FREZZA et al., 2019).

Outra utilização importante é na indústria de cosméticos, já que a família Lamiaceae é a principal fonte de componentes de origem vegetal usados para a produção de vários cosméticos, principalmente com finalidade de skincare, antienvelhecimento e anticelulite (CHARLES DORNI et al., 2017). O extrato das raízes de *Collinsonia canadensis* é utilizado em formulações cosméticas para a proteção contra raios UV (MAZZIO et al., 2014), assim como as flores e as partes aéreas de *Marrubium vulgare*, que além disso, também exerce atividade anti-inflamatória (SHAHEEN et al., 2014). Outras espécies com atividade fotoprotetora utilizadas são:

Coleus forskohlii, e *Thymus vulgaris* devido principalmente a presença de compostos fenólicos em suas composições (DORNI et al., 2017).

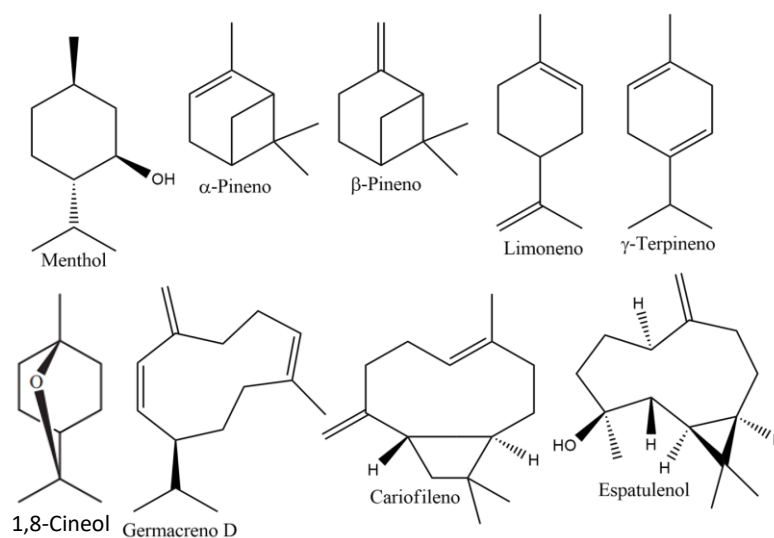
Já o óleo de sementes da chia (*Salvia hispanica*), por exemplo, rico em ácidos graxos como ácido linoleico, ácido α -linoleico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico, é bastante interessante, pois esses ácidos graxos são capazes de prevenir a perda de água trans epidérmica, manter a barreira epidérmica do estrato córneo e interromper a melanogênese nos melanócitos epidérmicos, inibindo a produção de manchas. Além disso, o óleo de chia também é usado em formulações de skincare devido a sua atividade antioxidante, mostrando a riqueza de propriedades existentes na família (CHARLES DORNI et al., 2017; DIWAKAR et al., 2014; MARINELI et al., 2014).

Na área da saúde, espécies de Lamiaceae também tem papel de destaque pela grande utilização de suas ervas medicinais tanto na medicina popular, quanto de forma cientificamente comprovada, apresentando, inclusive, representantes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009) e na farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019). No RENISUS, a família Lamiaceae está representada pelas espécies do gênero *Mentha*, sendo elas *M. pulegium*, *M. piperita*, bem como *Ocimum gratissimum*, *Plectranthus barbatus* e *Lamium album*. No caso das espécies de *Mentha*, elas são utilizadas como expectorantes e contra problemas gastrointestinais. Já *Ocimum gratissimum*, apresenta atividades como antimicrobianas, hipoglicemiante, anti-hipertensiva, hepatoprotetora, entre outras.

Todas essas atividades e propriedades relevantes para o ser humano só são possíveis pela complexidade de compostos existentes nessa família. Dessa forma, a classificação dessa família do ponto de vista fitoquímico é um pouco controversa, já que, de maneira geral, os pesquisadores separam Lamiaceae em dois grandes grupos a partir da produção de determinados metabólitos, um grupo é representado por aquelas espécies que produzem óleos essenciais (subfamília Nepetoideae) e o outro grupo é formado por espécies que produzem espécies polares não voláteis (subfamília Lamioideae), e que praticamente não produzem óleos essenciais. Porém, essa classificação não é tão precisa, devido ao fato de que já houveram diversos realinhamentos de gêneros e porque várias espécies de Lamioideae produzem óleos essenciais (RATTRAY; VAN WYK, 2021).

Grande parte da importância da utilização das espécies de Lamiaceae em vários setores industriais se deve a vasta produção de óleos essenciais realizada por elas, que são capazes de desempenhar diversos papéis, desde compor o aroma de perfumes até servir como inseticida no controle de pragas. Embora o conteúdo de óleos essenciais possa variar bastante entre as espécies e inclusive entre a mesma espécie cultivada sob diferentes condições ou lugares, em sua maioria, esses óleos são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos, como por exemplo: mentol, α e β -pineno, limoneno, 1,8-cineole e γ -terpineno, bem como germacreno D, cariofileno e espatulenol, respectivamente, Figura 2 (FREZZA et al., 2019).

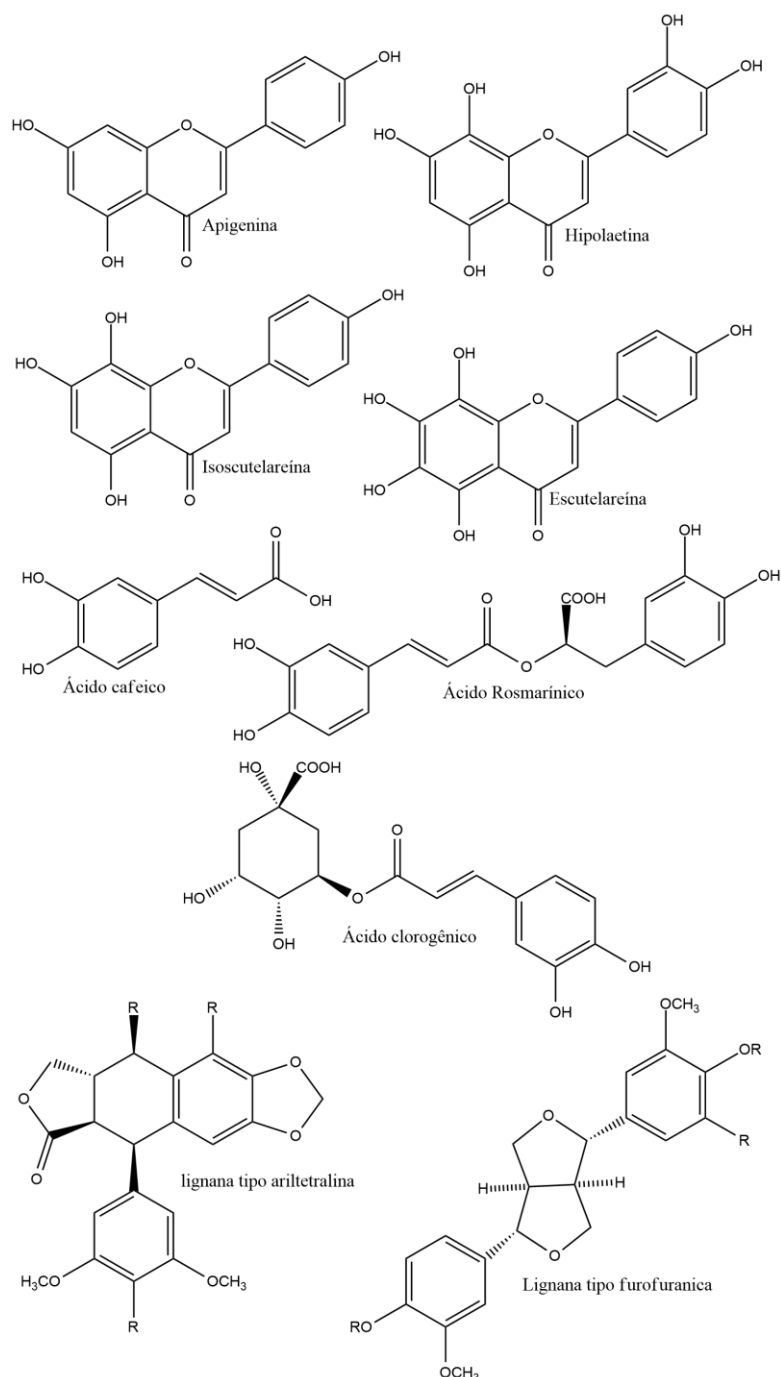
Figura 2. Principais mono e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais de espécies de Lamiaceae.



(Fonte: FREZZA et al., 2019)

Já com relação aos compostos não voláteis, os principais metabólitos encontrados são pertencentes a classe dos polifenóis (principalmente flavonoides, ácidos fenólicos e lignanas), iridoides, triterpenos, diterpenos, e glicosídeos feniletanoides. Entre os flavonoides, quatro tipos específicos de esqueletos são amplamente presentes, são eles: apigenina, hipolaetina, isoscutelareína e escutelareína. Os ácidos fenólicos são representados pelo ácido cafeico, ácido rosmarínico e seus derivados, já as lignanas de esqueletos parecidos com ariltetralina e furofuranicas representam as mais comuns nesta família e ácidos cafeoilquínicos (ácido clorogênico) também são bastante comuns Figura 3 (FREZZA et al., 2019; TZIMA; BRUNTON; RAI, 2018; VAN WYK, 2014).

Figura 3. Principais tipos de polifenóis presentes em espécies de Lamiaceae.



(Fonte: FREZZA et al., 2019)

A presença de polifenóis em Lamiaceae é bastante importante e ajuda também a explicar determinadas atividades biológicas, como antioxidante e anti-inflamatórias de muitas de suas espécies (SIMEONI et al., 2018; SKENDI; IRAKLI; CHATZOPOULOU, 2017; STAGOS et al., 2012). Inclusive, cada vez mais evidências científicas tem se encontrado associando a alimentação rica em polifenóis com

benefícios à saúde, como a diminuição de doenças cardiovasculares e degenerativas (MICHEL; ABD RANI; HUSAIN, 2020; TZIMA; BRUNTON; RAI, 2018).

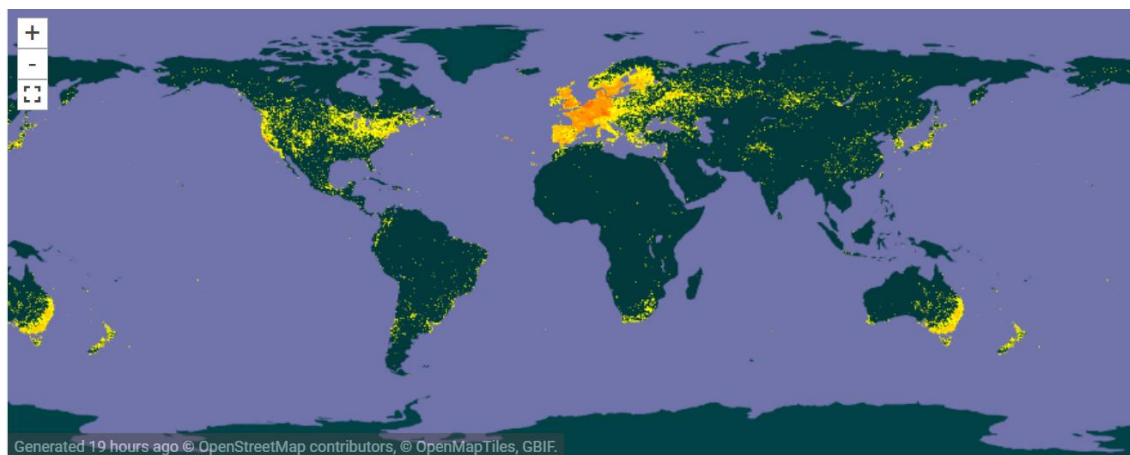
Os polifenóis também têm demonstrado outras atividades, como antitumoral, antidiabética, contra osteoporose (SIMEONI et al., 2018), antifúngica (SKENDI et al., 2020), antibacteriana (STAGOS et al., 2012) e fotoprotetora, como no caso de espécies já citadas anteriormente, *Coleus forskohlii*, *Thymus vulgaris* (CHARLES DORNI et al., 2017), *Collinsonia canadenses* (MAZZIO et al., 2014), *Marrubium vulgare* (SHAHEEN et al., 2014), *Plectranthus amboinicius* (TERTO et al., 2020), entre outras, sendo o estudo de extratos ricos em compostos fenólicos muito importantes para a produção de formulações de protetores solares de fonte natural seguras e eficazes, além de mostrar também o potencial da família Lamiaceae nessa área.

2.2. Gênero *Mentha*

O gênero *Mentha* pertence à família Lamiaceae e apresenta cerca de 42 espécies, bem como diversos híbridos, que se distribuem principalmente na Europa, Ásia, Austrália e América do Norte Figura 4 (SALEHI et al., 2018; WFO, 2022). Esse gênero apresenta vários sinônimos e sua taxonomia é bastante complexa e muitas vezes não há um consenso entre os pesquisadores (SALEHI et al., 2018). No Brasil, 4 espécies podem ser encontradas em todas as 5 regiões do país, mas principalmente nos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, geralmente na forma de erva (ANTAR; HARLEY, 2020).

As espécies mais comuns do gênero são *M. piperita*, *M. aquatica*, *M. spicata*, *M. rotundifolia*, *M. arvensis*, *M. pulegium*, *M. longifolia*, e *M. suaveolens*, sendo bastante estudadas e cultivadas. Espécies desse gênero apresentam enorme valor comercial, sendo empregadas em várias áreas como na alimentação, na área de plantas ornamentais, indústria de cosméticos, produtos de higiene oral, pesticidas e na área de saúde, principalmente devido aos seus óleos essenciais (EFTEKHARI et al., 2021; GHOLAMIPOURFARD; SALEHI; BANCHIO, 2021; PARK et al., 2019).

Figura 4. Distribuição mundial do gênero *Mentha*.



(Fonte: GBIF SECRETARIAT, 2021)

Popularmente, as espécies de *Mentha* têm suas folhas e/ou partes aéreas vastamente utilizadas na culinária principalmente na forma de sucos, saladas, flavorizantes e chás, mas também são bastante utilizadas para o tratamento de diversos problemas de saúde, como problemas de pele, resfriados, diabetes, infecções microbianas, desordens gastrointestinais e respiratórias, carminativa, dor de cabeça, febre, náuseas, como anti-inflamatórias, antioxidante (ALAMGEER et al., 2022; ANWAR et al., 2019; EL MENYIY et al., 2022; MAHENDRAN; VERMA; RAHMAN, 2021; PARK et al., 2019), entre outros.

Do ponto de vista científico, muitas desses usos populares têm sido confirmados e outras atividades biológicas também tem sido atribuídas. Vários estudos *in vitro* e/ou *in vivo* demonstram suas atividades antioxidantes (BRAHMI et al., 2017; MAHDAVIKIA; SAHARKHIZ; KARAMI, 2017), antimicrobianas e antifúngicas, antiparasitárias, inseticidas (EL MENYIY et al., 2022; GHOLAMIPOURFARD; SALEHI; BANCHIO, 2021), antidiabéticas (AL-FARTOSI; RADI; AL-REKABI, 2014; BAYANI; AHMADI-HAMEDANI; JAVAN, 2017; MUSHTAQ et al., 2017; RAKEBIZADEH; ZAHEDIZADEH; PANAHAH, 2018), antitumoral (TAFRIHI et al., 2021), inibidoras da acetilcolinesterase (DE SOUSA BARROS et al., 2015; KHATOON et al., 2018), onde foi visto que devido a esse efeito, o óleo essencial de *M. piperita* apresentou uma alta eficiência clínica no tratamento da doença de Alzheimer (DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009), entre outras.

Fitoquimicamente, muitas dessas atividades se devem aos seus ricos óleos essenciais, que apresentam uma composição complexa, com mais de 300 compostos

já identificados e movimentam uma economia de valores comerciais maiores que 400 milhões de dólares por ano. Em sua maioria são representados por terpenos, mono e sesquiterpenos, como por exemplo, os monoterpenos *p*-metano C3-oxigenados (ex.: pulegona, mentona e mentol) ou os *p*-mentano C6-oxigenados (ex.: carvona), porém essa composição pode variar bastante dependendo da espécie, por exemplo, *M. spicata* ssp., *M. viridis* e *M. gracilis* produzem óleos ricos em carvona, já *M. piperita* tem como composto majoritário o mentol, enquanto que *M. pulegium* tem um óleo essencial rico em pulegona (FATIH et al., 2017; SALEHI et al., 2018).

Outra classe muito importante de metabólitos secundários presentes nas espécies de *Mentha* são os compostos fenólicos, que aqui são principalmente representados por ácidos fenólicos e flavonoides, que podem estar glicosilados ou não, muito embora vários outros tipos de fenólicos já tenham sido identificados. Em relação aos ácidos fenólicos, os principais são os ácidos cafeico, clorogênico, ácidos salvianólicos e rosmarínico, estando este último entre 60-80% do teor de ácidos fenólicos existentes. Já os flavonoides tem como compostos principais, aqueles com esqueleto de flavona e flavanonas, sendo a luteolina e seus derivados, hesperidina e eriocitrina, os mais comuns (FATIH et al., 2017).

Os compostos fenólicos também são responsáveis por determinadas atividades biológicas das espécies de *Mentha*, como no caso do estudo feito por CAVAR ZELJKOVIĆ et al., 2021, que avaliou a atividade antioxidante de 13 espécies de *Mentha*, bem como sua atividade inibidora da enzima tirosinase (essencial para a melanogênese), e as relacionou com o teor de fenólicos de cada espécie, concluindo que as quatro espécies (*M. x villosa*, *M. suaveolens*, *M. longifolia* e *M. x piperita* Bergamota) que apresentaram os maiores teores de polifenóis, apresentaram as melhores atividades antioxidantes, enquanto que *M. pulegium* e *M. x piperita* apresentaram as melhores atividades inibidoras de tirosinase.

Já na revisão feita por TAFRIHI et al., 2021, vários estudos sugeriram importantes atividades antibacterianas de extratos etanólicos e aquosos de espécies de *Mentha*, como por exemplo um estudo feito por SUJANA et al., 2013, que apresentou a forte atividade antibacteriana do extrato das folhas de *M. x piperita* contra cepas das bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Ainda na mesma revisão, outras atividades associadas a presença de polifenóis nos extratos de *Mentha* também foram descritas, como atividade antiviral e antitumoral.

Além de todas essas atividades, polifenóis também são importantes na área da fotoproteção, já que eles são capazes de filtrar a radiação solar que incidente sob a pele, o que pode tornar extratos vegetais com concentrações adequadas desses metabolitos, promissores nessa área, principalmente porque as plantas já utilizam polifenóis como forma de proteção contra a radiação UV. Em um estudo feito por NAZARI; ZARINKAMAR, 2020, foi observado que a irradiação com radiação UVB em *Mentha aquática* promoveu o aumento do teor de flavonoides e antocianinas especialmente nas fases vegetativas iniciais de seu desenvolvimento.

Em outro trabalho realizado por YAKOUBI et al., 2021, o fator de proteção solar do extrato aquoso de *M. pulegium* foi determinado e correspondeu a 35,58, tendo um alto fator de proteção contra a radiação UVB. Dessa forma, as espécies do gênero *Mentha* se apresentam como importantes ervas medicinais e com potencial para serem estudadas em áreas que ainda não foram tão bem exploradas, em especial, a da fotoproteção.

2.3. *Mentha x villosa*

A espécie *Menha x villosa* Huds. está incluída no gênero *Mentha* e é, na verdade, um híbrido das espécies *Mentha spicata* L. e *Mentha suaveolens* E. Ela se apresenta como uma planta de clima subtropical, herbácea, de baixo crescimento, com ramos eretos, folhas ovais pecioladas opostas e curtas de margens serrilhadas e crenadas, com aroma forte e característico (BEZERRA et al., 2019; MOETAMEDIPOOR et al., 2021, 2022) Figura 5. No Brasil, ela é popularmente chamada de hortelã da folha miúda ou hortelã rasteira e é bastante cultivada principalmente no nordeste do país (AMARAL et al., 2015; CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010).

A exemplo tanto da família, quanto do gênero, *M. x villosa* tem aplicações em diversas áreas (ALVES et al., 2018), bem como na medicina popular, onde é usada para dores e inflamações no geral, dores de cabeça, cólicas menstruais, sinusite, febre, problemas oftálmicos, indigestão, infecções intestinais, antimicrobiana, antiparasitária (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010; FOGAÇA et al., 1997; TURKEZ et al., 2018), entre outros.

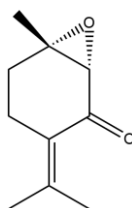
Figura 5. *Mentha x villosa* Huds



(Fonte: Gomes, 2018)

Por ter um óleo essencial muito rico em substâncias biologicamente ativas, vários estudos desde da década de 90 já foram feitos para avaliar os efeitos do seu óleo e de seu principal componente, o monoterpreno, rotundifolona, Figura 6. Dessa forma, estudos como os de ARRUDA et al., 2006; DA CRUZ ALMEIDA et al., 2018; DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; GUERRA et al., 2015, demonstram o potencial antimicrobiano do óleo de *M. x villosa*, especialmente como antifúngico.

Figura 6. Estrutura química da Rotundifolona.



Além disso, trabalhos como os de BORTOLUZZI et al., 2021; MATOS-ROCHA et al., 2013, 2020, observaram efeito antiparasitário desse mesmo óleo essencial. Inclusive, no trabalho de MATOS-ROCHA et al., 2013, a rotundifolona também foi testada e demonstrou resultados de atividade *in vitro* contra *Schistomossa mansonii* promissora. No trabalho de DE SOUSA; LIMA; STEVERDING, 2016, tanto o óleo quanto a rotundifolona (entre outros monoterpenos tipo *p*-mentano) tiveram suas atividades anti *Trypanosoma brucei* avaliadas, e foi observado que a rotundifolona apresentou significativa atividade contra *T. brucei*, necessitando de maiores investigações nesse aspecto.

Outra atividade do óleo essencial de *M. x villosa* e da rotundifolona isolada que vem sendo explorada, é sua atividade no sistema cardiovascular. No estudo de LAHLOU et al., 2022 foi observada a diminuição da pressão arterial de ratos normotensos conscientes, de maneira dose dependente, após o tratamento intravenoso com o óleo essencial de *M. x villosa*. Da mesma forma, em outro estudo conduzido por LAHLOU; CARNEIRO-LEÃO; LEAL-CARDOSO, 2002, foi visto que o óleo também promoveu a diminuição da pressão arterial em ratos “DOCA-salt-hypertensive” de maneira dose dependente. No estudo de GUEDES et al., 2002, observaram que esse efeito hipotensor pode estar associado a estimulação não seletiva de receptores muscarínicos que a rotundifolona é capaz de promover. Outros trabalhos ao longo dos anos também vêm descrevendo essas atividades, como nos outros 2 trabalhos de NUNES GUEDES et al., 2004 e nos trabalhos SILVA et al., 2011 e na revisão de DE ANDRADE et al., 2017.

As atividades antioxidante (BENABDALLAH et al., 2018; SITZMANN et al., 2014; TURKEZ et al., 2018), antinociceptiva (DE SOUSA et al., 2007), larvicida (LIMA et al., 2014), antiespasmódica (DE SOUSA et al., 2008), antiviral contra SARS-Cov-2 (popularmente conhecido como “*novo coronavírus*”) (CAVAR ZELJKOVIĆ et al., 2022), antitumoral e citotóxica (AMARAL et al., 2016; TURKEZ et al., 2018) do óleo e da rotundifolona também vêm sendo descritas.

Além dos terpenos existentes nos óleos essenciais de *M. x villosa*, outra classe muito importante de metabólitos secundários existentes nessa planta são os compostos fenólicos, representados principalmente por ácidos fenólicos e flavonoides (CAVAR ZELJKOVIĆ et al., 2021). Esses compostos também são bastante importantes do ponto de vista terapêutico e estudos também têm sido feitos para avaliar as atividades dos extratos de *M. x villosa*.

Dessa forma, no estudo de BROSKOVÁ et al., 2013, foi avaliado o efeito do extrato de *M. x villosa* frente a um modelo de isquemia cardíaca e mesentérica em órgãos isolados, onde o extrato causou a redução das arritmias, bem como, bradicardia, além de ter apresentado efeito antioxidante. Da mesma forma, o trabalho de FIALOVAA et al., 2015, concluiu que o extrato aquoso de *M. x villosa* tem potencial promissor na prevenção da lesão tecidual causada pelo estresse oxidativo. Nesse trabalho, também foi sugerida a presença de 16 polifenóis, através de experimentos com espectrometria de massas, são eles: ácido quínico, ácido clorogênico, *p*-cumaroil-hexosídeo, ácido caféico, ácido cumaroilquínico, ácido litospermico,

luteolina-7-*O*-glucuronideo, eridictiol-7-*O*-rutinosideo, luteolina-7-*O*-rutinosideo, luteolina-7-*O*-glicosideo, apigenina- glucuronideo, ácido rosmarínico, campferol-3- *O*-glucuronideo, crisoeriol-7-*O*-rutinosideo, hesperitina-7-*O*-rutinosideo e ácido salvianólico A.

CAVAR ZELJKOVIĆ et al., 2021 também observaram um alto teor de compostos fenólicos (e forte atividade antioxidante), com composição similar ao do estudo acima para o extrato metanólico de *M. x villosa*, onde o ácido rosmarínico foi identificado como composto majoritário. Boa atividade inibidora de tirosinase também foi determinada. A atividade antioxidante também foi encontrada no trabalho de (TEKELOVÁ et al., 2016). Já no trabalho de KAPP et al., 2020 foi observada a atividade antibacteriana contra *S. aureus* do extrato aquoso de *M. x villosa*. Além disso, outras atividades como, antitumoral, citotóxica, radioprotetiva, *in vitro*, do extrato aquoso também foram observadas, bem como a atividade analgésica *in vivo* (KAPP, 2015).

Assim, levando em consideração todas as promissoras propriedades terapêuticas levantadas, além da rica composição química da espécie *M. x villosa* e sua importante atividade antioxidante já descrita, essa espécie merece atenção, especialmente em áreas ainda pouco exploradas, como a da fotoproteção, devido à forte presença de compostos fenólicos.

2.4. Radiação solar

A radiação solar que chega na superfície terrestre é composta de ondas eletromagnéticas de comprimentos de ondas diferentes, as infravermelhas, que possuem comprimentos de onda entre 1 mm e 1 µm (correspondem a cerca de 50% da radiação solar), luz visível de 400 – 750 nm (em torno de 40-45%) e a radiação ultravioleta (UV) de 100 – 400 nm (cerca de 5-10%). A ultravioleta pode ainda ser subdividida em três, são elas a UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320 – 400 nm) (DELINASIOS et al., 2018; HIBLER; DUSZA; WANG, 2016; SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017).

Este tipo de radiação (UV) apresenta efeitos diretos na saúde humana, já que ela regula a função imunológica de modo a reduzir a severidade de certas doenças de pele (ex: psoríase), depressão e possivelmente doenças sistêmicas autoimunes, além dos raios UVB serem necessários para a produção de vitamina D. Porém, muitos efeitos negativos também são observados quando da exposição por longos períodos.

De forma aguda, os efeitos incluem eritemas, manchas, espessamento da epiderme, queimaduras, entre outros. Já de forma crônica, fotoenvelhecimento e câncer são os efeitos mais comuns. Isso acontece porque a diversas estruturas da pele absorvem a radiação incidente, como a melanina, DNA e RNA celulares, proteínas, aminoácidos aromáticos, entre outros (BARNES et al., 2019; BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019; LUCAS et al., 2019; SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017).

Devido ao seu comprimento de onda, existem diferenças entre o nível que os três tipos de radiação ultravioleta podem penetrar na pele. Começando pelos raios UVC, é importante saber inclusive, que, eles são filtrados pela camada de ozônio e não atingem a pele, o que poderia ser bastante prejudicial, já que a radiação UVC tem o menor comprimento de onda e é a mais energética, podendo causar severas queimaduras, na pele e nos olhos (DE JAGER; COCKRELL; DU PLESSIS, 2017).

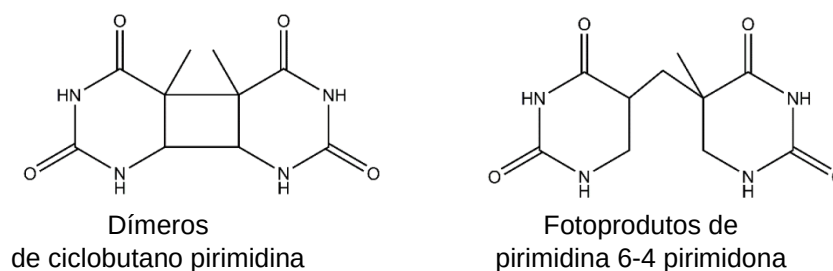
Em relação a radiação UVB, embora ela ainda seja atenuada pela camada de ozônio e até pelas próprias nuvens, cerca de 5 a 6% da radiação UV que atinge o solo terrestre corresponde a ela. Os raios UVB tem comprimento de onda menor que os raios UVA e por isso são mais energéticos, sendo dessa forma capazes de penetrar o tecido cutâneo apenas até a epiderme. Entretanto, sua menor capacidade de penetração na pele não impede que ela cause danos bastante acentuados neste local. A radiação UVB é responsável por causar eritemas, manchas, insolação, queimaduras, imunossupressão e câncer, pois esse tipo de radiação é muito eficientemente absorvida pelas moléculas de DNA, que podem sofrer degradação, formando fotoprodutos (BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019; SAMANIEGO RASCÓN; FERREIRA; GAMEIRO DA SILVA, 2017).

Os fotoprodutos de DNA mais comumente produzidos após incidência de radiação UVB, são os dímeros de ciclobutano pirimidina (DCPs) e os fotoprodutos de pirimidina 6-4 pirimidona (6-4PPs) Figura 7. Os DCPs são as principais lesões citotóxicas causadas, sendo responsáveis pela morte celular após exposição prolongada ao sol. A formação desses DCPs pode levar a mutações características que podem ser encontradas em melanomas malignos cutâneos, carcinoma espinocelular e basocelular e queratose actínica (BÉRUBÉ et al., 2018; KCIUK et al., 2020; LUCAS et al., 2019).

Entretanto, os 6-4PPs também são importantes, pois eles causam acentuadas perturbações na estrutura de dupla hélice do DNA, que são incapazes de serem

contornadas pelas células, levando também a morte celular (BÉRUBÉ et al., 2018; KCIUK et al., 2020). Esse tipo de mecanismo pode também causar manchas de pele, através da estimulação da melanogênese, que é feita em resposta aos danos causados ao DNA e, a radiação UVB pode ainda causar a estimulação de processos inflamatórios, pela liberação de prostaglandina E2 (PGE₂) e fator estimulador de colônia (FEC) (HYTER et al., 2013; MOORE et al., 2013; TAGASHIRA et al., 2015).

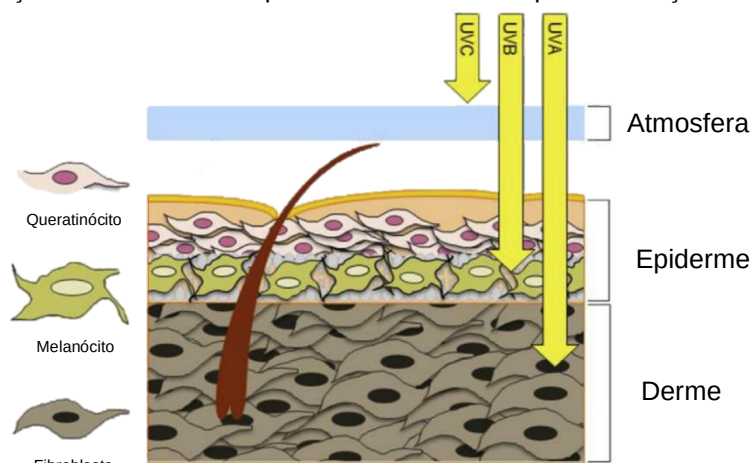
Figura 7. Fotoprodutos de DNA causados pela radiação UVB.



Já a radiação UVA, além de não ser retida ou atenuada pela camada de ozônio ou por nuvens, por apresentar um comprimento de onda maior que a radiação UVB, é capaz de penetrar mais profundamente e atingir a derme, onde causa seus efeitos deletérios. Eles representam de 90-95% da radiação UV que atinge a superfície terrestre e podem ainda ser divididos em dois subtipos, UVA 2 ou curto (320-340 nm) e UVA 1 ou longo (340-400 nm) (BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019).

Dessa forma, eles são responsáveis pelo escurecimento imediato e persistente da pele não protegida (bronzeamento) e são conhecidos também por atuar ativamente na indução da produção de estresse oxidativo, causando fotoenvelhecimento da pele ou envelhecimento acelerado, sendo visto que as alterações patognomônicas da pele fotoenvelhecida são encontradas principalmente no tecido conjuntivo dérmico (LAN, 2019; MARIONNET et al., 2018). Acredita-se, inclusive, que o aumento da síntese e expressão de metaloproteinases (MMPs) pelos fibroblastos dérmicos após a exposição aos raios UV, desempenhe um papel importante na degradação do colágeno dérmico, uma proteína especial para assegurar a integridade dérmica devido a formação do sistema gel, que mantém as características dérmicas de uma pele jovem (LAN, 2019).

Figura 8. Representação das camadas da pele e até onde cada tipo de radiação UV pode penetrar.



(Fonte: KCIUK et al., 2020)

Assim como a radiação UVB, os raios UVA também podem causar danos ao DNA diretamente, porém, isso acontece mais frequentemente através da formação de radicais livres ou de “*intermediários reativos de oxigênio*”, já que os raios UVA são mais eficientes em produzi-los. Na presença de oxigênio molecular, a radiação UVA leva à formação de ânions superóxido, óxido nítrico, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, bem como produtos de peroxidação lipídica (principalmente de bicamadas lipídicas), como epóxido de colesterol. Os intermediários reativos de oxigênio oxidam resíduos de açúcar, causam quebras nas moléculas de DNA de fita simples e dupla e podem ativar proteínas por fosforilação, o que pode levar a formação de tumores. Uma das lesões mais conhecidas e estudadas, é a da purina guanina que sofre uma modificação oxidativa, 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) (BERNARD; GALLO; KRUTMANN, 2019; DELINASIOS et al., 2018).

Além disso, nos últimos anos têm-se observado que a exposição da melanina à radiação UVA pode desencadear a formação de DCPs por um processo de degradação, envolvendo estados eletrônicos excitados quimicamente gerados, onde a melanina degradada transfere sua energia para bases de DNA próximas, levando à formação de DCPs escuros (DELINASIOS et al., 2018; PORTILLO-ESNAOLA et al., 2021; PREMI et al., 2015).

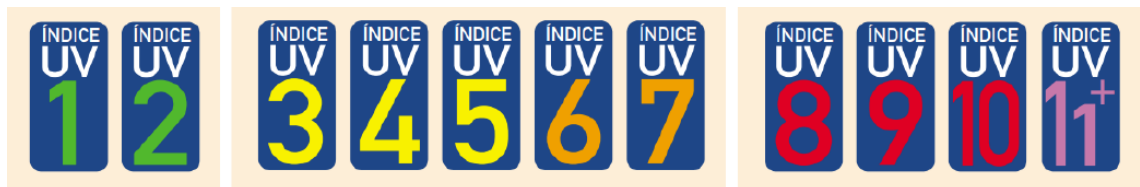
Dessa forma, observa-se que os dois tipos de radiação ultravioleta podem causar, além de outros prejuízos, câncer de pele, que se divide em dois tipos, o melanoma e o não melanoma. O melanoma se caracteriza por ser um câncer mais agressivo, porém menos frequente (apenas 3% da população apresenta) que em 2020, causou a morte de 1.923 pessoas. O não melanoma é um tipo de câncer de

pele mais frequente (176.930 casos em 2020), mas também o de menor mortalidade (2.653 mortes) e com melhor prognóstico (BRASIL, 2022).

Diante disso, é essencial a utilização de medidas preventivas contra a radiação solar, principalmente porque no Brasil, os níveis de radiação ultravioleta são considerados elevados durante a maior parte do ano. Principalmente em regiões como Norte e Nordeste que não dispõem de estações do ano tão bem divididas e que por isso, recebem intensa luz solar durante todo ano, apresentando maiores doses cumulativas da radiação ultravioleta anualmente. No caso das regiões Sul e Sudeste, por apresentarem estações mais bem definidas, a intensidade da radiação varia bastante entre inverno e verão (SCHALKA et al., 2014).

A intensidade da radiação ultravioleta é medida de acordo com o cálculo do índice ultravioleta (IUV), que detecta o nível máximo de radiação ultravioleta apresentado em determinado dia, para determinado local e é usado internacionalmente. Porém como as condições meteorológicas e geográficas podem influenciar o nível de radiação que chega ao solo, esse índice leva em consideração condições de céu claro, sem nuvens. A escala do IUV considera valores entre 1 e 11+, onde 1 seria uma intensidade de baixa radiação ultravioleta e 11+ seria uma intensidade extrema de radiação UV Figura 9 (LATOSÍNSKA; LATOSÍNSKA, 2017; LIU-SMITH; ZIOGAS, 2020; OMS, 2022). No Brasil, é visto que esse índice é considerado extremo em boa parte do ano (SCHALKA et al., 2014).

Figura 9. Índice Ultravioleta.



(Fonte: OMS, 2022)

Por isso, a utilização de protetores solares diariamente é de extrema importância tanto para prevenir o aparecimento de envelhecimento acelerado, quanto para prevenir o câncer, já que os efeitos do sol são cumulativos e muitas vezes o aparecimento de doenças só acontecem de 20 a 30 anos depois (DEO et al., 2017; LIU-SMITH; ZIOGAS, 2020). Nesse contexto, utilização de produtos de origem natural vem sendo bastante investigada, pois eles têm demonstrado ser uma alternativa viável

até para potencializar a proteção de filtros sintéticos (BHATTACHARYA; SHERJE, 2020; CHIARI-ANDRÉO et al., 2020).

2.5. Radicais livres e antioxidantes

Radicaís livres são definidos quimicamente como sendo espécies (átomos ou moléculas) com elétrons desemparelhados na sua camada eletrônica mais externa, o que causa uma alta reatividade na estrutura química, em alguns casos, essa reatividade é tão grande, que impossibilita mensurar o tempo de vida dessa estrutura. Porém, hoje em dia sabe-se que existem várias moléculas que não apresentam elétrons desemparelhados, mas ainda assim, possuem reatividade comparável à de um radical livre propriamente dito. Por isso, considera-se o termo “espécies reativas” mais abrangente, sendo utilizando tanto para espécies radicalares quanto para aquelas não radicalares. De maneira mais detalhada, essas moléculas altamente reativas são chamadas de: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), quando da presença do oxigênio ou nitrogênio (DI MEO; VENDITTI, 2020).

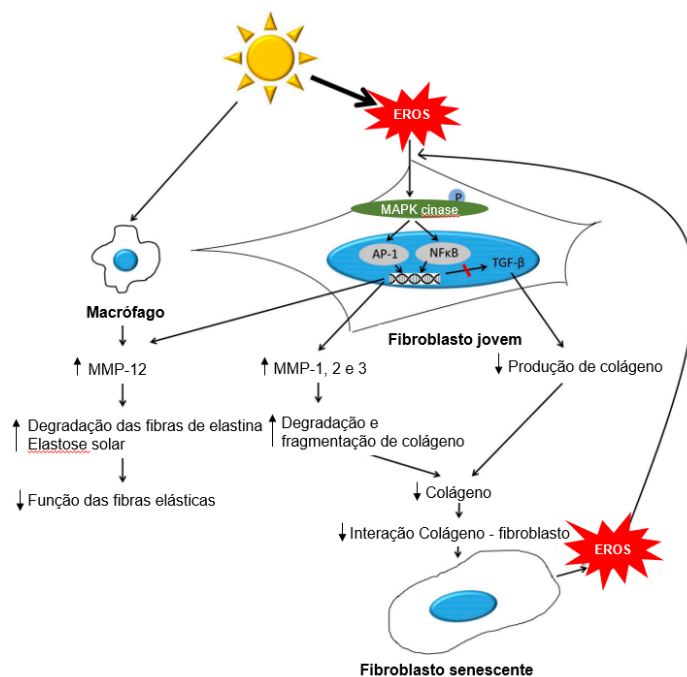
As principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em sistemas biológicos são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$), radicais peroxila ($ROO^{\cdot}$), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (JAMSHIDI-KIA et al., 2020). A presença dessas espécies reativas dentro do organismo é comum e fazem parte do metabolismo (ex.: cadeia transportadora de elétrons). De fato, elas estão envolvidas em diversos processos celulares, como por exemplo, em caso de infecções, a produção do NO por células do sistema imune é uma das formas de proteger o organismo contra determinados patógenos. O NO também é uma das principais formas de relaxamento de musculatura lisa dependente de endotélio e ele é necessário até mesmo como neurotransmissor (KHAZAN; HDAYATI, 2014). Outro exemplo é o $OH^{\cdot}$ que estimula a ativação da ciclase de guanilil para a formação de $GMPC$, um segundo mensageiro que desencadeia importantes vias de sinalização, etc (IFEANYI, 2018).

Assim, é possível entender que os radicais livres e espécies reativas tem sua importância no meio biológico. Todavia, quando existe um desbalanço entre a produção de espécies reativas e a capacidade do organismo de neutralizá-las, diversos problemas podem ocorrer. Esse excesso de EROs e/ou ENRs é mais comumente chamado de estresse oxidativo (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Ele está associado ao desenvolvimento ou agravamento de diversas patologias e síndromes, como a diabetes (AL-RIMAWI et al., 2020; CHEN et al., 2008; DIANO; HORVATH, 2010), doenças neurodegenerativas como Alzheimer (PEÑA-BAUTISTA et al., 2019), osteoartrite pós traumática (HINES et al., 2022), envelhecimento, câncer, entre outros. Isso acontece, porque devido à instabilidade química, as espécies reativas reagem com diversas estruturas biológicas, como lipídeos, proteínas, açúcares, DNA, etc (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Na pele, como já comentado, as duas maiores consequências do estresse oxidativo é o envelhecimento precoce e o câncer de pele. O acúmulo de espécies reativas induzidas por radiação UV, eventualmente, pode levar à produção de NO, inflamação da pele e formação de rugas. Um dos efeitos que leva a formação de rugas e ao envelhecimento é a ativação das vias de sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B), com sua consequente ativação e a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que culmina na ativação de proteína ativadora tipo 1 (AP-1). Como consequência, isso aumenta o nível de (fator de necrose tumoral alfa) TNF- α e a expressão de MMPs, que induzem a degradação da matriz extracelular (principalmente do colágeno) e envelhecimento cutâneo acelerado. Após sinais de indução de senescência, as enzimas serina-treonina quinase (ATM) e ATR serina-treonina quinase (ATR) bloqueiam a degradação autofágica dependente de p62 de GATA4, contribuindo para a ativação de NF- κ B e indução do fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (WANG et al., 2019), Figura 10.

Figura 10. Esquema de ações causadas pelas EROs induzidas por radiação UV na pele.



(Fonte: SHIN et al., 2019)

Dessa forma, a utilização de antioxidantes para combater o estresse oxidativo promovido pela radiação UV é de vital importância para prevenção de fotoenvelhecimento e câncer de pele. Os antioxidantes podem combater os radicais livres de diversas maneiras, entre elas, eles podem agir através da eliminação de EROs, suprimir o processo de oxidação e proteger o dano ao DNA (IFEANYI, 2018; JESUMANI et al., 2020). Para ser considerado um antioxidante, ele precisa ser um forte doador de elétrons, mas ao final do processo é desejável que ele seja regenerado ou substituído. Isso é possível devido as características específicas da sua estrutura química que apresenta duplas ligações conjugadas e ressonâncias, então mesmo oxidado, eles se mantêm estáveis e pouco reativos (LUSHCHAK, 2014; NIMSE; PAL, 2015).

Os antioxidantes podem ser classificados principalmente de três formas: de acordo com sua natureza (enzimático e não enzimático), de acordo com sua fonte (endógena, da dieta ou exógena e proteínas de ligação a metais) e de acordo com seu mecanismo de ação (JAMSHIDI-KIA et al., 2020), Quadro 1.

Quadro 1. Classificação dos antioxidantes de acordo com sua natureza, fonte e mecanismo de ação.

Classificação dos antioxidantes						
De acordo com a natureza			De acordo com a fonte			De acordo com o mecanismo de ação
Enzimático	Não enzimático		Endógenos	Da dieta	Proteínas de ligação a metais	
Superóxido dismutase (SOD)	Nutrientes	Metabólicos	Glutathiona (GSH)	Vitamina E e C	Albumina (cobre)	Sistemas catalíticos para neutralizar ou desviar EROs (ex: SOD, CAT, GPx)
						A ligação/inativação de íons metálicos impedem a produção de EROs (ex: ferritina e catequinas)
Glutathiona peroxidase (GPx)	Vitamina E e C	Glutathiona (GSH)	Ácido lipoico	Carotenoides	Ceruplasmina (Cobre)	Antioxidantes “auto-suicidas” e de quebra de cadeia que eliminam EROs (ex: Vit. C e E e flavonoides)
Catalase (CAT)	Carotenoides	Ácido lipoico	Ácido Úrico	Flavonoides	Ferritina (ferro)	Extinguindo EROs, servindo como armadilha química para absorver energia (ex: carotenoides e antocianidinas)
Glutathiona redutase (GR)	Flavonoides	L-arginina	Enzimas (SOD e CAT)	Ômega 3 e 6	Mioglobina (Ferro)	
	Ômega 3 e 6	Transferrina				

(Fonte: JAMSHIDI-KIA et al., 2020)

Os principais antioxidantes enzimáticos são a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase. Eles são a primeira linha de defesa contra espécies reativas e sua função é inibir o acúmulo delas, porém, quando eles não conseguem prevenir o acúmulo dessas espécies, é necessário lançar mão de antioxidantes exógenos para balancear a produção de radicais livres existentes (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Os antioxidantes exógenos são capazes de agir diretamente neutralizando radicais livres ou através da regeneração das defesas antioxidantes endógenas.

Muitos deles vêm da dieta, mas também podem ser usados topicamente, a exemplo disso, têm-se o ácido retinóico, que atua topicamente diminuindo os níveis de MMPs, aumenta a produção de colágeno, reorganiza as fibras de elastina, entre outras ações. O ácido ascórbico também é bastante utilizado topicamente e, seu mecanismo de ação tem por base a redução das espécies reativas de oxigênio, age como cofator para a produção de pro-colágeno e elastina e aumenta a espessura dérmica (SHIN et al., 2019). Diversos outros também são utilizados, como vitamina E, resveratrol, quercetina, ácido glicirrízico, etc (MCDANIEL; FARRIS; VALACCHI, 2018).

Outros compostos que podem agir como antioxidantes são os compostos fenólicos naturais, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos e, por isso, extratos com alto teor desses compostos podem ter boa ação antioxidante e merecem atenção (DUQUE; BRAVO; OSORIO, 2017; EL AANACHI et al., 2020; JESUMANI et al., 2020).

2.6. Compostos fenólicos

Os polifenóis são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos em plantas, já que são importantes para o desenvolvimento morfológico, processos fisiológicos, reprodução dos vegetais, bem como defesa contra patógenos, sendo identificados mais de 8 mil compostos. Biossinteticamente, eles são produzidos através da via chiquimato e dos fenilpropanoides, diferindo entre si por sua estrutura, comportamento químico e características físicoquímicas. Quimicamente, os compostos fenólicos são estruturas que apresentam pelo menos um anel aromático com hidroxilas ligadas diretamente a ele (ALMEIDA; DOS SANTOS; VENTURA, 2018; DZIAŁO et al., 2016).

Eles são conhecidos principalmente pelas várias atividades biológicas que apresentam, resultantes do padrão e grau de substituição de cada um. Várias classes de metabólitos secundários pertencem aos compostos fenólicos, são eles: flavonoides, estilbenos, taninos, cumarinas, lignanas e ácidos fenólicos, Figura 11 (ALMEIDA; DOS SANTOS; VENTURA, 2018; DZIAŁO et al., 2016; SIRACUSA; RUBERTO, 2019; VIDOVIĆ; MORINA; JOVANOVIĆ, 2017). Suas atividades biológicas são diversas, tais como: antimicrobianos, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, anticoagulantes, tratamento para doença de Alzheimer, contra doenças de pele, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, obesidade, antioxidante, fotoprotetora, entre outras (ALMEIDA; DOS SANTOS; VENTURA, 2018;

Figura 11. Tipos de metabólitos secundários caracterizados como polifenóis.

Assim, eles conseguem proteger a pele contra a radiação UV de forma direta e de forma indireta, que está atrelada a sua estrutura química e substituintes hidroxila. Como antioxidantes, existem diversas formas pelas quais eles podem agir, como: inibição da formação de (EROs) ou sequestro de radicais livres, (ex.: oxigênio singlete), redução de íons metálicos quelados (os quais funcionam como catalisadores das reações de formação de EROs), impedindo a cascata de peroxidação lipídica ocasionada pelos radicais livres (DZIAŁO et al., 2016), proteção dos antioxidantes lipídicos da superfície da pele, como alfa-tocoferol, coenzima Q10 e esqualeno (ação de resgate antioxidante), induzindo sistemas antioxidantes endógenos em queratinócitos e fibroblastos, entre outros (KOSTYUK et al., 2018).

Na pele, devido a essa agressão causada pela radiação UV, processos inflamatórios são desencadeados, consequentemente aumentando a produção de radicais livres. Assim, ao agir como antioxidantes, os compostos fenólicos, agem indiretamente, também como anti-inflamatórios. Além da ativação de AP-1 e NF- κ B, na inflamação, a via da fosfolipase A2 (PLA₂) também é ativada e, posteriormente, através da atuação das ciclooxygenases (COXs), mais substâncias pró inflamatórias são produzidas, como as prostaglandinas. Porém, os polifenóis parecem ser capazes de inibir as reações das duas enzimas, principalmente devido à interrupção da ligação do substrato à enzima pela ruptura do sistema de ligação de hidrogênio ou devido a íons de quelação no centro ativo da enzima (DZIAŁO et al., 2016).

Eles são capazes ainda de manter a homogeneidade da pele e uma aparência adequada e saudável devido à renovação eficaz das células cutâneas, estimulação de elastina e colágeno e inibição da síntese excessiva de melanina (DZIAŁO et al., 2016).

À exemplo de extratos vegetais com atividade fotoprotetora, temos o extrato de chá verde (*Camellia sinensis*), que é um dos mais estudados para esse fim. Esse extrato apresenta como principais compostos, as catequinas, a epigallocatequina (EGC), a epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG) e a epigallocatequina-3-galato (EGCG), que é o composto majoritário, correspondendo a cerca de 70% das catequinas presentes. Os estudos mostram que a EGCG como antioxidante é capaz de atuar como sequestradora de radicais livres e de inibir a fosforilação mediada por estresse oxidativo induzida por UVB do receptor do fator de crescimento epidérmico e das vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), bem

como inibir as atividades de ligação dos fatores de transcrição nuclear NF- κ B e AP-1, entre outras ações (HU et al., 2017).

Entretanto, o extrato de chá verde também atua como fotoprotetor diretamente, através do reparo dos danos causados ao DNA, já que ele impede a formação dos dímeros de pirimidina (HU et al., 2017; TORRES; LUK; LIM, 2020).

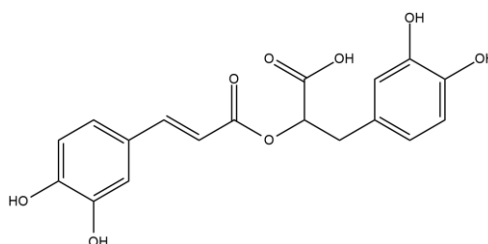
Outros extratos ricos em polifenóis também são estudados e demonstram seu potencial fotoprotetor, como por exemplo, do extrato *Polypodium leucotomos*, que foi o primeiro fotoprotetor oral já produzido. O extrato de Romã (*Punica granatum*), com os principais componentes sendo antocianinas, catequinas e taninos. O resveratrol através das sementes e casca de uva e vinho tinto, a curcumina, derivado de *Curcuma longa*, bem como o isoflavonoide silimarina derivado da espécie *Sylibum marianum*, todos com atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e fotoprotetora direta seja pela filtração de raios UV ou pela proteção ao DNA celular (KOSTYUK et al., 2018; TORRES; LUK; LIM, 2020).

Dessa forma, o estudo de extratos naturais ricos em polifenóis na área da fotoproteção se tornou tendência mundial e têm demonstrado resultados bastante relevantes.

2.7. Ácido Rosmarínico

O AR é um ácido fenólico proveniente da via dos fenilpropanoides, caracterizado por ser um éster derivado do ácido cafeico e do ácido 3,4-dihidroxifenilacético (AMOA et al., 2016), Figura 12. Ele está presente em diversas espécies vegetais, inclusive na família Lamiaceae, além de ser um dos compostos majoritários das espécies do gênero *Mentha* (PARK et al., 2019).

Figura 12. Estrutura química do ácido rosmarínico.



Esse composto bastante conhecido apresenta uma vasta literatura a seu respeito e sobre suas potenciais atividades biológicas, assim como também espécies

vegetais que apresentam o AR como marcador. Dessa forma testes clínicos feitos com as espécies *Echium amoenum*, *Vaccinium myrtillus*, *Origanum vulgare* e *Mentha spicata* demonstraram significativa atividade anti-inflamatória e antioxidante. Isto também é corroborado por testes clínicos, *in vitro* e *in vivo* com o AR isolado, que sugerem forte atividade anti-inflamatória e antioxidante, sendo capaz de atuar através da inibição das enzimas lipooxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX), inibir a fixação do complemento, atuar na via do TNF- α , entre outras ações (AMOA et al., 2016; LUO et al., 2020; SINGH et al., 2020). Além disso, estudos também sugerem a capacidade desse ácido fenólico agir como antiviral, antibiótico e antitumoral (CÂNDIDO et al., 2022).

Portanto, devido a essas características e atividades biológicas, o ácido rosmarínico têm-se demonstrado um composto promissor na área da fotoproteção. No estudo feito por CÂNDIDO et al., 2022, foi observado que a adição de AR, em uma formulação fotoprotetora feita com octil-*p*-metoxicinamato e em outra feita com bemotrizinol, provocou o aumento significativo tanto do FPS, quanto da atividade antioxidante *in vitro* das formulações. Em outro estudo, realizado por HUERTA-MADROÑAL et al., 2021, onde foi desenvolvido um polímero de quitosana com conjugado de ácido rosmarínico, observou-se que além da melhora nas atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória, também foi vista a atenuação significativa dos danos causados por radiação UVB e EROs em fibroblastos e queratinócitos.

Já em outro estudo, GALICKA; SUTKOWSKA-SKOLIMOWSKA, 2021, foi visto que o AR reduziu significativamente as alterações causadas pelo filtro solar químico benzofenona-3 que tem uma alta penetração cutânea. Além disso, estudos como o de PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2014 utilizando o suplemento (NutroxSun®) a base de extrato de *Rosmarinus officinalis* (rica em AR) e de *Citrus paradisi* também sugerem que mesmo a ingestão oral (250 mg por dia) desse tipo de suplemento, é capaz de promover efeito de proteção solar, principalmente através da redução da produção de radicais livres.

Dessa forma, o ácido rosmarínico apresenta grande potencial para sua utilização em formulações fotoprotetoras.

2.8. Fotoproteção e produtos naturais

A fotoproteção pode ser definida como um conjunto de medidas tomadas a fim de reduzir o tempo de exposição da pele à radiação ultravioleta. Essas medidas vão desde a procura por lugares com sombra para se proteger do sol, uso de roupas de proteção solar, óculos de sol até a utilização de protetores solares, que, já demonstraram ser capazes de prevenir o câncer de pele e lesões precursoras, quando usados corretamente (ALMUTAWA et al., 2013; FRIEDMAN; LIM; WANG, 2016; HIBLER; DUSZA; WANG, 2016; MURPHY; RALPH, 2016).

Os filtros solares são preparações tópicas que tem a função de proteger a pele contra os raios UV. Por isso é necessário que eles protejam de maneira uniforme a pele em toda a extensão da radiação ultravioleta (280 – 400 nm), propriedade conhecida como “homeostase espectral”, indicando que os raios UVA e UVB são atenuados de maneira uniforme (CATELAN et al., 2019; MANCEBO; HU; WANG, 2014; NASH; TANNER, 2016). Dessa forma, os filtros solares podem ser divididos em três categorias: filtros UVB, filtros UVA e filtros de amplo espectro (SHAATH, 2016).

Os filtros UVB são aqueles que absorvem a radiação UV na faixa entre 280-320 nm filtrando ou atenuando apenas os raios UVB. Os filtros UVA são aqueles que tem a capacidade de absorver a radiação UV na faixa de comprimento de onda de 320-400 nm, sendo capazes de proteger a pele contra apenas a radiação UVA. Já os filtros de amplo espectro são capazes de absorver a radiação UV por todo seu espectro, 280 – 400 nm, e dessa forma, proteger de maneira mais eficiente a pele (NUNES et al., 2018a; SHAATH, 2016; YEAGER; LIM, 2019).

Outra forma de classificar os filtros solares é de acordo com seu mecanismo de ação, então, eles podem ser filtros inorgânicos (físicos) ou orgânicos (químicos). Os filtros inorgânicos protegem a pele refletindo, dispersando ou até absorvendo os raios solares incidentes na pele, formando uma barreira física que não permite a passagem da radiação (porém, é importante ressaltar que isso não ocorre com 100% de eficácia). Já os filtros orgânicos atuam de forma a absorver os raios UV incidentes no lugar a pele, convertendo a energia absorvida em calor ou fosforescência e para comprimentos de onda maiores que 400 nm. O que acontece é que quando uma molécula absorve um fóton UV, os elétrons em seu orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) são promovidos ao seu orbital molecular desocupado mais baixo (LUMO) e eles quando voltam para o seu estado inicial, liberam a energia absorvida em forma

de calor, fosforescência ou sofrendo reações fotoquímicas (CATELAN et al., 2019; NASH; TANNER, 2016; NUNES et al., 2018a; SHAATH, 2016).

Enquanto que os filtros inorgânicos são representados apenas pelo óxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO₂), os filtros orgânicos são representados por uma gama de substâncias com capacidade de absorver a radiação UV. No Brasil, os filtros solares são considerados cosméticos e é permitida a utilização de 34 filtros, sendo 2 deles físicos (ZnO e TiO₂) e 32 químicos. A concentração máxima que pode ser utilizada em cada formulação vai depender de qual filtro em particular está sendo usado, mas, para filtros químicos, a maior porcentagem descrita na resolução é daqueles que podem ser usados até 15%, enquanto que os físicos podem ser utilizados até 25% (BRASIL, 2022). Ainda segundo a BRASIL, 2022, a proteção UVB é definida a partir da determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) que deve ser de no mínimo 6 (*in vivo*) e, a proteção UVA é dada pelo Fator de Proteção UVA (FPUVA), que deve ser de no mínimo um terço do FPS e pode ser determinado por diferentes metodologias, inclusive *in vitro*.

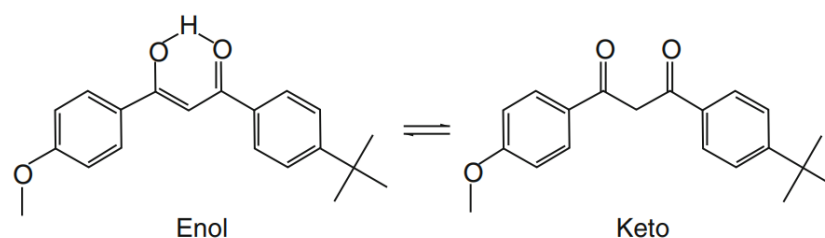
Atualmente, a maioria dos protetores solares aposta na utilização tanto de filtros orgânicos quanto inorgânicos para garantir uma maior eficiência na proteção da pele. Da parte dos filtros físicos, tanto o ZnO quanto o TiO₂ são bastante utilizados e dos filtros químicos, embora muitos sejam usados, uns dos mais comuns são o metoxicinamato de etilhexila, a avobenzona, homossalato, oxibenzona, octocrileno, derivados de cinamatos, entre outros (DALY; OUYANG; MAITRA, 2016; YAMADA; MOHAMMED; PROW, 2020).

O uso consistente de formulações fotoprotetoras pode retardar ou prevenir temporariamente o desenvolvimento de fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (YAMADA; MOHAMMED; PROW, 2020). Porém, mesmo com tantos filtros solares já no mercado, alguns problemas são encontrados na sua utilização. A Avobenzona, por exemplo, que é um filtro UVA bastante eficiente e muito utilizado hoje em dia, tem grandes problemas de fotoestabilidade (SHAATH, 2016).

Quando um filtro solar absorve a radiação UV incidente, reações fotoquímicas podem acontecer, comprometendo tanto os atributos físicos dos filtros UV (cor, aparência, etc.) quanto suas propriedades químicas levando a reações e subprodutos indesejáveis. É justamente isso que acontece com vários filtros químicos, que não possuem boa fotoestabilidade, como por exemplo, a avobenzona. Em sua forma enol,

ela exibe uma excelente absorção de UVA a 357 nm, mas em sua forma diketo, sua absorção é na região UVC e, portanto, é ineficaz como filtro UVA ou UVB, Figura 13 (SHAATH, 2016).

Figura 13. O tautomerismo enol-ceto da avobenzona.



(Fonte: SHAATH, 2016)

Outro problema existente é a possível penetração dos filtros solares na pele, chegando à corrente sistêmica e causando efeitos indesejados na própria pele ou em outros órgãos. Estudos mostram, por exemplo que, a benzofenona-3 (filtro UVB), é capaz de penetrar facilmente nas camadas cutâneas, atingir a circulação sistêmica e lá pode interagir com a albumina, deslocando fármacos ligados a ela e outras substâncias, como hormônios sexuais e tireoidianos, podendo levar a disfunções hormonais, bem como também é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (GHAZIPURA et al., 2017; KIM; CHOI, 2014; WNUK et al., 2022).

Problemas também foram reportados quanto aos filtros físicos devido ao tamanho de partícula, que por serem maiores, deixava a apresentação cosmética mais esbranquiçada, o que não o tornava adequado para os padrões estéticos dos usuários que queriam utilizar um protetor mais imperceptível. Dessa forma, a utilização das nanopartículas começou a ser feita no intuito de sanar esse problema, deixando o protetor mais transparente. Porém, com a diminuição do tamanho de partícula outros problemas começaram a aparecer, como a penetração do TiO_2 no estrato córneo podendo se acumular nesta camada, levando ao estresse oxidativo, bem como danos ao DNA (YAMADA; MOHAMMED; PROW, 2020).

Além disso, estudos também têm mostrado que alguns filtros solares, como a oxibenzona podem ser responsáveis pelo branqueamento de recifes de corais e outros (octocrileno, 4-metilbenzilideno camphor e metoxicinamato de etilhexila) também têm sido encontrados em peixes, podendo trazer problemas a cadeia

alimentar (SCHNEIDER; LIM, 2019). Estudos têm sugerido inclusive que o metoxicinamato de etilhexila pode causar danos aos animais marinhos de diferentes formas (SILVA et al., 2022).

Dentro desse contexto, a utilização de compostos naturais tem se mostrado de grande interesse na área da fotoproteção, por apresentar vantagens em relação aos filtros sintéticos, onde pode-se destacar sua atividade fotoprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, formadora de filme para evitar a perda de água trans epidérmica, incentivo a indústria da química verde, além da possibilidade de associação com filtros sintéticos, permitindo a diminuição da concentração deles nas formulações e melhoria da fotoestabilidade, o que acarreta uma maior segurança na utilização dos produtos (BESSADA, 2018; MOROCHO-JÁCOME et al., 2020; MOTA et al., 2019; SAEWAN; JIMTAISONG, 2015).

Além dos extratos de chá verde, romã e *Polypodium leucotomus* já citados anteriormente e muito estudados, outros trabalhos também mostram o potencial de vários outros extratos ricos em polifenóis. No estudo, *in vitro*, feito por NUNES et al., 2018b, as espécies *Lippia microphylla* e *Dimorphandra gardneriana* demonstram alto potencial antioxidante, com atividades comparáveis a da quercetina, bem como também apresentaram FPS igual a 26,82 e 20,12 respectivamente, sem a adição de filtros sintéticos, mostrando como produtos naturais podem ser multifuncionais.

Recentemente, polifenóis extraídos do café (*Coffea arabica*) foram avaliados e os resultados evidenciaram os efeitos anti rugas do ácido clorogênico, pirocatecol, e do ácido 3,4,5-tricaffeoil quínico contra células de fibroblasto de camundongo estimuladas por UV-B, através dos níveis de expressão de metaloproteinases de matriz (MMP-1, 3 e 9) e do pro-colágeno tipo 1. Nesse estudo, o ácido clorogênico foi capaz de suprimir de forma efetiva a expressão dos três tipos de metaloproteinases e aumentou a produção de procolágeno, diminuindo a inflamação, consequentemente o envelhecimento precoce, bem como a formação de rugas. Ele também apresentou bom FPS e efeito protetor de DNA *in vitro*, além de boa atividade antioxidante (BESSADA, 2018).

No estudo, *in vitro*, realizado por (MOTA et al., 2020), foi evidenciado que a associação entre o extrato de *Nephelium lappaceum* aumentou em 134% o FPS da formulação desenvolvida com 7,5% de filtro metoxicinamato de etilhexila, podendo levar redução de filtros sintéticos na formulação em até 64%, mantendo um FPS = 26,3, o que contribuiu para a redução da possível toxicidade atrelada ao

metoxicinamato de etilhexila, ao passo que também reduziu o custo da produção do protetor solar em 45%.

Outros estudos com extratos vegetais e polifenóis isolados de plantas podem ser observados na Quadro 2, corroborando com a tendência mundial de utilizar produtos naturais no desenvolvimento de protetores solares.

Quadro 2. Estudos da literatura sobre fotoproteção com produtos naturais.

Estudos de fotoproteção			
Planta	Constituinte	Atividade	Autores
<i>Olea europaea</i> (extrato das folhas)	Oleuropeína e outros polifenóis	FPS = 56, antioxidante, antimutagênico	DA SILVA et al., 2019
-	Catequina, quercetina, diosmetina, antocianidinas, daidzeína, genisteína	Antienvhecimento, antioxidante, atividade fotoprotetora, redução de melasma	ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012; SAEWAN; JIMTAISONG , 2015
<i>Angelica archangelica</i> (extrato da raiz)	Ácido clorogênico	Inibição da sinalização MAPK, inibição da ativação de AP-1, ativação de TGF- β , inibição de MMP-1 e 3	SUN et al., 2016
<i>Foeniculum vulgare</i> (extrato das sementes)	Ácido clorogênico, ácido ferúlico, rutina	Redução da produção de ROS, aumento da síntese de enzimas antioxidantes, modulação da resposta inflamatória,	SUN et al., 2016b

		proteção contra a degradação da MEC, aumento da produção de colágeno tipo I	
<i>Malaxis acuminata</i> (extrato das folhas)	Polifenóis	FPS = 27,64 Atividade anti-inflamatória e antienvelhecimento	BOSE et al., 2017
<i>Cocos nucifera</i> (extrato etanólico de fibra de casca de coco da variedade anã amarela)	Quercetina, catequina, epicatequina, ácidos vanílico, cafeico, 4-hidroxibenzóico e clorogênico	FPS = 15,94 e promissora atividade antiglicação,	OLIVEIRA et al., 2021

(Fonte: Gomes, 2022)

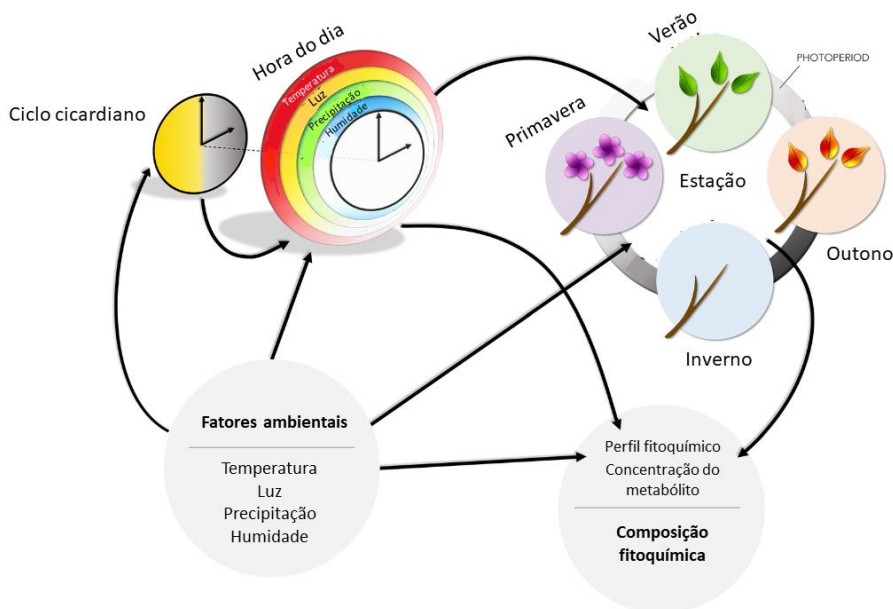
2.9. Sazonalidade

Vários fatores ambientais podem afetar as plantas, como o solo, poluição, luz, níveis de estresse hídrico, espécies vizinhas e predadores, condições ambientais e climáticas, bem como a sazonalidade, que em muitos casos pode influenciar diretamente na produção de metabólitos secundários do vegetal, a fim de produzir aqueles que podem proporcionar uma melhor adaptação ambiental para a espécie, Figura 14 (LIEBELT; JORDAN; DOHERTY, 2019; MILLER et al., 2019; MWAMATOPE et al., 2021).

Essa variação no conteúdo de compostos pode ser tanto no tipo de metabólito produzido quanto na sua concentração, o que pode afetar radicalmente a forma de interação vegetal – ambiente, podendo alterar a potência ou até a toxicidade da planta. Além disso, considerando plantas medicinais utilizadas na forma de chás, até o gosto pode sofrer alteração, devido às diferentes estações e seus fenômenos. Dessa forma, entender as alterações ocorridas diante de fatores como a sazonalidade pode

impactar diretamente no melhoramento e na produção agrícola de espécies de alto valor comercial (LIEBELT; JORDAN; DOHERTY, 2019).

Figura 14. Exemplos de fatores externos que influenciam a produção de metabólitos secundários pelas plantas.



(Fonte: LIEBELT; JORDAN; DOHERTY, 2019)

Uma classe de metabólitos secundários que é bastante afetada pelas variações sazonais no decorrer do ano, são os óleos essenciais, vários estudos mostram as alterações sofridas na composição de várias espécies devido à sazonalidade (DE MACÊDO et al., 2020; FERRAZ et al., 2018; KANDPAL; JOSHI; JOSHI, 2020). No estudo feito por RATHORE et al., 2022, foi observado que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* no Himalaia, tem um teor maior no outono, porém o óleo coletado na estação chuvosa apresentou o maior efeito antibacteriano contra *S. aureus*. Já no trabalho de ALSOHAILI, 2018, foi visto que a melhor época do ano para coletar o óleo essencial de *Achillea fragrantissima* é no final de junho, já que nesse período, o óleo apresenta sua maior atividade microbiana.

Embora a maioria dos óleos essenciais sejam sensíveis às mudanças sazonais, outros metabólitos que também sofrem alterações em sua produção qualiquantitativa são os compostos fenólicos, que podem ter seus conteúdos modificados por fatores externos como a composição do solo, métodos de cultivo, níveis hídricos à que são expostos, fertilização mineral e temperatura ambiente (NENADIS et al., 2015;

PASSARI et al., 2019). Além disso, considerando que os efeitos de filtragem da atmosfera mudam à medida que a posição do sol no céu muda ao longo do dia e do ano, alterando a intensidade total da luz, deve-se ficar atento também a radiação UV, já que ela pode levar ao aumento de radicais livres também nas plantas (GOMES et al., 2019).

Dentro desse contexto, muitos trabalhos vêm sendo realizados para entender melhor como as variações sazonais podem afetar a produção de polifenóis em cada espécie, já que essa resposta pode mudar dependendo do tipo de planta. No estudo de KUMARI et al., 2022, foi observado que os maiores teores de compostos fenólicos foram encontrados no verão, bem como as maiores atividades antioxidantes. Resultados do estudo de RIBEIRO et al., 2020 mostraram que os maiores teores de compostos fenólicos foram encontrados na estação seca, o que também influenciou na sua atividade antioxidante *in vitro*. Já no trabalho de (AOUSSAR et al., 2020), foi observado que o teor de polifenóis e melhores atividades antioxidantes encontradas foram no final do inverno e primavera.

Dessa forma, compreender a influência que as variações sazonais apresentam na produção de metabólitos secundários pode melhorar as estratégias de seleção e melhoramento de plantas, aumentando a consistência da produção industrial e pesquisa fitoquímica.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar as variações sazonais na concentração de compostos fenólicos ocorridas durante todo o ano, observando a influência da radiação solar e precipitação nas atividades fotoprotetoras e antioxidante de *Mentha x villosa*, bem como otimizar a extração de polifenóis para potencializar essas mesmas atividades.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico de acordo com a sazonalidade e no extrato otimizado
- Realizar planejamento fatorial para otimização da extração de compostos fenólicos e ácido rosmarínico
- Determinar perfil fitoquímico do extrato por CLAE-EMⁿ
- Determinar a atividade sequestradora de radicais DPPH e fator de proteção solar (FPS) de acordo com a sazonalidade e no extrato otimizado
- Determinar a atividade sequestradora de radicais ABTS do extrato otimizado
- Determinar o fator de proteção UVA (FPUVA) e comprimento de onda crítico do extrato otimizado
- Realizar análise componentes principais (PCA) dos resultados

Metodologia

4. Metodologia

- Métodos utilizados para o estudo sazonal de metabólitos secundários, atividade antioxidante e fotoprotetora da espécie *Mentha x villosa*

4.1. Coleta do material e obtenção do Extrato Etanólico Bruto de *Mentha x villosa* de janeiro a dezembro

500 g das partes aéreas de *Mentha x villosa* foram coletadas às 8h da manhã do dia 20 de todos os meses, de janeiro a dezembro de 2019. As coletas foram feitas no Horto do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, município de João Pessoa-PB. O registro da espécie encontra-se no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE sobre o nº 14.996. O material vegetal fresco foi triturado e posteriormente submetido à maceração com etanol a 95% por três dias consecutivos, sendo esse processo repetido por três vezes. Nessa etapa, foi utilizado 3,5 L de etanol em todas as macerações. Após extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador a temperatura de 40 °C obtendo-se os extratos etanólicos brutos (EEB). Após a evaporação do solvente foi calculada a quantidade de extrato obtida e elas podem ser observadas no Quadro 3.

Quadro 3. Relação da quantidade de extrato obtida em cada mês.

Mês	Quantidade (g)
Janeiro	11,34
Fevereiro	11,57
Março	11,84
Abril	12,74
Maio	11,54
Junho	1,67
Julho	14,05
Agosto	15,19
Setembro	12,58
Outubro	15,97
Novembro	15,57
Dezembro	12,59

4.2. Estudo de sazonalidade de *Mentha x villosa*

O estudo sazonal de *M. x villosa* buscou avaliar as variações químicas na composição das partes aéreas da espécie em estudo, para inferir as características temporais dos compostos fenólicos e do marcador químico, observando o comportamento do FPS e ação antioxidante, assim possibilitando a geração de informações necessárias para incremento do seu cultivo. Foram preparados extratos etanólicos brutos coletados em todos os meses do ano de modo que os teores de metabólitos secundários foram avaliados ao longo do ano de 2019 inteiro. Para a avaliação dos compostos fenólicos foram verificadas as oscilações de teor de fenólicos e flavonoides totais e do marcador ácido rosmarínico.

Para a quantificação do marcador foi utilizada a metodologia analítica desenvolvida e validada por GOMES, 2018 empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV-DAD. Além disso, foram avaliados os fatores de proteção solar e atividade antioxidante de cada extrato para se observar a influência dos compostos fenólicos e ácido rosmarínico nelas. Parâmetros como índice pluviométrico e radiação solar foram coletados no site do Instituto Nacional de Meteorologia (<https://portal.inmet.gov.br/>) para observar sua possível interferência na produção dos metabólitos secundários.

4.3. Quantificação do teor de AR nos extratos

A quantificação do AR foi feita através da construção de uma curva de calibração com padrão (96%, obtido da Sigma Aldrich) onde foram utilizadas concentrações de 5,6; 11,25; 22,5; 45 e 90 µg/mL. As amostras de cada mês foram preparadas em triplicata, na concentração de 1 mg/mL e injetadas no cromatógrafo líquido em sequência. As condições cromatográficas utilizadas podem ser observadas no Quadro 4.

Foi utilizado 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.

Quadro 4. Parâmetros cromatográficos utilizados para análise do extrato de *Mentha x villosa*.

Parâmetros	Condições
Fase móvel A Fase móvel B	Água acidificada com 0,1% de H ₃ PO ₄ Metanol
Gradiente	0 min – 38% de B 5 min – 42% de B 9 min – 42% de B 12 min – 45% de B 15 min – 50% de B 17 min – 45% de B 20 min – 38% de B 24 min – 38% de B
Fluxo	1 mL/min
Temperatura do forno	26 °C
Solução diluente	MeOH : água acidificada com 0,1% de H ₃ PO ₄ (50% : 50%)
Tempo de análise	24 min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	330 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm)

4.4. Determinação do teor de fenólicos totais

Para este ensaio (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), foram preparadas amostras em triplicata de 1 mg/mL e, no escuro, uma alíquota de 120 µL de cada amostra foi transferida para eppendorffs contendo 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu (10%), então após 8 min em repouso, adicionou-se 400 µL de solução de carbonato de sódio (7,5%) e a reação foi mantida em repouso por 120 min, à temperatura ambiente e no escuro. Enquanto isso, as amostras foram transferidas de eppendorffs para placas de 96 poços para leitura posterior a 765 nm em um espectrofotômetro UV-visível. O branco foi feito utilizando 120 µL de cada amostra e 900 µL de metanol.

O ácido gálico (AG) foi utilizado como padrão para a construção de uma curva de calibração, as concentrações utilizadas foram 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml. Os resultados foram expressos em mg EAG/g da amostra.

4.5. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonóides foi determinado pelo método espectrofotométrico (SCHMIDT; ORTEGA, 1999), utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) como reagente, pois ele forma um complexo na presença de flavonóides. Assim, 100 μL das amostras em triplicata na concentração de 1 mg/ml foram transferidos para placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado 100 μL de AlCl_3 . Após 30 minutos longe da luz, a absorbância foi medida em 410 nm, em espectrofotômetro UV-visível. O branco foi feito utilizando 100 μL de cada amostra e de metanol.

Para calcular o teor de flavonóides, uma calibração de curva padrão foi feita usando quercetina a 5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados foram expressos em mg de quercetina/g de amostra.

4.6. Determinação do fator de proteção solar (FPS)

O ensaio para a determinação do FPS foi realizado de acordo com o método espectrofotométrico descrito por MANSUR et al., 1986, que relaciona a absorção da amostra no ultravioleta entre 290-320 nm com a fórmula descrita por ele, Equação 1.

Equação 1. Fórmula do fator de proteção solar.

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

Para isso, as amostras foram incorporadas em creme Polawax® numa concentração de 5% e posteriormente, as preparações foram utilizadas para preparar uma concentração de 0,2 mg/ml em etanol PA, que também foi utilizado como padrão. Nessa concentração então, as amostras foram lidas nos comprimentos de onda de 290-320 nm, utilizando intervalo de 5 nm, em espectrofotômetro de ultravioleta, com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Ao final, os valores de absorbância obtidos foram usados para calcular o FPS segundo a fórmula já descrita.

É importante ressaltar que, o produto de $EE(\lambda).I(\lambda)$ já possui valores tabelados de 290 a 320 nm e estão apresentados no Quadro 5 abaixo:

Quadro 5. Ponderação empregada no cálculo de fator de proteção solar *in vitro*.

Comprimento de onda	$EE(\lambda).I(\lambda)$
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

(Fonte: SAYRE et al., 1979)

Para uma melhor compreensão dos resultados, foi feita uma escala de FPS para categorizar de forma mais didática o valor em cada extrato. Então nos gráficos de análise de componente principal e projeção linear, a cor verde representa extratos que apresentaram FPS entre 8 – 9,9, a cor azul representa extratos que apresentaram FPS entre 10 – 11,9 e a cor vermelha representa extratos que apresentaram FPS entre 12 – 13,9.

4.7. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos

4.7.1. Método de sequestro de radicais DPPH

A atividade sequestradora de DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por (GARCEZ et al., 2009), mas usando metanol como solvente. Então, primeiro, 5 concentrações (10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL) da amostra foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL, em seguida, 100 µL delas foram transferidas para placas de 96 poços e 100 µL de uma solução de DPPH 0,3 mM foi adicionada a todas as amostras. A reação foi mantida em repouso e ao abrigo da luz por 30 min e, em seguida, a leitura foi feita a 517 nm em um leitor de microplacas (H1M, BioTek®).

O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, ácido ascórbico (AA), utilizando 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5 µg/mL. Além disso, é necessário um controle negativo para o ensaio, que é composto por 100 µL de solução de DPPH e 100 µL de metanol. A atividade sequestradora (AS) de todas as amostras foi calculada pela seguinte Equação 2. De acordo com a atividade de eliminação para cada

concentração, as curvas de calibração de cada amostra foram calculadas e os resultados foram expressos como CE₅₀.

Equação 2. Fórmula da atividade de sequestradora.

$$AS (\%) = \left(\frac{ABS_{controle\ negativo} - ABS_{amostra}}{ABS_{controle\ negativo}} \right) \times 100$$

Onde,

AS = atividade sequestradora

ABS = absorbância

- **Métodos utilizados para otimização da extração de polifenóis e AR, bem como para avaliação da sua atividade antioxidante e fotoprotetora**

4.7.2. Coleta do material vegetal para a etapa de otimização do extrato

As folhas de *Mentha x villosa* Hudson (1 kg) foram coletadas às 8h do dia 7 de fevereiro de 2022, na Universidade Federal da Paraíba, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (coordenadas 7° 8' 29.875" S/34° 50' 48.757" W), Campus I, João Pessoa, PB. Um exemplar desta espécie foi depositado no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, sob o nº 14.996 e esta planta também foi registrada na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN) sob referência número A3BA60D. Logo após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante por 72h. Após determinação das condições ideais por meio de planejamento fatorial para a produção de um extrato de *M. x villosa* enriquecido em polifenóis, o material seco (125 g) foi submetido à extração por turbólise (2,5 L de etanol 70%) em 4 ciclos de 30 segundos, com 5 min de intervalo. Após o procedimento de extração, o solvente foi removido em rotaevaporador, obtendo-se 24,25 g de extrato otimizado de *M. x villosa* (MV-OE).

4.8. Otimização da extração de polifenóis em *M. x villosa*

Para produzir um extrato de *M. x villosa* enriquecido em polifenóis, um planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais foi usado para estudar a proporção da planta (2,5, 5 e 7,5 %, p/v) e a concentração de etanol (50, 70 e 90 %, v/v) influência na resposta selecionada, a fim de otimizar a extração dos polifenóis totais presentes nas espécies estudadas. Assim, foram utilizados dois níveis diferentes de variáveis independentes: concentração de etanol, superior (+1, correspondendo a 90%), inferior (-1, 50%) e o ponto central (0, 70%); proporção da planta (relação droga:solvente) nível superior (+1, 7,5%), inferior (-1, 2,5%) e o ponto central (0, 5%).

A extração foi realizada por turbólise, utilizando 4 ciclos de 30 segundos, com 5 min de intervalo (tempo total de 20 min). Após a turbólise, todos os extratos foram secos em rotaevaporador a 40 °C e foram avaliados o teor de polifenóis totais, teor de ácido rosmarínico (AR), eficiência extrativa (EE) e resíduo seco (RS).

4.8.1. Eficiência extrativa

Eficiência extrativa (EE) significa a capacidade do solvente de extrair polifenóis. Assim, o EE foi avaliado como resposta e calculado pela Equação 3.

Equação 3. Eficiência extrativa

$$EE = \frac{TFT}{RS}$$

Onde,

EE = eficiência extrativa

TPT = teor de polifenóis totais

RS = resíduo seco

4.8.2. Resíduo Seco

O resíduo seco (RS) foi determinado seguindo metodologia descrita na farmacopeia brasileira, 2019. Assim, amostras de 2 g de cada extração foram transferidas para cristalizadores e o solvente foi evaporado em banho-maria, em seguida, foram transferidos para uma incubadora a 100-105° C por três horas e posteriormente, seus pesos foram determinados.

4.8.3. Condições das análises por espectrometria de massas

O extrato de *Mentha x villosa* foi analisado por CLAE 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 (ESI). 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 MS³. Os parâmetros utilizados foram: capilar 4,5 kV, offset da placa final 500 V, gás nebulizador 35 psi, gás seco (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 (MSⁿ) reportados pela literatura e padrões internos.

Já para a análise de análise de componentes principais (PCA) realizada, o CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massa microOTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) contendo uma fonte de íons de eletrospray (ESI) para obter espectros de massa de alta resolução. O sistema foi operado nas mesmas condições acima, utilizando o mesmo sistema cromatográfico de análise em gradiente em 25 min.

4.8.4. Análise de componentes principais (PCA)

Para realizar a PCA, os arquivos espectrais (CL-EMAR) foram convertidos para o formato MzXML usando DataAnalysis 4.2 (Bruker). Os dados foram pré-processados (detecção de recursos, alinhamento de amostras e correspondência de pico) no XCMS online (31). Os valores integrais de cada característica (m/z) foram analisados em função do tempo de retenção. Depois disso, os arquivos foram convertidos para o formato csv. A análise de componentes principais (PCA) dos dados foi realizada no Unscrambler, versão 10.4 (CAMO Process AS, Noruega) e no Orange, 3.0. A normalização de área foi aplicada a cada amostra.

4.9. Quantificação de polifenóis totais

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito, agora utilizando uma curva do padrão ácido gálico (AG) construída com as concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml, devido aos teores terem sido maiores que os já observados. Os resultados também foram expressos como mg EAG/g.

4.10. Quantificação de AR

A quantificação do marcador foi feita realizada através do mesmo procedimento executado para as análises de sazonalidade, porém uma nova curva de calibração foi feita, devido aos teores terem sido maiores que os já observados. Dessa forma, a curva de calibração foi construída usando um padrão AR a 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL.

- **Avaliação das atividades antioxidantes e fotoprotetoras do extrato otimizado (MV-OE)**

Após a determinação das melhores condições de extração, a atividade antioxidante, baseada no sequestro de radicais DPPH e ABTS, bem como inibição da atividade da enzima tirosinase, além da atividade fotoprotetora do extrato foram realizadas.

4.11. Método de sequestro de radicais DPPH

O mesmo procedimento anteriormente descrito foi realizado para esta análise, utilizando agora as concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 µg/ml para construção da curva do extrato, enquanto que a curva do controle positivo, ácido ascórbico, foi realizada com as mesmas concentrações já descritas. Os resultados foram expressos como CE₅₀ em mg/L.

4.12. Método de sequestro de radicais ABTS

A descoloração de ABTS foi avaliada seguindo o protocolo descrito por MOREIRA, 2019. Primeiramente, soluções estoque de ABTS (7 mM) e persulfato de

amônio (APS) a 245 mM foram preparadas usando água ultrapura e, após isso, 5,05 µL de solução de APS foram adicionados a 500 µL de solução estoque de ABTS. Esta solução foi incubada durante a noite (12-16h) no escuro à temperatura ambiente, para que o radical ABTS pudesse ser criado. Em seguida, preparou-se uma solução de radical ABTS capaz de absorver 0,700 a 734 nm diluindo 10 µL de solução estoque de radical ABTS em 1 mL de água ultrapura. Em seguida, preparou-se uma solução estoque de controle positivo (trolox a 2 mM) e depois, várias soluções de trolox em concentrações de 12,5 a 400 µM foram feitas em sequência, a fim de obter uma curva de calibração. Da mesma forma, as soluções estoques das amostras foram feitas a 1 mg/ml e 5 soluções diluídas (100 a 500 µg/mL) foram feitas a partir dela. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

O ensaio foi realizado adicionando 10 µL de cada diluição de amostra em placa de 96 poços e 190 µL de solução diluída ABTS. O mesmo procedimento foi feito para o controle positivo e foi feito um controle negativo utilizando 190 µL de solução diluída de ABTS com 10 µL de água ultrapura. A placa foi incubada por 5 minutos, no escuro e, a absorbância foi lida a 734 nm em um leitor de microplacas (H1M, Biotek®). A descoloração (%) foi calculada pela Equação 4 e os resultados foram expressos como CE₅₀.

Equação 4. Fórmula de descoloração do radical ABTS.

$$\text{Descoloração (\%)} = \left(\frac{ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{amostra}}}{ABS_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Onde,

ABS = absorbância

4.13. Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS), fator de proteção UVA (UVA-PF) e comprimento de onda crítico

Formulações foram preparadas para avaliar o FPS *in vitro*, usando MV-OE e um filtro químico, etilhexilmetoxicinamato, (Quadro 6). Assim, o FPS das formulações foi determinado usando o Optometrics SPF-290S Analyzer (Optometrics Corporation, Essex, Reino Unido). 110 mg de cada amostra foram espalhados em uma fita Transpore® (50 cm²) (3M, MN, EUA), a fim de obter um filme de 2 mg/cm². As amostras foram submetidas a um simulador solar de arco de xenônio de 125 W CW,

que mediu sua transmitância (T) realizando 12 varreduras em diferentes pontos de cada formulação na fita Transpore®. A medição da transmitância (T) foi feita de 290 a 400 nm com um intervalo de 2 nm. O valor do fator de proteção monocromático foi calculado para os comprimentos de onda selecionados usando a Equação 5, FPS, UVA-PF e comprimento de onda crítico (λ_c) foram calculados pelas Equação 6, Equação 7, Equação 8, respectivamente. Amostras com comprimento de onda crítico (λ_c) superior a 370 nm foram consideradas com proteção de amplo espectro (Quadro 7).

Quadro 6. Composição das formulações preparadas.

Formulações	Ingredientes	Composição quantitativa (% p/p)
1	MV-OE Creme polawax®	5% q.s.p
2	MV-OE Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	5% 1% q.s.p
3	MV-OE Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	5% 3% 92%
4	MV-OE Creme polawax®	10% q.s.p
5	MV-OE Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	10% 1% q.s.p
6	MV-OE Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	10% 3% q.s.p
7	Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	1% q.s.p
8	Metoxicinnamato de etilhexila Creme polawax®	3% q.s.p

Equação 5. Cálculo do fator de proteção monocromático.

$$FPM = \frac{1}{T}$$

Equação 6. Cálculo do FPS.

$$FPS = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda \cdot B\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda \cdot B\lambda}{MPF\lambda}}$$

Equação 7. Cálculo do PFUVA.

$$FPUVA = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda \cdot P\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda \cdot P\lambda}{MPF\lambda}}$$

Equação 8. Cálculo do comprimento de onda crítico.

$$R = \frac{\int_{290\text{ nm}}^{\lambda} A\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A\lambda \cdot d\lambda}$$

Onde, E = Irradiância espectral da luz solar terrestre (sob condições controladas), B = Eficácia do eritema, MPF = Fator de proteção monocromático e P = Espectro de ação do escurecimento do pigmento persistente (PPD), A = absorvância (35).

Quadro 7. Intervalo de comprimento de onda crítico e sua relação com o nível de proteção e relação UVA/UVB.

λ_c	Nível de proteção (razão UVA/UVB)
$340\text{ nm} \leq \lambda < 370\text{ nm}$	Intermediária
$\lambda_c > 370\text{ nm}$	Ampla espectro

4.14. Análise estatística

Os dados foram obtidos em triplicata, calculando-se a média, desvio padrão e desvio 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 foi realizado, utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. As curvas de calibração e os coeficientes de correlação (r) foram obtidos e calculados por regressão linear usando o Excel® 2019.

Para otimização da extração de polifenóis foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais e, os cálculos, bem como os gráficos de paretos, em duas dimensões e de superfície resposta foram feitos utilizando o software *Statistica* 3.0.

Resultados

Artigo 1 publicado na revista *pharmaceutics*

“Sesonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species”

Article

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

¹ Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, PB, Brazil,

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

¹ Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, PB, Brazil, marcelosobral.ufpb@gmail.com

¹ Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, PB, Brazil, josean@lft.ufpb.br

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

Received: date; Accepted: date; Published: date

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. villosa*; *P. amboinicus*; Radiação ultravioleta; PCA; sazonalidade

1. Introduction

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 antimicrobiana [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 distúrbios 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 distúrbios gastrointestinais e respiratórios, 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 devido a 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, cirsimaritina, 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 metabólitos 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. Materials and Methods

2.1. Material Vegetal

As partes aéreas de *Mentha x villosa* Hudson, 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, João Pessoa-PB. Um espécime de *M. villosa* está depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, sob número de identificação nº 14,996. Essa planta está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número de referência A3BA60D.

2.2. Preparação do extrato etanólico bruto

As partes aéreas frescas (500 g) de *M. villosa* foram trituradas e submetidas à maceração em etanol 96% por três dias consecutivos, repetido três vezes. Foram utilizados 4 l de etanol no processo de maceração de *M. villosa* e após, as soluções extraídas foram concentradas em rotaevaporador a 40 °C para obtenção dos extratos etanólicos brutos (CEE), que pesaram em média 11,5 g. O processo de maceração foi repetido todos os meses de 2019 logo após a coleta das partes aéreas, resultando em 12 extratos etanólicos de *M. x villosa*. Todos esses extratos foram usados em todos os testes realizados.

2.3. Equipamentos e reagentes

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), FolinCiocalteu, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), 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 CLAE

O método utilizado para quantificação de AR em *M. villosa* inicia-se com 38% do solvente B, chegando a 42% em 5 min e permanece nessa concentração até 9 min. De 9 a 12 min, o gradiente é alterado de 42 a 45% do solvente B e, chega a 50% em 15 min. De 15 a 17 min, o gradiente retorna a 45%, e permanece inalterado até 20 min, quando retorna à condição inicial a 38% da fase móvel B, e a corrida para em 24 min nesta concentração. A vazão utilizada foi de 1 mL/min, temperatura do forno de 26 °C, volume de injeção de 20 µL, a detecção foi realizada em 330 nm por um arranjo de diodos UV (DAD). Além disso, amostras de extrato e padrão foram feitas em triplicata e filtradas com a solução diluente na concentração de 50% : 50% MeOH : água acidificada (0,1% de H₃PO₄).

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 FolinCiocalteu (10%) a 120 µL 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 µL 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 UVvisível (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 µg/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 *M. villosa*. As amostras de cada mês foram preparadas em triplicata, na concentração de 1 mg/ml e injetadas no CLAE de acordo com o método analítico adequado já mencionado.

2.8. Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides foi avaliado pelo método espectrofotométrico proposto por Schmidt e Ortega [43], com adaptações, utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) como reagente. Dessa forma, 0,1 ml da solução de AlCl₃ (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 1. Após o cálculo da AS, curvas de calibração foram feitas e os resultados foram expressões como CE₅₀.

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

Equação 1. Formula 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 2.

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

Equação 2. Formula do FPS.

Onde,

FC = 10 (fator de correção)

EE(λ) = Efeito eritematogênico

I(λ) = intensidade do sol

ABS(λ) = absorbância

2.11. Análises estatísticas

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 statistic 3.4.

3. Resultados

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

Na análise sazonal do teor de polifenóis em *M. villosa* foi identificado o melhor mês de coleta de *M. villosa* em relação à esses compostos, sendo ele, setembro (147 mg GAE/g de extrato bruto), Figura 15 Porém foi possível observar também que não houve diferença estatística no teor de polifenóis totais em vários meses de diferentes estações do ano em *M. villosa*, mostrando que sua produção não obedece a uma tendência específica para cada estação, por exemplo, janeiro, que pertence à temporada de verão, não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado à abril (outono), agosto (inverno) ou outubro (primavera). Assim, esses resultados somados ao fato de não haver estações bem definidas na região onde as plantas foram coletadas, justificado pela localização geográfica próxima à linha do equador, as estações parecem ter menor influência na variação da concentração desses metabólitos. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Woźniak et al. [47], onde as concentrações da maioria dos polifenóis permaneceram constantes durante as diferentes estações do ano, mostrando que não influenciaram na variação desses metabólitos.

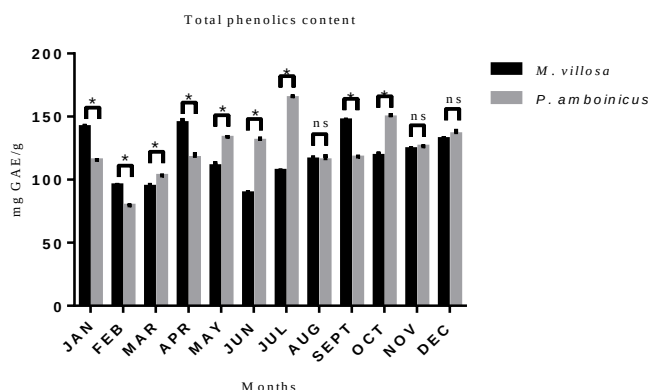


Figura 15. Teor de polifenóis de *M. villosa* e *P. amboinicus* ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. ns = não significativo. * diferença estatística.

Nas análises feitas para a avaliação do teor de flavonoides totais foi observado que o melhor mês de coleta é abril (28,72 mg querc/g de extrato), visando a coleta da planta para a obtenção do maior teor de flavonoides, Figura 16.

Da mesma forma como observado para o teor de polifenóis, foi visto que não existe diferença estatística no teor de flavonoides em vários meses de diferentes estações do ano, indicando que essa produção não obedece uma tendência específica para cada estação, o que mostra que as estações parecem ter pouca influencia na variação de produção quantitativa de flavonoides.

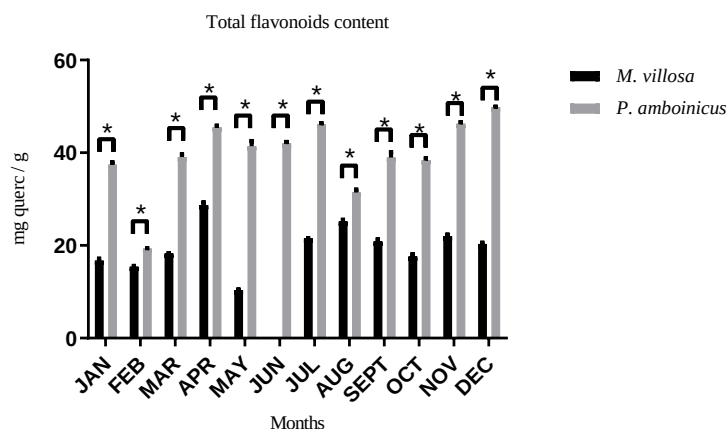


Figura 16. Teor de flavonóides de *M. villosa* e *P. amboinicus* ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. *diferença estatística.

De acordo com um estudo anterior de Terto et al. [40] e dados ainda não publicados [41], verificou-se que o AR foi o composto mais produzido no EEB das partes aéreas de *M. villosa* e, por isso, sua variação também foi avaliada. Assim, observou-se que o melhor mês para coleta de *M. villosa* foi setembro (39,28 mg/g).

Além disso, como observado tanto para o teor de fenólicos como para o teor de flavonoids, não foram encontradas diferenças estatísticas no teor de AR em meses de diferentes estações do ano, indicando que as estações têm pouca influência na variação do teor de AR, Figura 17. Dessa forma, de acordo com os resultados encontrados, é possível observar que outros fatores podem ter uma influência maior na produção de fenólicos totais, flavoides e ácido rosmarínico, e é possível concluir também que o melhor mês para a coleta de *M. villosa* é setembro.

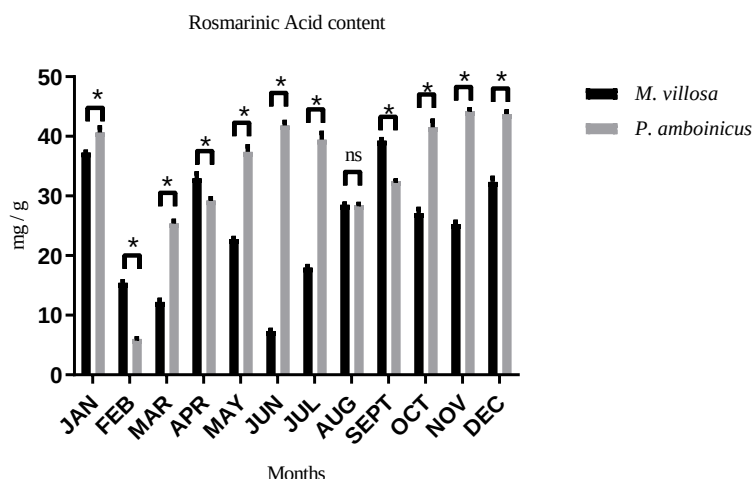


Figura 17. Teor de AR dos extratos de *M. villosa* e *P. amboinicus* ao longo de 12 meses e suas diferenças estatísticas. ns = não significativo. *diferença estatística.

3.2. Efeitos da sazonalidade na atividade antioxidante

As atividades antioxidantes das amostras foram avaliadas pelo teste DPPH e os resultados foram expressos como CE₅₀. Dessa forma, a partir da Figura 18, é possível observar que o mês em que o extrato de *M. villosa* apresentou melhor ação contra radicais DPPH é dezembro (75,09 µg/mL). Outros resultados podem ser encontrados no material suplementar.

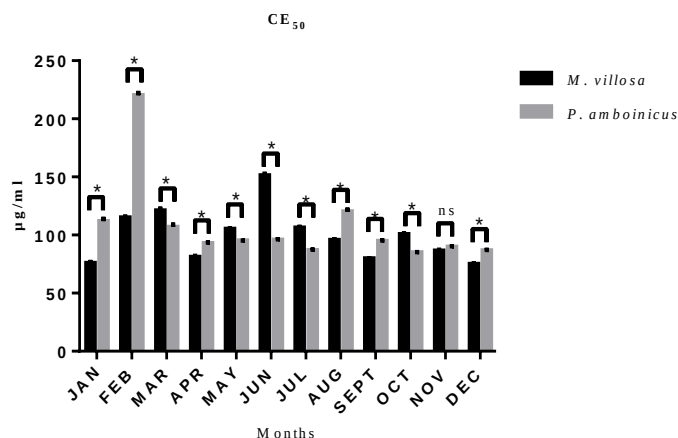


Figura 18. CEE de *M. villosa* e *P. amboinicus* CE₅₀ em µg/mL e sua comparação estatística ao longo de 12 meses. ns = não significativo. * diferença estatística.

3.3. Efeitos da sazonalidade no FPS

A partir da Figura 19, foi possível avaliar as variações mensais ocorridas no FPS, demonstrando que o melhor mês para a coleta de *M. villosa* visando maiores valores de FPS é setembro (FPS = 13,73).

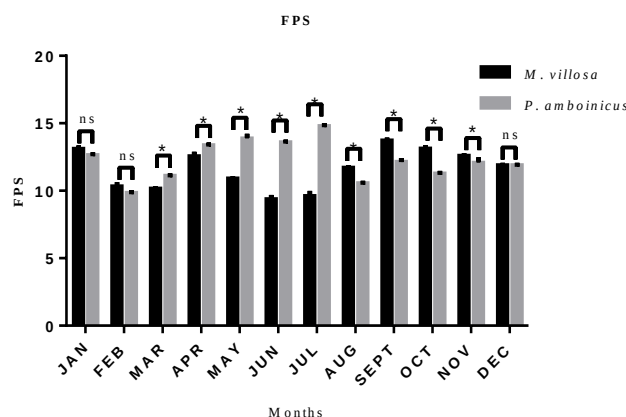


Figura 19. FPS de CEE de *M. villosa* e *P. amboinicus* e sua comparação estatística ao longo de 12 meses. ns = não significativo. * diferença estatística.

Quando se considera que neste teste foram utilizados apenas extratos vegetais da espécie estudada incorporada a 10% no creme Polawax®, é possível sugerir que esses resultados são promissores na área de fotoproteção, pois atingir níveis de FPS próximos a 15 sem adição de qualquer filtro solar sintético não é fácil, como mostra o estudo de Oliveira et al. [48], que avaliaram o FPS de extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e nenhuma formulação composta apenas por extrato como fotoprotetor, apresentaram FPS acima de 5,08. Em outro estudo realizado por Mota et al. [49], foi avaliado o FPS do extrato etanólico de *Psidium guajava* e encontrando FPS = 1. Da mesma forma, Mota et al. [50] avaliaram o FPS do extrato etanólico de *Nephelium lappaceum* L. (cascas) e seu FPS = 0,4.

Assim, *M. villosa* apresentou valores significativos de FPS ao longo do ano, superiores ao exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Resolução da Diretoria Colegiada de 30 de junho (2012) [51], que determina que somente formulações fotoprotetoras com FPS ≥ 6 são válidas.

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 observar diversas correlações entre a concentração de AR, teor de fenólicos e flavonóides totais, FPS e EC_{50} , bem como a relação dessas variáveis com o índice pluviométrico e a radiação solar durante o ano.

Conforme mostrado na Figura 20, a correlação entre PC4 x PC1 da PCA explicou 82% dos grupos existentes. Para melhor compreensão dos resultados, os valores do FPS foram categorizados por meio de cores para diferenciar o valor desse parâmetro em cada espécie. Nesta figura, é possível observar que as amostras que apresentaram os maiores valores de FPS foram agrupadas mais à esquerda em verde, além disso, é possível observar que algo além do FPS influencia nestes grupos e é o conteúdo fenólico.

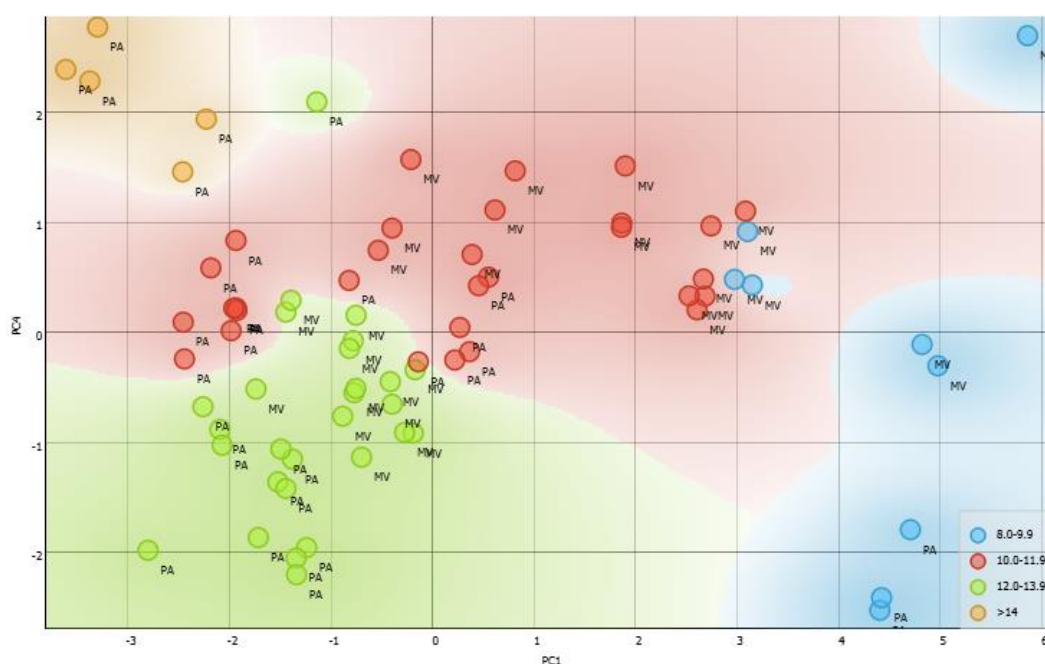


Figura 20. Análise de componentes principais mostrando a correlação dos grupos de PC4 versus PC1 usando dados obtidos da análise do teor de fenólicos e flavonóides totais, teor de RA, CE_{50} , FPS, incidência de radiação solar e nível de precipitação.

De acordo com a projeção linear em quatro eixos representada na Figura 21, é possível observar círculos azuis, representando as amostras de *M. villosa* (MV) ao longo do ano. Círculos maiores e menores representam valores de FPS mais altos ou mais baixos. Assim, vê-se que quanto maior a quantidade de fenólicos e flavonóides, maior o diâmetro dos círculos azuis e, consequentemente, maior o FPS dos extratos de *M. villosa*. Observa-se também que a presença de AR favorece uma CE_{50} menor, indicando melhor atividade antioxidante, quando AR está presente.

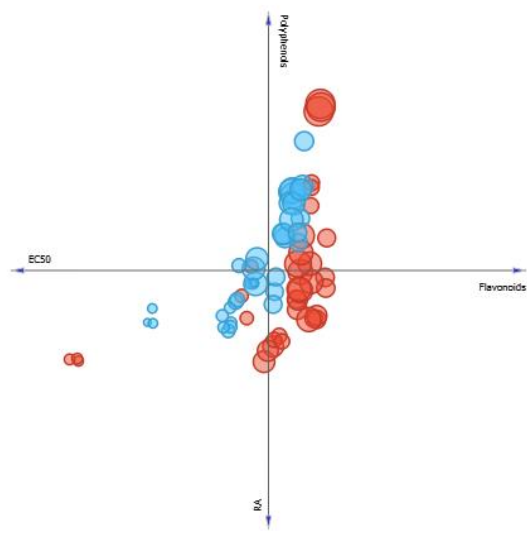


Figura 21. Projeção linear em quatro eixos correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides, ácido rosmarínico, CE_{50} de *M. villosa* (círculos azuis) e *P. amboinicus* (círculos vermelhos). O tamanho dos círculos corresponde a um valor de FPS maior ou menor encontrado.

Outro parâmetro observado foi a influência da radiação solar na concentração dos metabólitos secundários estudados e suas consequências para o FPS. Assim, avaliando a projeção linear apresentada na Figura 22, verifica-se que a radiação solar tem grande influência no aumento ou diminuição do FPS em *M. villosa*. Nos meses em que tanto a radiação solar quanto a produção de polifenóis são maiores, o FPS dos extratos de *M. villosa* aumenta. No entanto, nos meses em que a produção de flavonóides e AR é alta, mas o nível de radiação solar é menor, o FPS também é menor, sugerindo que a produção de componentes específicos com propriedades fotoprotetoras é estimulada pela radiação solar.

Esses resultados são corroborados por Dolzhenko et al. [52], que avaliaram a influencia da radiação UVB na produção de polifenóis em *Mentha x piperita* L. Nesse estudo, foi visto que o teor de polifenóis aumentou depois que a planta foi irradiada com radiação UVB e que a produção de flavonoides com propriedades absorvedoras de luz na faixa de comprimento de onda dos raios UVB foi estimulada, como eriocitrina, hesperidina e campferol-7-*O*-rutinosideo. Houve também a diminuição na produção de narirutin e 4'-metoxicampferol-7-*O*-rutinosideo, sugerindo a possível transformação desses últimos compostos mencionados nos flavonoides com produção aumentada. O mesmo estudo também mostrou que existe uma diminuição na produção dos óleos essenciais de *M. piperita* e um aumento na produção de polifenóis e sugere uma correlação entre esses resultados, mostrando que a radiação UVB pode favorecer um caminho biosintético em detrimento de outro.

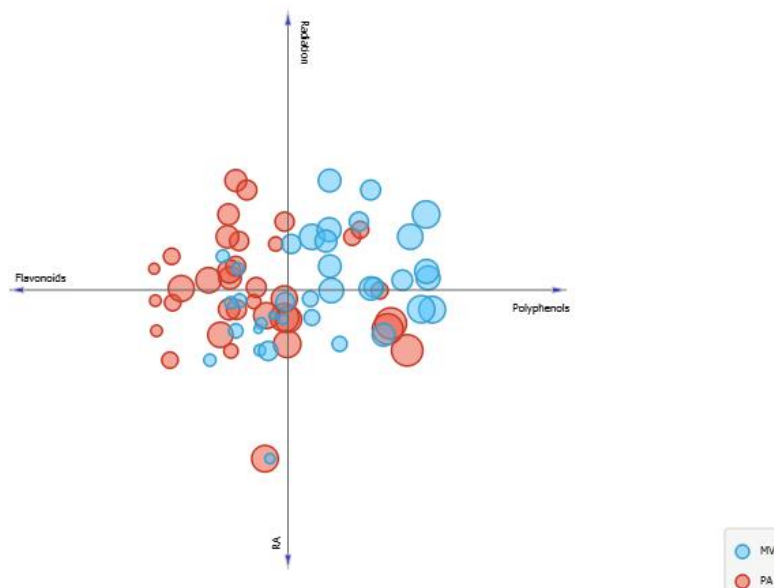


Figura 22. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de *M. villosa* (círculos azuis) e *P. amboinicus* (círculos vermelhos) à radiação solar. O tamanho dos círculos corresponde a um valor SPF maior ou menor encontrado.

De acordo com a Figura 23, foi possível observar que a radiação solar também é um fator importante para atividade antioxidante de *M. villosa*, já que é mostrado que quando os níveis de radiação solar são altos, a CE_{50} (representada pelo tamanho dos círculos das amostras) diminui, o que significa uma melhor atividade antioxidante. Esse resultado corrobora com os trabalhos de Takshak et al. [53] e Takshak et al. [54] que mostraram um aumento da atividade antioxidante dos extratos de *Coleus forskohlii* quando suplementados por radiação UVB.

Além disso, também é importante destacar que como visto na revisão feita por Gobbo-neto e Lopes [8], certos polifenóis podem ter sua produção aumentada, como no caso de *Marchantia polymorpha* em que a proporção de glicosídeos de luteolina/glicosídeos de apigenina aumenta pela influência da exposição à radiação UVB. Nesta situação, embora a capacidade de absorção dos raios UVB não aumente, pois os derivados luteolínicos são mais eficientes na dispersão da energia observada, é provocado um aumento dos níveis de antioxidantes de defesa na planta. A mesma observação foi feita na relação flavonóides/hidroxicinamatos, sendo o aumento dessa proporção foi observado pela indução da radiação UVB. Assim, percebe-se que a capacidade de atuar como antioxidante e não apenas como absorvedor da radiação UVB é importante definir quais metabólitos serão produzidos para atuar contra os raios UVB.

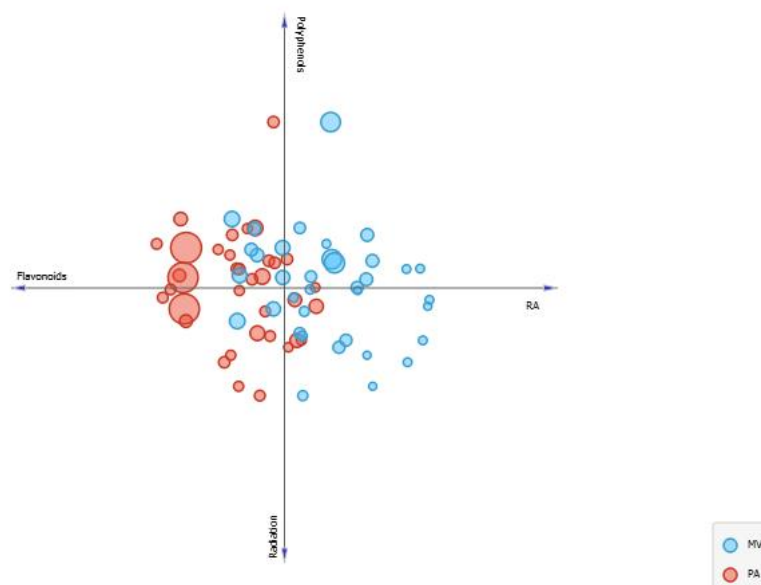


Figura 23. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de *M. villosa* (círculos azuis) e *P. amboinicus* (círculos vermelhos) à radiação solar. O tamanho dos círculos corresponde a um valor CE_{50} maior ou menor encontrado.

No caso dos níveis de precipitação, foi visto que, no geral, ele não favorece nem o aumento de FPS, nem de atividade antioxidante, já que quanto menor os níveis de precipitação, mas alto o FPS e a atividade antioxidante dos extratos, Figura 24 e Figura 25.

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 de *M. villosa* quando exposta à essas condições.

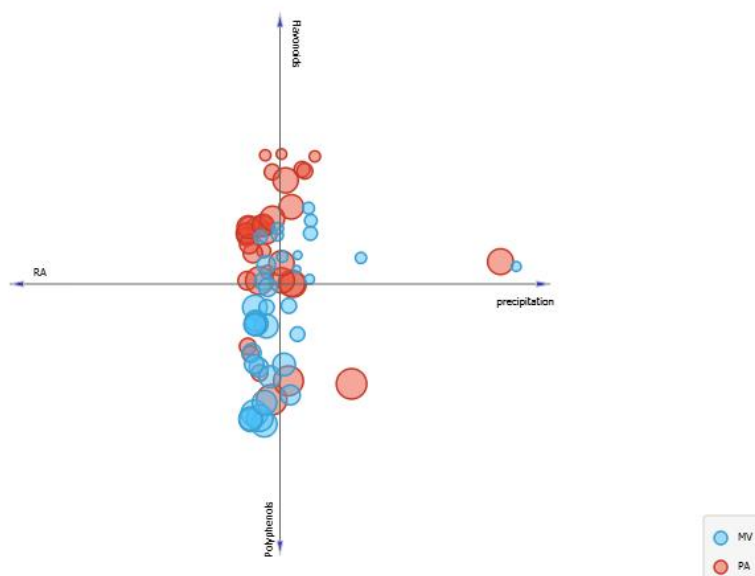


Figura 24. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de *M. villosa* (círculos azuis) e *P. amboinicus* (círculos vermelhos) à precipitação. O tamanho dos círculos corresponde a um valor FPS maior ou menor encontrado.

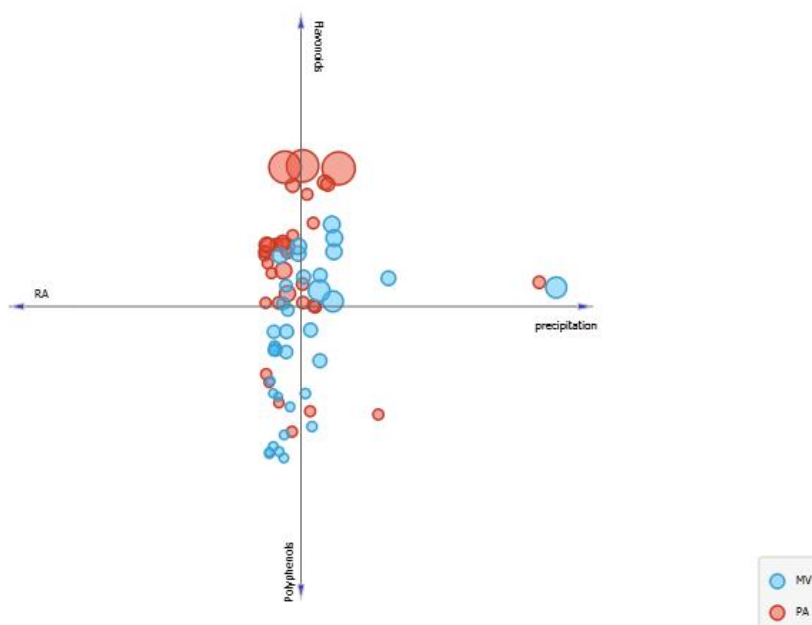


Figura 25. Projeção linear correlacionando o conteúdo de fenólicos, flavonóides e ácido rosmarínico de *M. villosa* (círculos azuis) e *P. amboinicus* (círculos vermelhos) à precipitação. O tamanho dos círculos corresponde a um valor CE50 maior ou menor encontrado.

4. Conclusões

De acordo com todos os resultados obtidos, foi possível concluir que, em geral, a sazonalidade não afetou diretamente a produção quantitativa de polifenóis, flavonóides e AR em *M. villosa*. O melhor mês para colheita da espécie foi setembro. Pode-se concluir também que maiores concentrações de polifenóis e flavonoides favorecem o aumento do FPS em *M. villosa* e a concentração de AR influencia a atividade antioxidante desta espécie. Além disso, observou-se que a radiação solar tem uma influência mais clara na produção de compostos fenólicos e no aumento do FPS em *M. villosa*, bem como também favorece a melhora da atividade antioxidante. No caso da precipitação, ela não parece favorecer a atividade fotoprotetora ou antioxidante de *M. villosa*.

Material suplementar:

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

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	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 S5. Results of total phenolic content month by month mg GAE/ g, *Mentha x villosa*.

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	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 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 S7. EC₅₀ results month by month in µg/ml, *Mentha x villosa*.

	Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	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 S9. Radiation data used (kJ/m²).

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

Table S10. Precipitation levels used (mm³).

Months	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	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

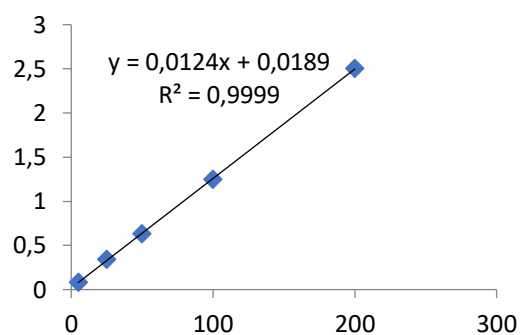


Figure S1. Calibration curve of Quercetin.

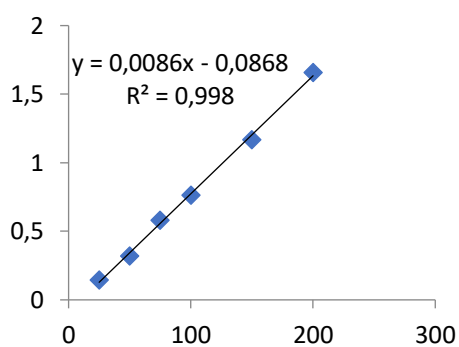


Figure S2. Calibration curve of Gallic acid standard.

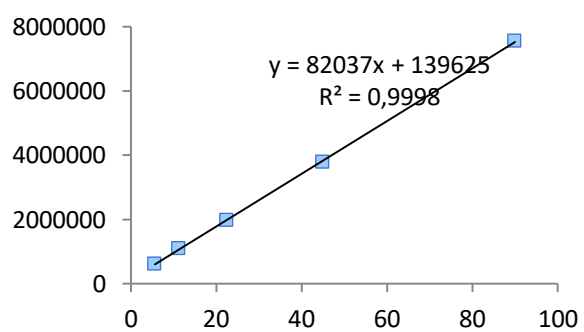


Figure S3. Rosmarinic acid standard linear regression for its quantification in *M. x villosa* and *P. amboinicus*.

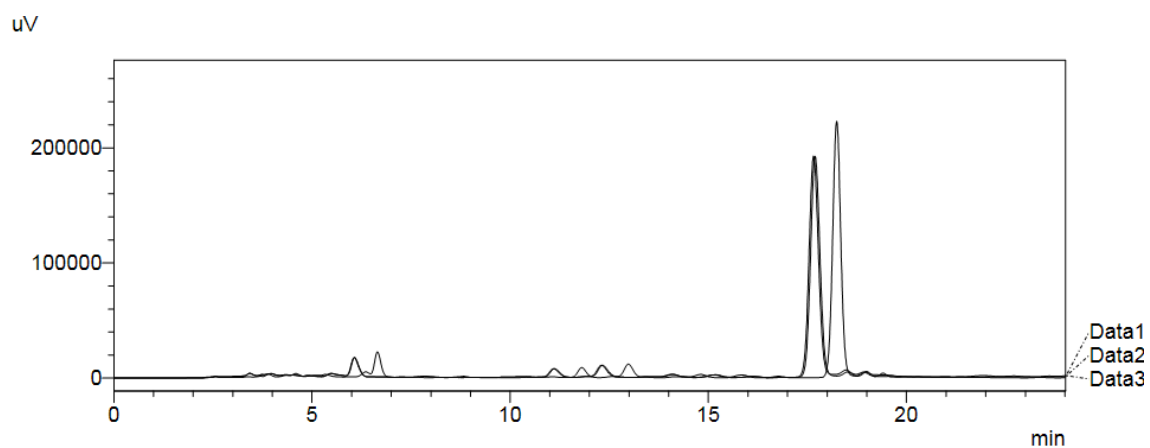


Figure S4. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 18.24; 17.65; 17.69 min) for its quantification in January, *Mentha x villosa*.

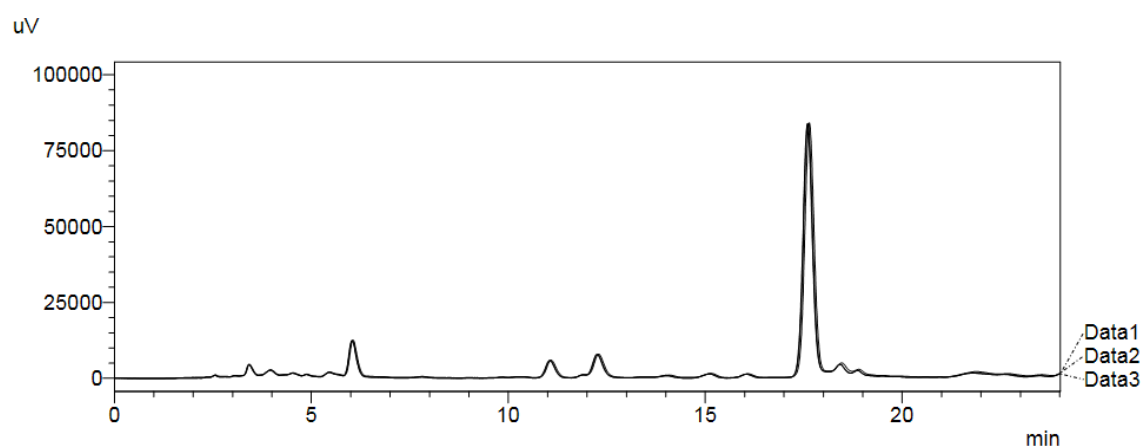


Figure S5. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in February, *Mentha x villosa*.

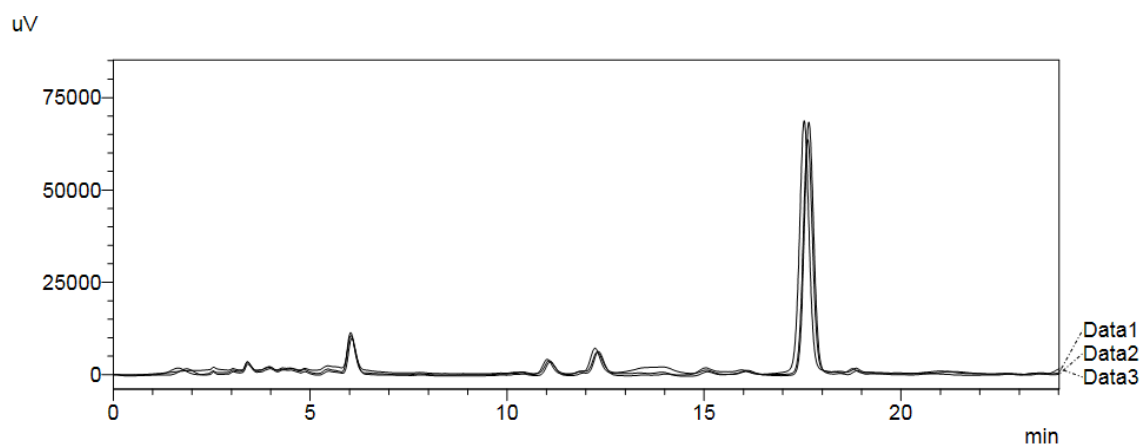


Figure S6. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in March, *Mentha x villosa*.

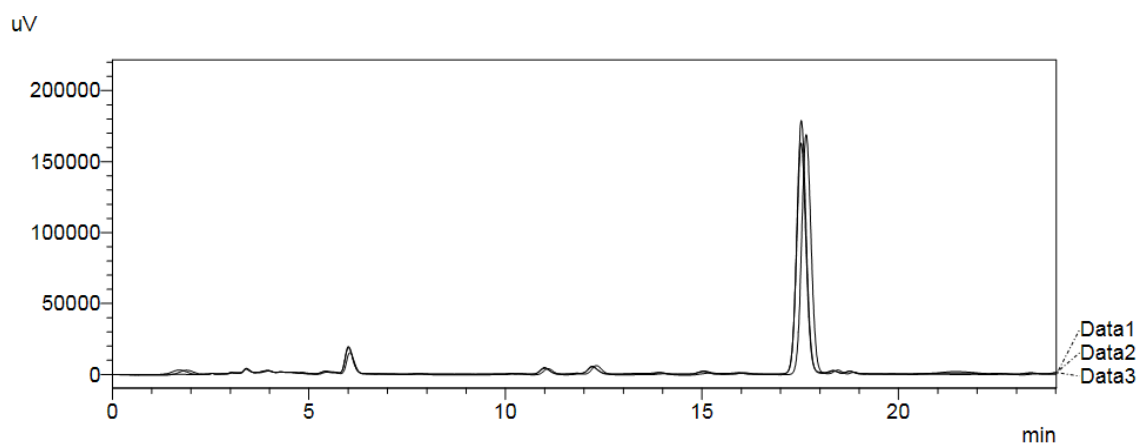


Figure S7. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 17.65; 17.53; 17.52 min) for its quantification in April, *Mentha x villosa*.

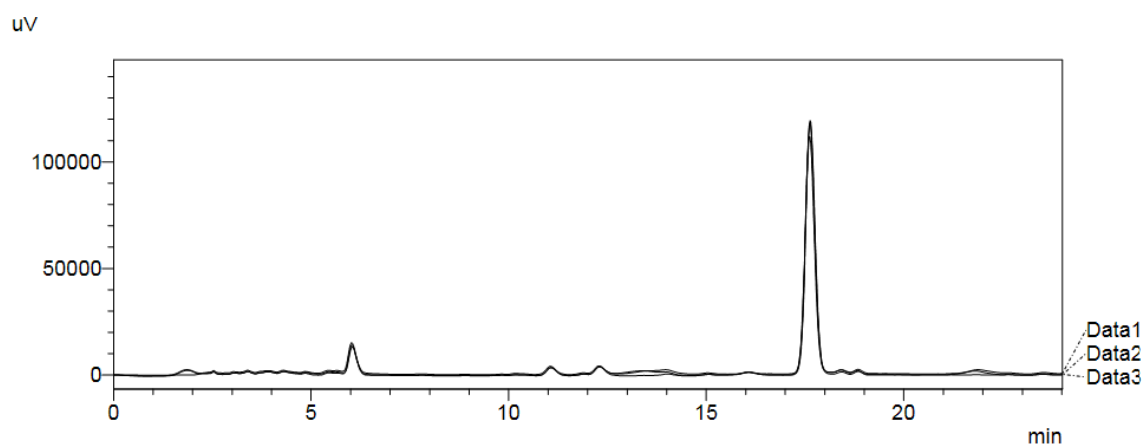


Figure S8. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in May, *Mentha x villosa*.

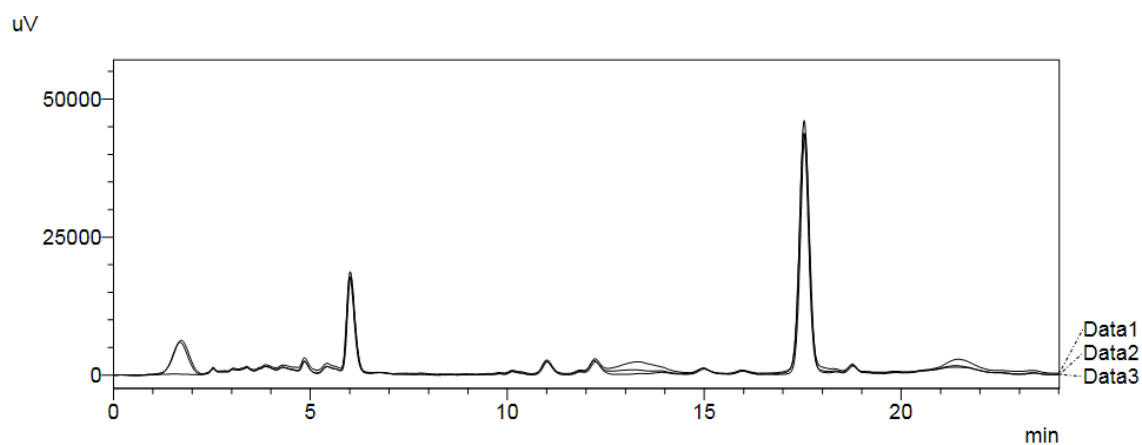


Figure S9. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.53 min) for its quantification in June, *Mentha x villosa*.

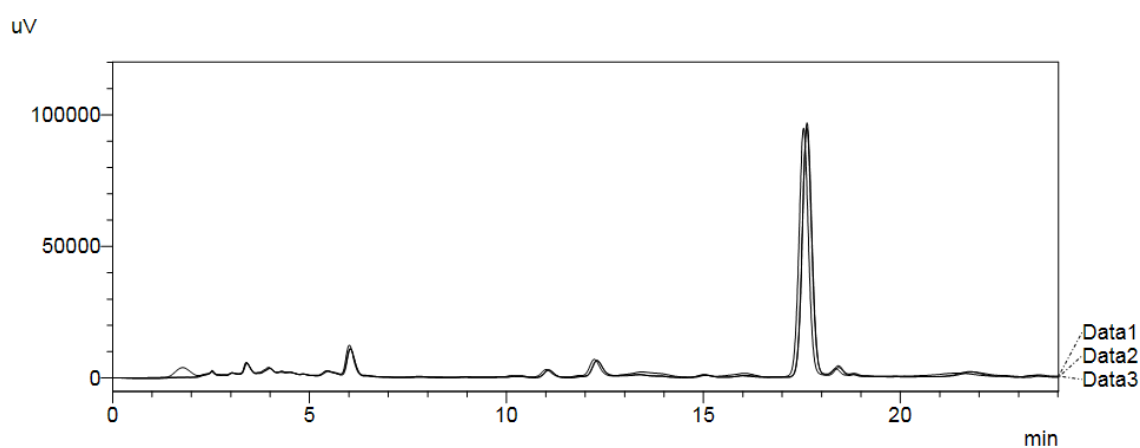


Figure S10. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in July, *Mentha x villosa*.

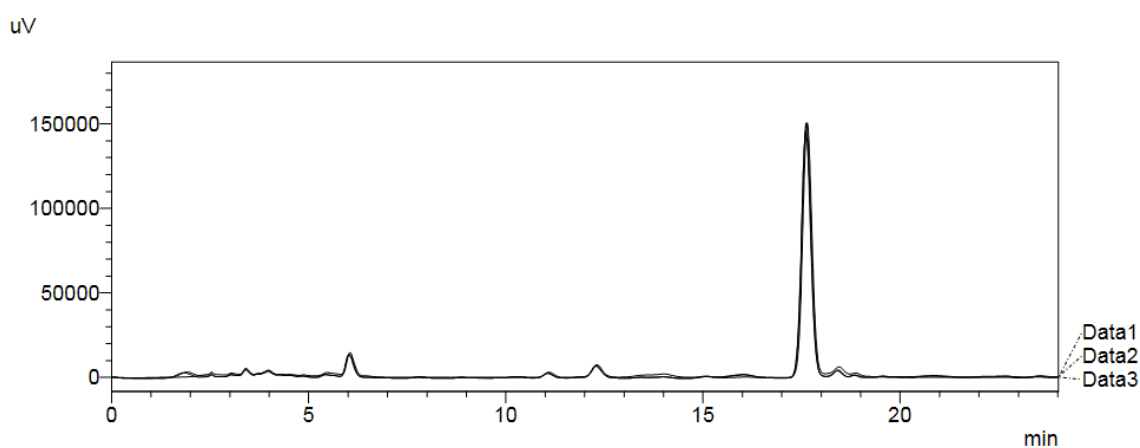


Figure S11. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in August, *Mentha x villosa*.

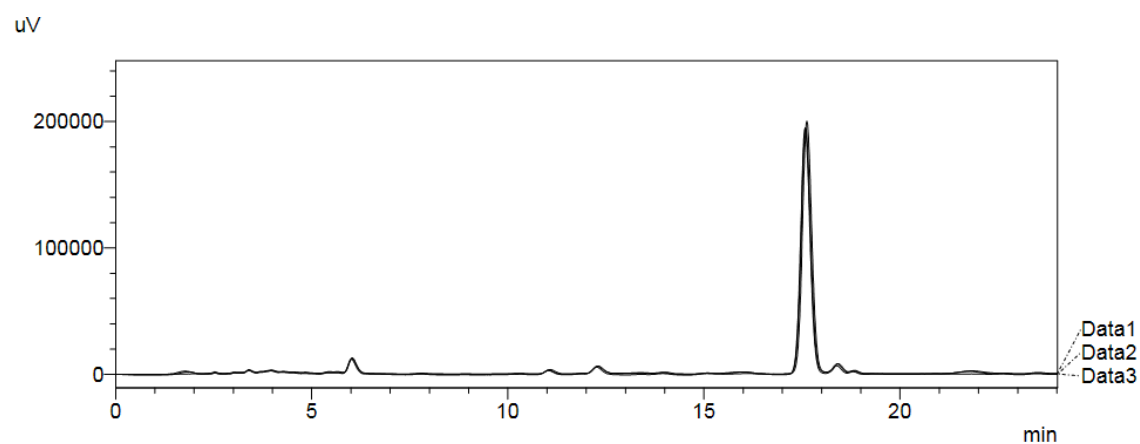


Figure S12. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.60 min) for its quantification in September, *Mentha x villosa*.

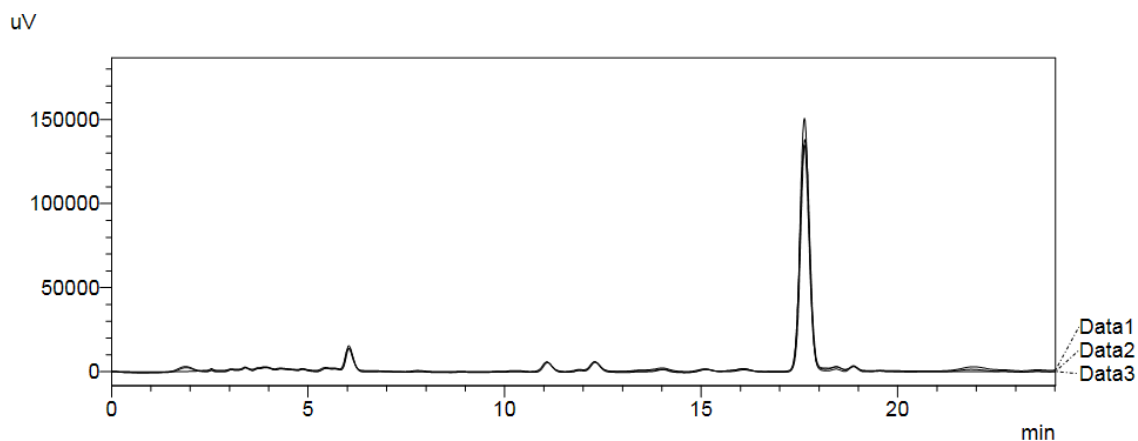


Figure S13. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.63 min) for its quantification in October, *Mentha x villosa*.

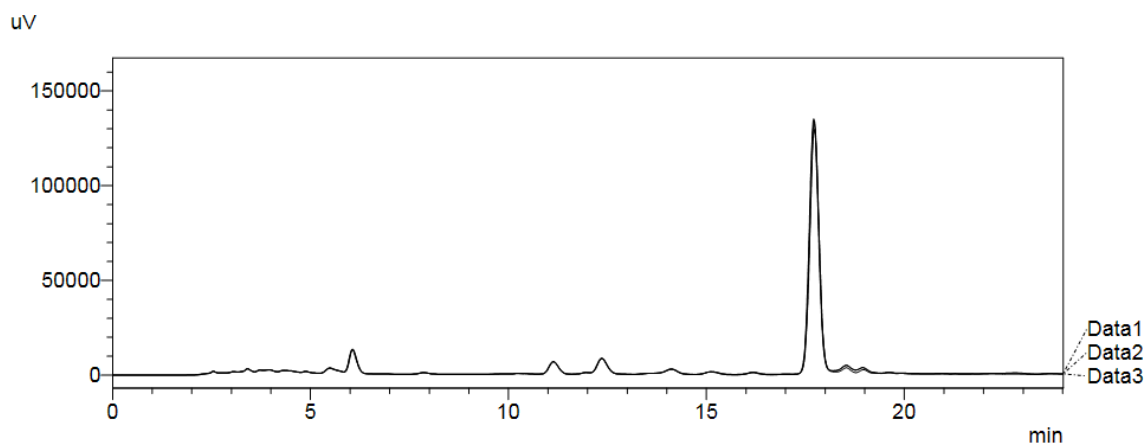


Figure S14. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times approximately at 17.72 min) for its quantification in November, *Mentha x villosa*.

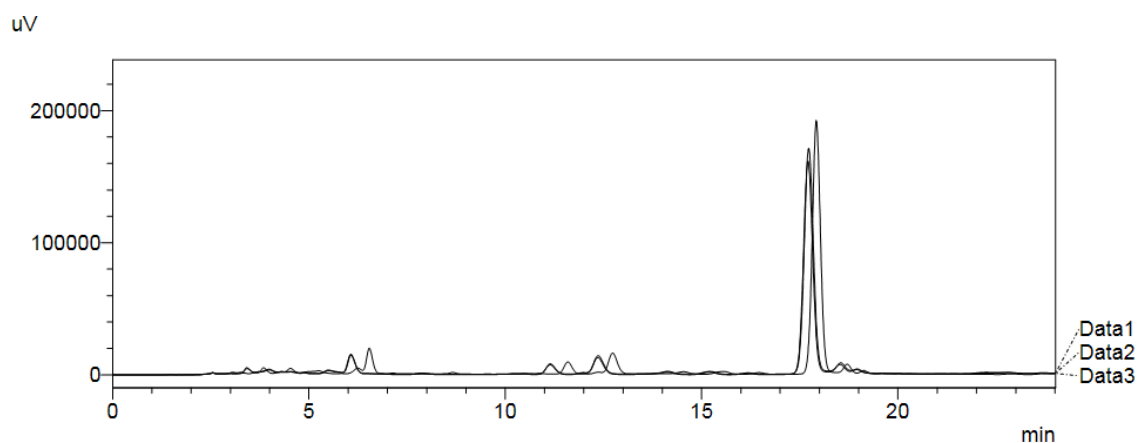


Figure S15. Superimposed chromatograms of rosmarinic acid triplicate (retention times at 17.72; 17.71; 17.92 min) for its quantification in December, *Mentha x villosa*.

Author Contributions: Juliana Gomes and Márcio Cahino 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. Socrates dos Santos contributed to interpretation of data, software usage and graphics production. Josean Tavares and Marcelo Sobral 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 National Institutes of Science and Technology Program (INCT – Rennofito, nº 465536/2014-0), CNPq (nº 141383/2018-6 and nº 141208/2016-3) and CAPES code 001.

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 antioxidant activity of *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae). *Food Chem.* 2020, 315, 126277.
2. Karimi, A.; Krähmer, A.; Herwing, 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.
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 Crops Prod.* 2017, 95, 543–548.
5. Nenadis, N.; Llorens, L.; Koufogianni, A.; Díaz, L.; Font, J.; Gonzalez, J. A.; Verdaguer, 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.
7. Ferraz, E. 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 n. 9, e0204132.
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. In: Edições UFC, Fortaleza, CE, Brazil, 2001.
10. Matos-Rocha, T. J.; Cavalcanti, M. G. S.; Barbosa-filho, J. M.; Lúcio, A. S. S. C.; Veras, D. L.; Feitosa, A. P. S.; de Siqueira Junior, J.; Almeida, R. N.; Marques, M. O. M.; Alves, L. C.; Brayner, F. A. *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. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350732>.
11. Guedes, D. N.; Silva, D. F.; Barbosa-Filho, J. M.; de 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 xvillosa* 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.; Thomazzi, S. M. 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-L.; 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*. *Journal of Food Science*, 2011, 76, 6. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02281.x
15. Brahmi, F.; Khodir, M.; Mohamed, C.; Pierre, D. Chemical Compostion and Biological Activities of *Mentha* Species. In: El-Shemy HA, editor. *Aromatic and Medicinal Plants – Back to Nature*. 2017, Rijeka: InTech. p. 47-80.
16. Hanafy, D. M.; Prenzler, P. D.; Burrows, G. E.; Ryan, D.; Nielsen, S.; Sawi, S. A. E.; Alfy, T. S. E.; Abdelrahman, 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. *Natural Product Communications*, 2019, v. 14, n. 7, p. 1934578X1986290.
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. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, v. 4, n. 3, p. 205-211.
19. Shubha, J. R.; Bhatt, P. Plectranthus amboinicus leaves stimulate growth of probiotic L. plantarum: Evidence for ethnobotanical use in diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, v. 166, p. 220-227.
20. 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*, 2009b, v. 125, n. 2, p. 361-363.
21. 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*, 2006, v. 16, n. 1, p. 77-82.
22. 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.*, 2017, v. 22, n. 1, p. 37-44.
23. 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*, 2009a, v. 28, n. 3, p. 460-464.
24. Olszewska, M. A.; Gędas, A.; Simões, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 2020, v. 134, p. 109214.
25. Kumar, P.; Singh, S.; Kumar, N. *Plectranthus amboinicus*: a review on its pharmacological and pharmacognostical. *A J Physiol Biochem Pharmacol*. 2020, 10 (2), DOI: 10.5455/ajpbp.20190928091007
26. Balakrishnan, A. Therapeutic uses of peppermint—a review. *J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, v. 7, n. 7, p. 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.
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. *Natural Product Communications*. 2015, 10, 937 - 940.

29. Arumugam, G.; Swamy, M. K.; Sinniah, U. R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*. 2016 <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
30. Dalmagro, A. P.; Camargo, A.; Filho, H. H. S.; Valcanaia, M. M.; Jesus, P. C.; Zeni, A. L. B. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. *Ind Crops Prod*. 2018, 123, 323–330.
31. Henriques, A. C. R. Estudo dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório do chocolate preto e da pasta de cacao. MSc. Dissertation. 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 Crops Prod*. 2018, 122, 506–512.
33. Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*. 2007, 30, 351–355.
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.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *J. Photochem. & Photobiol. B: Biol*. 2019, 193, 51–88.
36. Amoah, S. K. S.; Sandjo, L. P.; Kratz, J. M.; Biavatti, M. W. Rosmarinic Acid – pharmaceutical and clinical aspects. *Plant. Med*. 2016, 82, 388–406.
37. Psotova, J.; Svobodova, A.; Kolarova, H.; Walterova, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 2006, v. 84, p. 167–174.
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, v. 47, p. 386–392.
39. Blackman, B. K. Changing Responses to Changing Seasons: Natural Variation in the Plasticity of Flowering Time. *Plant Physiology*, 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.; Silva, M. S.; Tavares, J. F. Photoprotective Activity of *Plectranthus amboinicus* Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2020, 30, 183–188.
41. GOMES, J. M. Estudo preliminar da potencial atividade fotoprotetora e antioxidante de *Mentha x villosa*. MSc dissertation. 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. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 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.; Miguita, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim. Nova*. 2009, 32, 407–411.
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. Farmacogn*. 2019, 29, 301–308.

48. Oliveira, M. B. S.; Valentim, I. B.; Tauane, S. R.; Santos, J. C.; Pires, K. S. N.; Tanabe, E. L. L.; Borbely, K. S. C.; Borbely, A. U.; Goulart, M. O. F. *Ind Crops Prod.* 2020, 152, 112503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112503>.
49. Mota, M. D.; Morte, A. N. B.; Silva, L. C. R. C.; Chinalia, F. A. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2020, 205, 111837. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111837>
50. Mota, M. D.; Costa, R. Y. S.; Guedes, A. S.; Silva, L. C. R. C.; 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, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111639>
51. Anvisa (2012) Resolução RDC N° 30 de 1° de junho de 2012, Ministério da Saúde, Brasília, DF.
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.
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.
54. Takshak, S.; Agrawal, S. B. 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, 97, 124 – 138.
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.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



20 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Artigo 2 submetido na revista jornal of Photochemistry and Photobiology

B: Biology

“Photoprotective and antioxidant activity of optimized *Mentha x villosa* extract”

Photoprotective and antioxidant activity of optimized *Mentha x villosa* extract

Juliana de Medeiros Gomes^a, Márcio Vinícius Cahino Terto^b, Maria Beatriz Mendes Nunes^a, Thalisson Amorim de Souza^a, Joanda Paolla Raimundo e Silva^a, Samuel Cibulski^c, Luiz Alberto Lira Soares^d, Vera Isaac^e, Haniel Maffei Umesaki Tessaro^e, Marcelo Sobral da Silva^a, Josean Fechine Tavares^{a,*}

^aLaboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Univ Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^bUnião das Instituições Educacionais de São Paulo - UNIESP, Campus Cabedelo, Paraíba, Brazil.

^cCentro de Biotecnologia – CBiotec, Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Univ Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^dNúcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos, UFPE - Univ Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^eFaculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, DFM – Laboratório de Cosmetologia – LaCos, São Paulo, Brazil.

*Autor correspondente: josean@lft.ufpb.br; Tel.: +55-083-98802-7809. Postal Address: Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Univ Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Abstract:

Mentha x villosa tem sido utilizada na medicina popular como antimicrobiana e anti-inflamatória. Seus metabólitos não voláteis são representados principalmente por ácidos fenólicos e flavonóides. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade fotoprotetora do extrato otimizado de *Mentha x villosa* (MV-OE). Primeiro, a otimização da extração de polifenóis totais e ácido rosmarínico (AR) foi conduzida por planejamento fatorial. Análises de PCA, LC-HRMS e desreplicação MSⁿ foram executadas para identificar os compostos presentes em *M. x villosa* e entender quais substâncias tiveram sua extração favorecida pelo planejamento fatorial. Após a otimização da extração, foram determinados os teores de polifenóis e AR, atividade antioxidante, FPS, FPUVA e comprimento de onda crítico. As melhores condições de extração foram etanol 70% e relação pó:solvente a 5%, obtendo-se 264,58 mg EAG/g e 101,96 mg/g de polifenóis e AR, respectivamente. A PCA revelou que 7 componentes principais contribuíram para diferenciar as amostras, com base na análise de LC-MS essas características foram identificadas como polifenóis, juntamente com outros 23 compostos. A atividade de eliminação de DPPH e ABTS de MV-OE foi CE₅₀ = 42,44 µg/mL e 322,87 µg/mL, respectivamente. Já em relação a atividade da tirosinase, o MV-OE inibiu 64,28% na concentração de 25 µg/mL. As formulações 5 e 6 apresentaram os melhores valores de FPS e FPUVA, 23,20 e 30,63; 12,25 e 26,53, potencializando o FPS do metoxicinamato de etilhexila, mostrando que o MV-OE tem um grande potencial fotoprotetor, pois demonstrou importante proteção de amplo espectro contra os raios UVA e UVB, associada à atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Mentha x villosa*, FPS, FPUVA, radiação ultravioleta, CL-EM, antioxidante, planejamento fatorial.

1. Introdução

A radiação ultravioleta do sol (UV) é uma forma de radiação não ionizante e pode ser dividida em UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm). 95% da radiação UV que atinge o solo terrestre é composta por raios UVA e 5% dela corresponde a raios UVB. Ambos os tipos de raios UV (RUV) são perigosos para a pele humana e muitos efeitos agudos (principalmente queimaduras solares e bronzeamento da pele) e crônicos podem aparecer devido à superexposição a esse tipo de radiação. Os principais efeitos crônicos associados a ela são alterações celulares e degenerativas, fotoenvelhecimento e câncer de pele (1-3). Assim, recomenda-se o uso diário de protetores solares tanto por via oral quanto tópica. Os protetores solares tópicos geralmente são compostos por filtros químicos e/ou físicos, que atuam diretamente contra a radiação UV, mas também são adicionados agentes antioxidantes para neutralizar os radicais livres produzidos após a exposição solar (4).

Como as plantas são constantemente atingidas pela RUV, elas desenvolveram muitos mecanismos para se proteger dela, produzindo metabólitos secundários capazes de evitar os danos da RUV (5). Assim, uma estratégia interessante que vem sendo utilizada pela indústria é adicionar extratos vegetais ricos em compostos fenólicos em formulações fotoprotetoras associadas a filtros UV, a fim de intensificar a eficácia final do produto (6,7), devido à versatilidade dos polifenóis e suas atividades biológicas (8).

Os metabólitos secundários obtidos a partir de extratos vegetais são influenciados pelo método de extração, solvente, parte da planta e proporção do fármaco utilizado. Assim, avaliar todas essas variáveis é importante para produzir extratos enriquecidos, principalmente para garantir a reprodutibilidade e qualidade dos produtos obtidos. Esses efeitos podem ser avaliados pela realização de planejamentos fatoriais, que permitem compreender a influência de cada fator, bem como seus efeitos conjuntos (9,10). Outro ponto importante para garantir a segurança de formulações contendo extratos vegetais são os avanços na caracterização de compostos em métodos analíticos, como a espectrometria de massas, que permitiram desreplicar compostos com alta sensibilidade, (11,12). Assim, métodos estatísticos e físicos combinados podem nos fornecer um grande conhecimento da composição dos extratos e como melhorá-la de acordo com as atividades biológicas desejadas (10).

Assim, considerando o quão promissores os produtos naturais podem ser como protetores solares, principalmente quando os polifenóis estão presentes, a família Lamiaceae apresenta um grande potencial, pois muitos de seus membros já são utilizados na área da saúde (13,14), e é a principal fonte natural de produtos cosméticos (15,16). Membro de Lamiaceae, *Mentha x villosa* é popularmente chamada de hortelã-da-folha-miúda, no Brasil. Popularmente, *M. x villosa* e outras espécies de *Mentha* têm um grande papel na indústria de óleos essenciais e na culinária, sendo utilizadas em sucos, chás, saladas e aromatizantes, mas também na medicina popular para tratar infecções de pele e microbianas, distúrbios gastrointestinais e respiratórios, resfriados, febre, diabetes, inflamação, etc (17-21).

No entanto, os extratos não voláteis de *M. x villosa* também têm mostrado um potencial biológico interessante, principalmente como antioxidante, uma vez que são compostos por polifenóis, como os ácidos fenólicos, representados principalmente pelo

ácido rosmarínico (RA) e flavonóides, como demonstrado em estudos de (22-25). Atividades antibacterianas, citotóxicas e analgésicas também têm sido observadas na literatura (26,27). Assim, de acordo com o perfil histórico de atividades biológicas de *M. x villosa*, começamos a estudar sua atividade fotoprotetora em estudo anterior (28), cuja as partes aéreas apresentaram FPS = 13,73 em setembro. Assim, neste trabalho pretendemos continuar avaliando a atividade fotoprotetora de *M. x villosa* otimizando a extração de polifenóis e AR, caracterizando seus compostos fenólicos e testando seu FPS, FPUVA, comprimento de onda crítico e atividade antioxidante.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

As folhas de *Mentha x villosa* Hudson (1 kg) foram coletadas às 8h do dia 7 de fevereiro de 2022, na Universidade Federal da Paraíba, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (coordenadas 7° 8' 29.875" S/34° 50' 48.757" W), Campus I, João Pessoa, PB. Um exemplar desta espécie foi depositado no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, sob o nº 14.996 e esta planta também foi registrada na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN) sob referência número A3BA60D. Logo após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante por 72h. Após determinação das condições ideais por meio de planejamento fatorial para a produção de um extrato de *M. x villosa* enriquecido em polifenóis, o material seco (125 g) foi submetido à extração por turbólise (2,5 L de etanol 70%) em 4 ciclos de 30 segundos, com 5 min de intervalo. Após o procedimento de extração, o solvente foi removido em rotaevaporador, obtendo-se 24,25 g de extrato otimizado de *M. x villosa* (MV-OE).

2.2. Químicos e reagentes

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (radical DPPH), 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico (ABTS), trolox, reagente Folin-Ciocalteu, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido rosmarínico, carbonato de sódio, cloreto de alumínio (Al₂Cl₃), etilhexilmetoxicinamato e persulfato de amônio foram todos obtidos da Sigma Aldrich®, EUA. Os solventes utilizados foram metanol (Tedia®, grau HPLC), ácido fosfórico (Proquimios®), ácido fórmico (J. T. Baker®), e água ultrapura obtida de um sistema de purificação Milli-Q-Millipore®.

2.3. Otimização da extração de polifenóis e AR de *M. x villosa*

Para produzir um extrato de *M. x villosa* enriquecido em polifenóis, um planejamento fatorial 2² com pontos centrais foi usado para estudar como a proporção da planta (2,5, 5 e 7,5 %, p/v) e a concentração de etanol (50, 70 e 90 %, v/v) influencia na resposta selecionada, a fim de otimizar a extração dos polifenóis totais presentes na espécie estudada. Assim, foram utilizados dois níveis diferentes de variáveis independentes: percentagem de etanol, superior (+1, correspondendo a 90%), inferior (-1, 50%) e um ponto central (0, 70%); proporção da planta (relação pó:solvente) nível superior (+1, 7,5%), inferior (-1, 2,5%) e um ponto central (0, 5%). 22,5 g de folhas secas foram usados para realizar esses experimentos.

A extração foi realizada por turbólise, utilizando 4 ciclos de 30 segundos, com 5 min de intervalo (tempo total 20 min). Após a turbólise, todos os extratos foram secos em rotaevaporador a 40 °C e foram avaliados o teor de polifenóis totais, teor de ácido rosmarínico (AR), eficiência extrativa e resíduo seco. O extrato com maior teor de polifenóis foi selecionado para dar continuidade aos ensaios biológicos e foi codificado como MV-OE.

2.3.1. Eficiência da extração

Eficiência extrativa (EE) significa a capacidade do solvente de extrair polifenóis, nesse caso. Assim, a EE foi avaliada como resposta e calculada pela Eq. (1).

$$EE = \frac{TPT}{RS} \quad (1)$$

Onde,

EE = eficiência da extração; TPT = teor de polifenóis totais; RS = resíduo seco

2.3.2. Resíduo seco

O resíduo seco (RS) foi determinado seguindo a metodologia descrita em (29). Assim, amostras de 2 g de cada extração (antes da secagem) foram transferidas para cristalizadores e o solvente foi evaporado em banho-maria, em seguida, foram transferidos para uma incubadora a 100-105 °C por três horas. Posteriormente, foi obtido o peso de cada amostra restante e o resíduo seco foi determinado.

2.3.3. Condições cromatográficas

A separação por CL foi realizada em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japão). As amostras (20 µL) foram carregadas em uma coluna analítica Kromasil C18 5 µm 100Å, 250 × 4,6 mm (Kromasil, Bohus, Suécia) e a fase móvel foi composta por 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e metanol (solvente B). Um gradiente linear exploratório (5 a 100% B) foi realizado para eluição em 25 min a uma vazão de 600 µL·min⁻¹ para compor a análise de PCA. Um Gradiente linear de 95 min nas mesmas condições acima foi usado para desreplacar as amostras obtidas a partir do planejamento fatorial (30).

2.3.4. Condições da espectrometria de massas

O sistema de HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa microOTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) contendo uma fonte de íons de eletrospray (ESI) para obter espectros de massa de alta resolução. Os parâmetros aplicados foram: capilar 4,5 kV, ESI em modo negativo, placa final offset 500 V, nebulizador 40 psi, gás seco (N₂) com vazão de 8 mL/min e

temperatura de 200°C. Os espectros de massa (m/z 50–1000) foram registrados a cada 2 s. O sistema de HPLC foi acoplado a um ESI Ion Trap Amazon X (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) operado nas mesmas condições de instrumento usadas acima. Os compostos desreplicados foram identificados com base na comparação dos dados de MS/MS com os padrões internos e a literatura.

2.3.5. *Análise de componentes principais (PCA)*

Para realizar a PCA, os arquivos espectrais LC-HRMS foram convertidos para o formato MzXML usando DataAnalysis 4.2 (Bruker). Os dados foram pré-processados (detecção de recursos, alinhamento de amostras e correspondência de pico) no XCMS online (31). Os valores integrais de cada característica (m/z) foram analisados em função do tempo de retenção. Depois disso, os arquivos foram convertidos para o formato csv. A análise de componentes principais (PCA) dos dados foi realizada no Unscrambler, versão 10.4 (CAMO Process AS, Noruega). A normalização de área foi aplicada a cada amostra.

2.4. *Quantificação do teor de fenólicos totais*

Para este ensaio (32), foram preparadas amostras triplicadas de 1mg/ml e, no escuro, uma alíquota de 120 μ l de cada foi transferida para eppendorffs contendo 500 μ l de reagente Folin-Ciocalteu (10%), então após 8 min em repouso, adicionou-se 400 μ l de solução de carbonato de sódio (7,5%) e manteve-se em repouso por 120 min, à temperatura ambiente. Enquanto isso, as amostras foram transferidas de eppendorffs para placas de 96 poços para leitura posterior a 765 nm em um leitor de microplacas (H1M, Biotek®).

O ácido gálico foi utilizado como padrão para a construção de uma curva de regressão linear, as concentrações utilizadas foram 100, 150, 200, 250 e 300 μ g/ml. Os resultados foram expressos em mg GAE/g da amostra.

2.5. *Quantificação de AR*

O teor de AR em *M. x villosa* foi determinado usando um método analítico de HPLC-DAD (28). As amostras de extratos e padrão foram feitas em triplicata com solução diluente na concentração de 1:1 MeOH:água acidificada (0,1% de H₃PO₄), posteriormente foram filtradas. Assim, uma curva de calibração foi construída usando um padrão AR a 5, 10, 20, 40, 80 e 160 μ g/ml.

O sistema HPLC usado da Shimadzu® (destaque) é equipado com módulo de bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, auto-injetor SIL-20A HT, sistema de degaseificação DGU-20A5R, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A diodo array e CBM- controlador de 20A. A coluna utilizada foi Kromasil® C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm i.a. preenchida com partículas de 5 μ m) (Sigma Aldrich®) com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm $\times$ 3,0 mm i.a. preenchida com partículas de 5 μ m). O software LC Solution® (Shimadzu®) foi utilizado para controle do equipamento, aquisição e análise de dados. A vazão utilizada foi de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, temperatura do forno de 26 °C e comprimento de onda de 330 nm. A fase móvel A foi composta por água acidificada (0,1% de H₃PO₄) e metanol foi usado como fase móvel B.

A corrida foi feita em modo gradiente e inicia-se com 38% da fase móvel B (metanol), depois aos 5 min atinge 42%, permanecendo nesta concentração até 9 min.

De 9 a 12 min, o gradiente muda de 42 a 45% de B, chegando a 50% em 15 min. De 15 a 17 min, retorna a 45%, e permanece nessa concentração até 20 min, quando retorna à condição inicial a 38% de B, parando em 24 min.

2.6. Atividade sequestradora de radicais DPPH

A atividade sequestrante de MV-OE foi avaliada de acordo com o método DPPH descrito por (33), mas usando metanol como solvente. Então, primeiro, 5 concentrações (10, 20, 40, 60 e 80 µg/ml) da amostra foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1 mg/ml, em seguida, 100 µl delas foram transferidas para placas de 96 poços e 100 µl de uma solução de DPPH 0,3 mM foi adicionada a todas as amostras. A reação foi mantida em repouso e ao abrigo da luz por 30 min e, em seguida, a leitura foi feita a 518 nm em um leitor de microplacas (H1M, Biotek®). O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, ácido ascórbico (AA) utilizando 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 17,5 µg/ml. Além disso, é necessário um controle negativo para o ensaio, que é composto por 100 µl de solução de DPPH e 100 µl de metanol. A atividade de sequestradora (AS) de todas as amostras foi calculada pela seguinte Eq. (2). De acordo com a atividade de eliminação para cada concentração, as curvas de calibração de cada amostra foram calculadas e os resultados foram expressos como CE₅₀.

$$AS (\%) = \left(\frac{ABS_{controle\ negativo} - ABS_{amostra}}{ABS_{controle\ negativo}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.7. Atividade sequestradora de radicais ABTS

A descoloração do ABTS foi avaliada seguindo o protocolo descrito por (34). Primeiro, soluções estoque 7 mM ABTS e 245 mM APS foram preparadas usando água ultrapura e, após, 5,05 µl de solução APS foram adicionados a 500 µl de solução estoque ABTS. Esta solução foi incubada durante a noite (12-16h) no escuro à temperatura ambiente, para que o radical ABTS pudesse ser criado. Em seguida, preparou-se uma solução de radical ABTS capaz de absorver 0,700 a 734 nm diluindo 10 µl de solução estoque de radical ABTS em 1 ml de água ultrapura. Em seguida, preparou-se solução estoque de controle positivo (trolox a 2mM) e várias soluções de trolox em concentrações de 12,5 a 400 µM foram feitas em sequência, a fim de obter uma curva de calibração. Assim, as soluções estoques das amostras foram feitas a 1 mg/ml e 5 soluções diluídas (100 a 500 µg/ml) foram feitas a partir dela.

O ensaio foi realizado adicionando 10 µl de cada diluição de amostra em placa de 96 poços em triplicado e 190 µl de solução diluída ABTS. O mesmo procedimento foi feito para o controle positivo e foi feito um controle negativo utilizando 190 µl de solução diluída de ABTS com 10 µl de água ultrapura. A placa foi incubada por 5 minutos, no escuro, e a absorbância foi lida a 734 nm em um leitor de microplacas (H1M, Biotek®). A descoloração (%) foi calculada pela Eq. (3). Os resultados foram expressos como CE₅₀.

$$Descoloração (\%) = \left(\frac{Controle\ ABTS - Amostra\ ABTS}{Controle\ ABTS} \right) \times 100 \quad (3)$$

Depois disso, a capacidade antioxidante da amostra foi calculada em relação à curva de calibração do trolox, como segue, Eq. (4).

$$\text{Trolox eq (mg/mg)} = \frac{\text{Descoloração da amostra(\%)-b}}{\text{Concentração da amostra}} \quad (4)$$

2.8. Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS), fator de proteção UVA (FPUVA) e comprimento de onda crítico

As formulações foram preparadas para avaliar o FPS *in vitro*, usando MV-OE e um filtro químico, metoxicinamato de etilhexila, Tabela 1. Assim, o FPS das formulações foi determinado usando o Optometrics SPF-290S Analyzer (Optometrics Corporation, Essex, Reino Unido). 110 mg de cada amostra foram espalhados em uma fita Transpore® (50 cm²) (3M, MN, EUA), a fim de obter um filme de 2 mg/cm². As amostras foram submetidas a um simulador solar de arco de xenônio de 125 W CW, que mediu sua transmitância (T) realizando 12 varreduras em diferentes pontos de cada formulação na fita Transpore®. A medição da transmitância (T) foi feita de 290 a 400 nm com um intervalo de 2 nm. O valor do fator de proteção monocromático foi calculado para os comprimentos de onda selecionados usando a Eq. (5), FPS, UVA-PF e comprimento de onda crítico (λ_c) foram calculados pela Eq. (6), (7), (8), respectivamente. Amostras com comprimento de onda crítico (λ_c) superior a 370 nm foram consideradas com proteção de amplo espectro (Tabela 2).

Tabela 1 Composição das formulações preparadas.

Formulações	Ingredientes	Composição quantitativa (% , w/w)
1	MV-OE	5%
	Crema Polawax®	q.s.p
2	MV-OE	5%
	Metoxicinamato de Etilhexila	1%
	Crema Polawax®	q.s.p
3	MV-OE	5%
	Metoxicinamato de Etilhexila	3%
	Crema Polawax®	q.s.p
4	MV-OE	10%
	Crema Polawax®	q.s.p
	MV-OE	10%
5	Metoxicinamato de Etilhexila	1%
	Crema Polawax®	q.s.p
	MV-OE	10%
6	Metoxicinamato de Etilhexila	3%
	Crema Polawax®	q.s.p
7	Metoxicinamato de Etilhexila	1%
	Crema Polawax®	q.s.p
8	Metoxicinamato de Etilhexila	3%
	Crema Polawax®	q.s.p

$$FPM = \frac{1}{T} \quad (5)$$

$$FPS = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda.B\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda.B\lambda}{MPF\lambda}} \quad (6)$$

$$FPUVA = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda.P\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda.P\lambda}{MPF\lambda}} \quad (7)$$

$$R = \frac{\int_{290\text{ nm}}^{\lambda} A\lambda.d\lambda}{\int_{290\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A\lambda.d\lambda} \quad (8)$$

Onde, E = Irradiância espectral da luz solar terrestre (sob condições controladas), B = Eficácia do eritema, MPF = Fator de proteção monocromático e P = Espectro de ação do escurecimento do pigmento persistente (PPD), A = absorvância (35).

Tabela 2. Intervalo de comprimento de onda crítico e sua relação com o nível de proteção e relação UVA/UVB (36,37).

λ_c	Nível de proteção (razão UVA/UVB)
$340\text{ nm} \leq \lambda < 370\text{ nm}$	Intermediária
$\lambda_c > 370\text{ nm}$	Ampla espectro

2.9. Análise estatística

A análise estatística de desenho fatorial foi realizada por ANOVA e uma equação polinomial de segunda ordem foi determinada pelo método Partial Least Square (PLS), utilizando o software STATISTICA® 6.0 (StatSoft, EUA).

ANOVA one way e teste de Tukey também foram utilizados para análise estatística de DPPH, ABTS, polifenóis totais, e quantificação do teor de AR.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização da extração de polifenóis e AR de *M. x villosa*

Os resultados para teor de AR e polifenóis totais, resíduo seco e eficiência de extração podem ser encontrados na Tabela 3. O modelo proposto apresentou um bom coeficiente de correlações múltiplas (R^2). Tanto para o teor de polifenóis totais ($TPC = 27.39 - 3.20 b_1 - 2.15 b_1^2 - 1.18 b_2 - 0.92 b_1 b_2$) quanto para a eficiência de extração ($EE = 15.45 + 1.38 b_1 + 5.98 b_1^2 - 10.75 b_2 - 0.99 b_1 b_2$), os coeficientes de correlação

indicaram que mais de 99% da variância experimental pode ser explicada pelas equações obtidas. O modelo matemático ainda foi capaz de explicar mais de 98 e 97% das variâncias encontradas para resíduo seco ($RS = 1.78 - 0.29 b_1 - 0.21 b_1^2 + 0.74 b_2 - 0.15 b_1 b_2$) e teor de ácido rosmarínico ($AR = 9.30 + 1.23 b_1 - 0.93 b_1^2 + 0.63 b_2 + 1.54 b_1 b_2$), respectivamente.

Tabela 3. Matriz de planejamento Fatorial 2² com pontos centrais.

Exp	Variáveis codificadas		Variáveis naturais		AR (g%)	TPT (g%)	RS (g%)	EE
	EtOH (%)	P:S (%; m/v)	EtOH (%)	D:S (%; m/v)				
1	-1	-1	50	50	8.04	28.58	0.96	29.82
2	1	-1	90	50	7.42	23.42	0.68	34.57
3	-1	1	50	90	6.27	28.31	2.75	10.31
4	1	1	90	90	11.79	20.66	1.86	11.09
5	0	0	70	70	9.56	27.44	1.70	16.15
6	0	0	70	70	9.21	27.46	1.79	15.33
7	0	0	70	70	9.14	27.28	1.83	14.89

Exp. = Experimento; P:S = razão pó/solvente; AR = ácido rosmarínico; RS = resíduo seco; TPT = teor de fenólicos totais; EE = eficiência de extração.

3.1.2. Teor de AT e TPT, Resíduo Seco (RS) e Eficiência de Extração (EE)

Tanto o teor de etanol quanto a proporção da planta (relação pó:solvente) tiveram influência significativa nas respostas estudadas. Os termos lineares, bem como suas interações, foram os que mais influenciaram nas respostas.

Através do gráfico de Pareto (Fig. S1) para o teor de RA, foi visto que a interação linear entre os fatores resultou em um rendimento maior do que os valores individuais de cada fator, além disso, foi observado no gráfico de superfície de resposta (Figura 26A), ou seja, quanto maior o percentual de etanol e menor a proporção vegetal (relação pó:solvente, ou seja, +1, 7,5%), maior o teor de AR. A curvatura côncava apresentada no gráfico de superfície de resposta e no gráfico de contorno (Fig. S2), foi dada pelo valor positivo do termo quadrático.

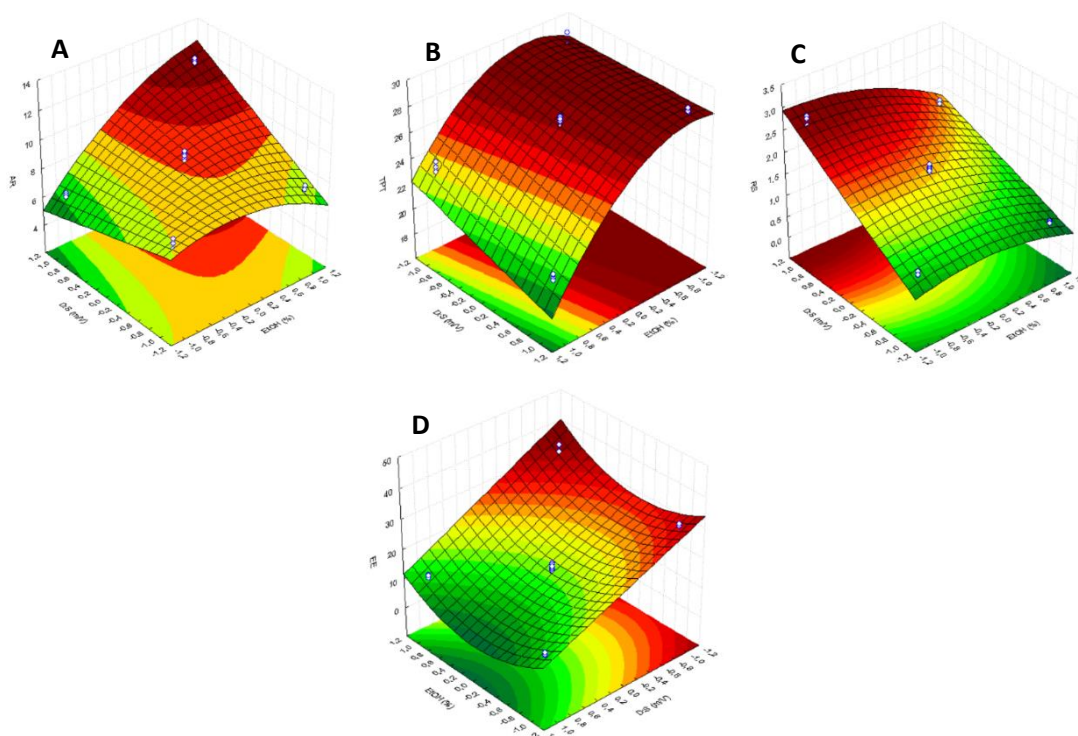


Figura 26. Efeitos da porcentagem de etanol e proporção vegetal sobre o teor de AR, polifenóis e resíduo seco e, eficiência extrativa. A) Gráfico de superfície de resposta do teor de RA. B) Gráfico de superfície de resposta do teor total de polifenóis. C) Gráfico de superfície de resposta do teor de resíduos secos. D) Gráfico de superfície de resposta da eficiência de extração.

No gráfico de superfície de resposta (Figura 26B) para o teor de polifenóis totais, observou-se que a porcentagem de etanol exerce uma grande influência no modelo (conforme observado no gráfico de Pareto, Fig. S3), enquanto a proporção da planta (relação pó:solvente), embora também tenha uma influência significativa, é inferior ao percentual de etanol. No gráfico de contorno (Fig. S4), observa-se a mesma resposta, mas as linhas tendem a ser retas, não formando contornos, indicando a linearidade da resposta. A curvatura convexa apresentada no gráfico da superfície de resposta foi dada pelo valor negativo do termo quadrático.

Em relação aos resíduos secos, seria de se esperar que quanto maior a quantidade de droga utilizada, maior o teor de resíduos secos. No gráfico de Pareto (Fig. S5), observou-se que a proporção da planta (relação pó:solvente) é o termo que mais influencia a resposta, o que foi corroborado pela análise do gráfico de superfície de resposta (Figura 26C), onde é visto que quando a relação pó:solvente está no nível mais baixo (-1), isso influencia na diminuição da quantidade de resíduos secos gerados. Quando esta relação está no nível superior (+1), a quantidade de resíduo seco é maior, o que também é visto no gráfico de contorno (Fig. S6).

Para eficiência de extração, por meio do gráfico de Pareto (Fig. S7), o termo mais significativo é proporção da planta (relação pó:solvente), além disso, no gráfico de superfície de resposta (Figura 26D), observa-se que embora haja influência do percentual de etanol para a resposta, a maior influência é apresentada pela relação pó:solvente. Assim, para aumentar a eficiência da extração, a melhor condição seria a proporção de planta em 2,5% (-1) e a porcentagem de etanol em 90% (+1). Isso também pode ser visto no gráfico de contorno (Fig. S8).

Assim, com base no que foi observado no gráfico de valores de predição e desejabilidade (Figs. S9) utilizado para encontrar o melhor valor na resposta conjunta, as condições ideais para as respostas obtidas referem-se aos pontos centrais utilizados, ou seja, 70% de percentual de etanol e 5% de proporção de planta (relação pó:solvente).

3.2. Análise de componentes principais (PCA)

A partir de uma matriz composta por amostras obtidas do planejamento fatorial, a análise de PCA revelou um padrão de discriminação para os experimentos 1, 2 e 4. No gráfico de pontos (Figura 27A), PC1 explicou 59% e PC2 21% da variância total, somando 80% no total. No gráfico de loadings (Figura 27B) os íons em $m/z = 525,1780$, $359,0776$, $609,1841$, $593,1521$, $305,0708$, $461,0742$ e $493,1150$ foram os que contribuíram para a discriminação entre as amostras. A fim de identificar esses compostos principais, um estudo aprofundado de seus padrões de fragmentação também foi realizado por experimentos de espectrometria de massa em tandem (MS^n) e HRMS, como segue na Tabela 4.

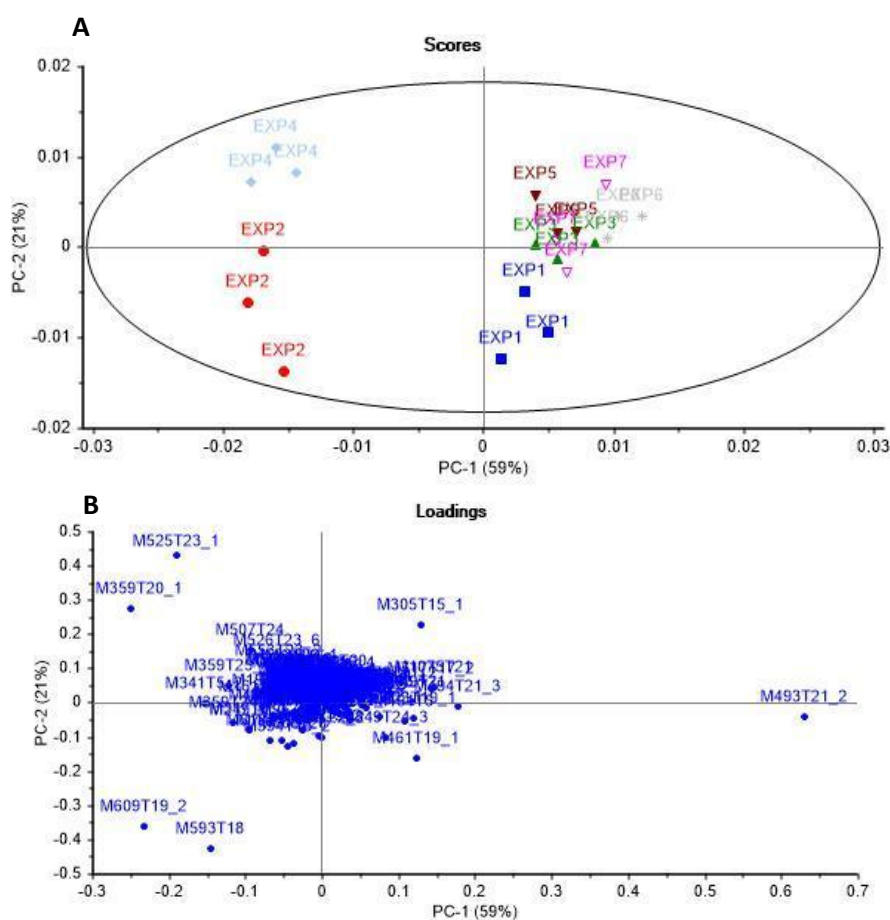


Figura 27. Resultados da PCA usando amostras do planejamento fatorial. A) Gráfico de pontos da análise PCA. B) Gráfico de loadings da análise de PCA. EXP = experimento; M = massa; T = tempo.

Com base nos resultados da análise de PCA (Figura 27) e desreplicação (Tabela 4) observamos que a proporção da planta e o percentual de etanol são variáveis importantes para potencializar a extração de AR e polifenóis de *M. x villosa*, corroborando com resultados encontrados no planejamento fatorial. Quanto à composição associada de cada grupo; ácido salvianólico (m/z 493,1150) e sulfato de 12-hidroxijasmonato (m/z 305,0708) contribuíram para o perfil semelhante observado no extrato bruto obtido pelos experimentos 3,5,6 e 7. Considerando a presença do composto em m/z 461,0742, identificado como luteolina glicuronídeo I, colaborou para a discriminação do grupo 1. Além disso, os experimentos 2 e 4 diferem entre si pela presença de hesperidina (m/z 609,1841), luteolina rutinosídeo (m/z 593,1521), ácido rosmarínico (m/z 359,0776) e um derivado de ácido rosmarínico (m/z 525,1780), respectivamente. Assim, considerando que os polifenóis, assim como os AR são importantes para a atividade fotoprotetora de *M. x villosa*, os pontos centrais (experimentos 5,6 e 7) são a melhor condição para melhor rendimento dos mesmos, o que corrobora com os gráficos de valores de predição e desejabilidade obtidos a partir da análise de planejamento fatorial.

Tabela 4. Compostos tentativamente identificados do extrato de *M. x villosa* por HPLC-ESI-MSn.

Pico	T.R	[M-H] ⁻	Formula Molecular	Erro (ppm)	MS ⁿ <i>m/z</i>	Composto	Referência
1	5.5	191.0558	C ₇ H ₁₂ O ₆	1.6	EM ² [191]: 173, 127, 93, 85	Ácido quínico	(BASTOS et al., 2007; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
2	20.0	315.0715	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	2.1	EM ² [315]: 153 EM ³ [315→153]: 109	Ácido protocatecuico hexosideo	(CATARINO et al., 2018; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2011)
3	20.5	197.0453	C ₉ H ₁₀ O ₅	1.3	EM ² [197]: 179 EM ³ [197→179]: 135	Ácido salvianico A	(CIRLINI et al., 2016; LIU et al., 2007a)
4	23.7	353.0872	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1.8	EM ² [353]: 191, 179, 135 EM ³ [353→191]: 173, 127, 111, 93, 85	Ácido 3-caffeoilquinico	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; LIN; HARNLY, 2008; ZHANG et al., 2013)
5	25.6	359.0967	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	4.6	EM ² [359]: 197 EM ³ [359→197]: 182, 153, 138	Ácido siríngico hexosideo	(ELSADIG KARAR; KUHNERT, 2016; HOFMANN; NEBEHAJ; ALBERT, 2016)
6	32.6	353.0885	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-2.0	EM ² [353]: 191, 179, 173, 135 MS ³ [353→173]: 111, 93	Ácido 4-caffeoilquinico	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; LIN; HARNLY, 2008; ZHANG et al., 2013)
7	35.2	179.0356	C ₉ H ₈ O ₄	-3.3	EM ² [179]: 135	Ácido Cafeico	(CHEN et al., 2011; KANG et al., 2016)
8	35.4	387.1672	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	-2,8	EM ² [387]: 369, 225, 207, 163	Ácido tuberonico hexosideo	(ABU-REIDAH et al., 2019; QUIRANTES-PINÉ et al., 2010; TAAMALLI et al., 2015)

9	35.8	305.0708	C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S	-2.4	EM ² [305]: 225	12-hidroxi jasmonate sulfato	(HAMANY DJANDE et al., 2022; KAPP et al., 2020; MARZOUK et al., 2018)
10	37.9	593.1528	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-2.8	EM ² [593]: 575, 503, 473, 413, 383, 353	Vicenina-2	(SILVA et al., 2015)
11	39.4	537.1054	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	-2.9	EM ² [537]: 493, 313, 295 EM ³ [537→493]: 313, 295	Ácido litospermico I	(ZENG et al., 2006; ZHU et al., 2007)
12	42.4	595.1674	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	-1.0	EM ² [595]: 287 EM ³ [595 → 287]: 269, 151, 135, 125, 107	Eriodictiol rutinosideo	(BRITO et al., 2014; FABRE et al., 2001; ZHAO et al., 2013)
13	43.1	717.1466	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	-0,7	EM ² [717]: 537, 519, 339, 321 EM ³ [717→519]: 339, 321	Ácido salvianolico E	(WANG et al., 2012a; ZHU et al., 2007)
14	44.8	521.1291	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃	1.9	EM ³ [521]: 359 EM ² [521→359]: 223, 197, 179, 161	Ácido rosmarinio hexosideo	(CIRLINI et al., 2016; MARTINS et al., 2015)
15	46.9	579.1731	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	-2.1	EM ² [579]: 271 EM ³ [579→271]: 177, 151	Narirutina	(FABRE et al., 2001; SHI et al., 2007)
16	47.2	593.1521	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1.5	EM ² [593]: 285 EM ³ [593→285]: 267, 257, 243, 241, 213, 217, 197, 199, 175, 151, 133	Luteolina rutinosideo	(CIRLINI et al., 2016)
17	48.0	447.0940	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-1.6	EM ² [447]: 285 EM ³ [447→285]: 267, 257, 243, 241, 213, 217, 197, 199, 175, 151, 133	Luteolina hexosideo	(PEREIRA et al., 2013; ZHANG et al., 2018)
18	48.5	461.0742	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-3.7	EM ² [461]: 285	Luteolina glucuronideo I	(LI et al., 2016; PEREIRA et al., 2013)

					EM ³ [461→285]: 267, 257, 243, 241, 213, 217, 197, 199, 175, 151, 133 EM ² [609]: 301		
19	48.9	609.1841	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	-2,6	EM ³ [609→301]: 286, 283, 258, 257, 151, 125 EM ² [609]: 301	Hesperidina	(SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015)
20	49.6	609.1476	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-2.4	EM ³ [609→301]: 271, 179, 151	Rutina	(LI et al., 2016; ZHU et al., 2007)
21	51.0	359.0776	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-0.9	EM ² [359]: 197, 179, 161	Ácido rosmarinico*	(ZENG et al., 2006)
22	51.3	537.1046	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	-1.3	EM ² [537]: 493, 359 EM ³ [537→493]: 359, 313, 295	Ácido Litospermico II	(CIRLINI et al., 2016; WANG et al., 2012b)
23	52.0	607.1678	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	-1.7	EM ² [607]: 299, 284, 256 EM ³ [607→299]: 284 EM ³ [607→284]: 256, 151 EM ² [461]: 285	Diosmina	(BRITO et al., 2014; JUSTESEN, 2000)
24	57.1	461.0734	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-1.8	EM ³ [461→285]: 267, 257, 243, 241, 213, 217, 197, 199, 175, 151, 133 EM ² [493]: 359, 357, 313	Luteolina glucuronideo II	(LI et al., 2016; PEREIRA et al., 2013)
25	57.1	493.1150	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	-1.9	EM ³ [493→359]: 223, 197, 179, 161 EM ² [593]: 285	Ácido salvianólico A	(BARROS et al., 2013; CIRLINI et al., 2016)
26	57.4	593.1871	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	0.8	EM ³ [593→285]: 270, 257, 243, 241, 228, 226, 217, 199, 164, 151, 136, 125, 107	Isosacuranetina rutinosideo	(FABRE et al., 2001; ZHAO; CHANG; CHEN, 2015)

27	62.0	285.0401	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.4	EM ² [285]: 267, 257, 243, 241, 213, 217, 197, 199, 175, 151, 133	Luteolina	(FABRE et al., 2001)
28	64.2	313.0716	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	0.5	EM ² [313]: 269 EM ³ [313→269]: 159, 109	Ácido salvianólico F	(CIRLINI et al., 2016; LIU et al., 2007b)
29	64.5	525.1780	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀	-2.6	EM ² [525]: 341, 359, 161, 179, 221 EM ³ [525→359]:	Derivado do ácido rosmarinic	(CIRLINI et al., 2016)
30	65.0	359.0776	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-0.9	MS ² [359]: 344, 329, 313, 179, 161 MS ³ [359→344]: 329	Eupatina	(SALEM et al., 2020)

*Composto confirmado por padrão interno.

3.3. Quantificação do teor de polifenóis e AR

Após a otimização da extração, o MV-OE foi produzido em maior escala e os teores de polifenóis totais e AR foram obtidos, resultando em $264,58 \pm 2,83$ mg EAG/g e $101,96 \pm 1,26$ mg/g, respectivamente. Esses resultados corroboram com experimentos de planejamento fatorial realizados, uma vez que teores semelhantes de polifenóis totais e AR foram encontrados quando a escala de extração foi aumentada.

Além disso, os resultados encontrados podem demonstrar uma maneira mais eficaz de extrair polifenóis de *M. x villosa* ou do gênero *Mentha* em comparação com a literatura, como no estudo realizado por (22), que determinou o teor de polifenóis de treze espécies de *Mentha* (incluindo *M. x villosa*), através de seu extrato metanólico obtido por centrifugação. O maior teor de polifenóis encontrado entre todas as espécies foi de $58,93 \pm 8,39$ mg EAG/g, correspondente a *M. suaveolens*, que está relacionado a *M. x villosa* ($52,61 \pm 6,38$ mg EAG/g). Em outro estudo realizado por (75), o extrato metanólico de *M. pulegium* exibiu $157,99$ mg GAE/ge (76), encontrou $206,58$ mg EAG/g de polifenóis no extrato metanólico de *M. pulegium*. (77), também avaliaram o teor de polifenóis de seis diferentes espécies de *Mentha* e a maior concentração de polifenóis totais encontrada correspondeu ao extrato metanólico de *M. aquatica* ($43,21$ mg EAG/g).

As mesmas observações ocorrem quando se considera o teor de AR, (22), também avaliou o teor de AR, que variou de $1,36$ a $2,56$ mg/g, onde *M. x villosa* apresentou $2,30$ mg/g. (24), encontraram $17,9 \pm 0,4$ mg/g de AR no extrato aquoso de *M. x villosa*. Em outro estudo desenvolvido por (78), avaliou-se o teor de AR de três espécies de *Mentha*, e *M. spicata* apresentou a maior porcentagem desse metabólito ($6,7 \pm 1,1\%$, p/p), enquanto MV-OE apresentou $10,2\%$. Assim, esses resultados nos levam a acreditar que usando 70% de etanol e proporção de planta (folhas secas) de 5% , extrai melhor os polifenóis da espécie *Mentha*, principalmente para fins industriais, considerando a toxicidade do metanol.

Ainda, considerando que os polifenóis são a principal classe de metabólitos secundários estudados na fotoproteção devido a sua estrutura química apresentar sistema cíclico e/ou duplas ligações conjugadas, mais de um anel aromático e grupos hidroxila, o aumento do teor de polifenóis do extrato pode aumentar sua atividade fotoprotetora, uma vez que podem atuar tanto como antioxidantes quanto fotoprotetores. Muitos mecanismos de como eles podem atuar já são conhecidos e estão relacionados à regulação de genes de fatores de transcrição (NF- κ B e Nrf-2) e proteção ao estresse oxidativo, indução da síntese de colágeno e elastina, renovação celular da pele, absorção direta da radiação UV, inibição de collagenases e elastases e até mesmo ativação de mecanismos de reparo do DNA, o que ajuda a manter a integridade do tecido cutâneo (5,79-81).

3.3. Atividade sequestradora de radicais DPPH e ABTS

A atividade antioxidante do MV-OE foi avaliada por sequestro de radicais DPPH e ABTS. Assim, em relação à atividade sequestrante de DPPH de MV-OE, apresentou um $CE_{50} = 42,44 \pm 0,28$ μ g/mL, que comparado ao nosso estudo anterior (28), onde avaliamos a atividade sequestrante de DPPH de *M. x villosa* durante 12 meses, a otimização de extração promoveu um importante aumento da atividade antioxidante de *M. x villosa*, uma vez que o melhor CE_{50} encontrado anteriormente foi de $75,09$ μ g/mL.

Este resultado provavelmente está relacionado ao aumento de polifenóis neste extrato, principalmente pelo aumento do teor de AR, uma vez que é o composto majoritário dos extratos de *M. x villosa* e está diretamente relacionado à sua atividade antioxidante, uma vez que a atividade antioxidante do AR tem sido bem relatada na literatura. Em experimentos

conduzidos por (82) em linhagens de células HaCaT, a AR apresentou capacidade citoprotetora, devido à eliminação de espécies reativas de oxigênio intracelular induzida por UVBR, também diminuiu o teor de proteínas carboniladas, a fragmentação do DNA e os níveis de 8-isoprostano, diminuindo o dano celular oxidativo e a indução de apoptose. A AR aumentou a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e heme-oxigenase-1 (HO-1). (83) observaram que a AR mostrou proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro*.

MV-OE demonstrou uma CE_{50} melhor do que outros resultados encontrados para espécies de *Mentha*, descritas na literatura. Em um estudo realizado por (84), que testou quatro espécies de *Mentha*, a melhor CE_{50} encontrada relacionado ao extrato etanólico foi para *M. × piperita* var. *citrata* ($CE_{50} = 60,9 \mu\text{g/mL}$) coletado em junho. Em outro estudo (21), que testou nove espécies de *Mentha*, apenas o extrato etanólico de menta-de-cavalo (*M. longifolia*) apresentou CE_{50} semelhante ao MV-OE, enquanto os outros oito extratos não apresentaram essa eficácia. (85), avaliaram a atividade de eliminação de DPPH de *M. spicata* e encontraram seu $CE_{50} = 87,89 \mu\text{g/mL}$.

Em relação à eliminação de radicais ABTS de MV-OE, apresentou uma $CE_{50} = 322,87 \pm 5,28 \mu\text{g/mL}$, que é superior ao CE_{50} encontrada por (85) para *M. spicata* ($173,80 \mu\text{g/mL}$) e outros estudos da literatura (78, 86,87). Isso pode estar relacionado à dependência da capacidade antioxidante relativa (por exemplo, índice TEAC) da concentração de alguns antioxidantes, a dificuldade de algumas amostras completarem a reação em pouco tempo, pois após 30 min alguns antioxidantes ainda demonstram inibição gradual de radicais ABTS•+, e também o fato de que, às vezes, o número de grupos hidroxila se correlaciona exatamente com o valor de TEAC no ensaio ABTS/PP, conforme discutido por (88). 119

2.3. Determinação *in vitro* do fator de proteção solar (FPS), fator de proteção UVA (FPUVA) e comprimento de onda crítico

Os resultados de FPS *in vitro* obtidos revelaram que 6 das 8 formulações apresentaram FPS superior ao mínimo exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (91), que é ≥ 6 *in vivo*, Tabela 5. Formulações 5 (MV-OE 10% + metoxicinamato de etilhexila 1%) e 6 (MV-OE 10% + metoxicinamato de etilhexila 3%) demonstraram os maiores valores de FPS (23,20 e 30,63, respectivamente), mostrando que MV-OE foi capaz de potencializar o FPS de metoxicinamato de etilhexila, já que sem adição do extrato, as formulações compostas apenas pelo filtro químico (1 e 3%) tiveram os valores de FPS de 4,23 e 6,27. Esses resultados podem ser correlacionados com a concentração de polifenóis no MV-OE, como sugerimos em estudo anterior (28), onde pudemos observar que quanto maior o teor de polifenóis, maior o FPS de *M. x villosa*.

Além disso, em comparação com a literatura, o MV-OE apresenta resultados promissores, pois muitos estudos costumam utilizar metoxicinamato de etilhexila a 7% ou mais (92–95), o que tem sido relatado como um problema, pois é possível encontrar a presença desse filtro em quase todas as fontes de água. Experimentos *in vitro* mostraram que esse filtro químico aumentou a proliferação celular de células de câncer de mama MCF-7 e aumentou o peso uterino em ratos. Também tem sido encontrado em peixes, sendo causa de diversos tipos de danos a eles e bem como uma preocupação para a cadeia alimentar, visto que os níveis de bioacumulação de metoxicinamato de etilhexila estão aumentando, o que pode causar efeitos adversos no organismo humano (96-98).

Tabela 5. FPS, FPUVA e comprimento de onda crítico das formulações.

Formulações	1	2	3	4	5	6	7	8
FPS	5,35 ± 0,26	13,15 ± 0,67	17,09 ± 1,58	9,74 ± 2,20	23,20 ± 1,02	30,63 ± 2,10	4,23 ± 0,26	6,27 ± 0,47
FPUVA	4,27 ± 0,17	6,32 ± 0,39	8,01 ± 0,94	7,85 ± 1,88	12,25 ± 0,26	16,53 ± 1,84	1,65 ± 0,06	2,30 ± 0,18
Comprimento de onda crítico (nm)	374,10 ± 0,26	368,47 ± 0,32	366,10 ± 0,62	379,67 ± 0,25	374,67 ± 0,30	372,73 ± 0,40	330,23 ± 0,21	333,27 ± 1,62

Um protetor solar ideal requer atividade de amplo espectro contra a radiação UV, ou seja, deve proteger a pele contra a radiação UVA e UVB, pois ambas são igualmente perigosas para a pele. Assim, além do FPS, é importante avaliar o FPUVA, que segundo as Agências Reguladoras mundiais, deve corresponder, no mínimo, a 1/3 do valor do FPS (91,99,100). Com isso, os resultados também mostraram FPUVA promissores, principalmente para as formulações 5 e 6, já que FPUVA = 12,25 e 16,53, respectivamente, que são aproximadamente 1/3 do FPS, sugerindo uma proteção de amplo espectro (que é necessária ser 290 - 370 nm), que pode ser corroborada pelo comprimento de onda crítico em 374,67 e 372,73, respectivamente, demonstrando que MV-OE fornece uma proteção consistente contra UVA.

Assim, estudos onde baixas concentrações de filtros químicos como metoxicinamato de etilhexila são usados para compor protetores solares, mas as formulações (como as formulações 5 e 6) ainda são capazes de manter o FPS alto e proteger a pele contra UVA, são importantes para o desenvolvimento de produtos mais seguros, principalmente quando a ela está associada a atividade antioxidante, uma vez que a radiação UV induz fortemente a produção de radicais livres.

3. Conclusão

De acordo com os resultados desta pesquisa, é possível concluir que as melhores condições obtidas a partir do planejamento fatorial 2² foram etanol 70% e 5% de proporção de planta (relação pó:solvente), que foram capazes de aumentar o teor de polifenóis e AR, otimizando a extração. 29 polifenóis foram identificados por desreplicação (MSⁿ) e a análise de PCA revelou diferenças na extração de compostos entre as amostras de planejamento fatorial utilizadas. O MV-OE mostrou um aumento da atividade antioxidante pela atividade sequestrante de DPPH, quando comparado a um estudo anterior. Além disso, as formulações 5 e 6 demonstraram importantes valores de FPS, FPUVA e comprimento de onda crítico *in vitro*, atendendo o que é exigido internacionalmente. Assim, o MV-OE através das formulações 5 e 6 foi capaz de potencializar o FPS do metoxicinamato de etilhexila, utilizado em concentrações menores que as usuais, além de ser capaz de promover proteção de amplo espectro associado à sua atividade antioxidante, essencial para proteger totalmente a pele e produzir protetores solares melhores.

Declaração de contribuição de autoria CRediT

Juliana de M. Gomes: Concepção, Curadoria de dados, Análise formal, Administração do projeto, Investigação, Metodologia, Validação, Visualização, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Márcio Vinícius. C. Terto:** Concepção, Curadoria de Dados, Investigação, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Maria Beatriz M. Nunes:** Curadoria de dados, Investigação, análise formal, Metodologia. **Luiz Alberto L. Soares:** Curadoria de dados, Investigação, Metodologia, Validação, Software, Redação - revisão e edição, Supervisão. **Thalisson A. de Souza:** Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Software, Redação - revisão e edição. **Joanda Paolla R. e Silva:** Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Software, Redação - revisão e edição. **Samuel Cibulski:** Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Visualização, Redação - revisão e edição. **Vera Isaac:** Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Software, Supervisão. **Hariel M. U. Tesssaro:** Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Software. **Josean F. Tavares:** Concepção, Curadoria de dados, Administração do projeto, Visualização, Redação - revisão e edição, Supervisão. **Marcelo Sobral:** Concepção, Curadoria de dados, Administração do projeto, Visualização, Redação - revisão e edição, Supervisão.

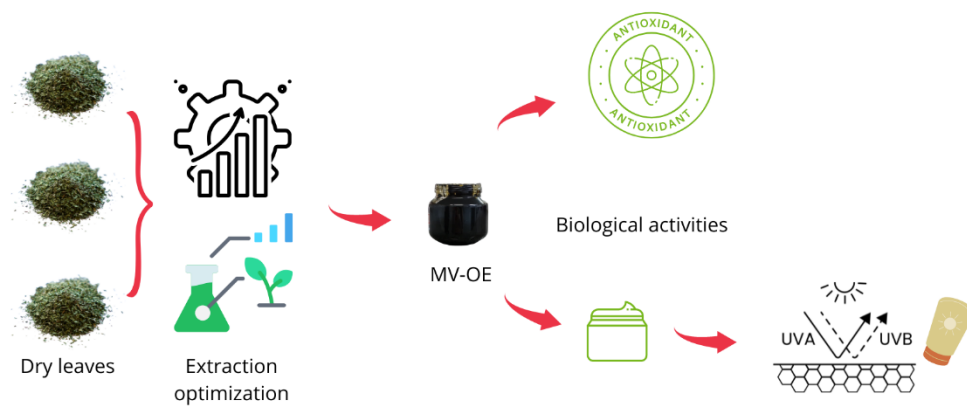
Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Universidade Federal da Paraíba, a Universidade Federal de Pernambuco e a Universidade Estadual de São Paulo pela utilização de suas instalações. Agradecemos também a todos os colaboradores do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, em especial Evandro Ferreira e Marcelo da Silva. À Prof^a Marianna Sobral e sua equipe pelo uso de suas instalações laboratoriais, e a farmácia Genuspharma® pelo fornecimento de materiais para este trabalho.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pelo Programa 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.

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

Resumo gráfico:

Apêndice A.

Material suplementar

Photoprotective and antioxidant activity of optimized *Mentha x villosa* extract

Juliana de Medeiros Gomes^a, Márcio Vinícius Cahino Terto^b, Maria Beatriz Mendes Nunes^a, Thalisson Amorim de Souza^a, Joanda Paolla Raimundo e Silva^a, Samuel Cibulski^c, Luiz Alberto Lira Soares^d, Vera Isaac^e, Haniel Maffei Umesaki Tessaro^e, Marcelo Sobral da Silva^a, Josean Fechine Tavares^{a,*}

^aLaboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, Univ Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^b União das Instituições Educacionais de São Paulo - UNIESP, Campus Cabedelo, Paraíba, Brazil.

^cCentro de Biotecnologia – CBiotec, Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Univ Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^dNúcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos, UFPE - Univ Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^eFaculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, DFM – Laboratório de Cosmetologia – LaCos, São Paulo, Brazil.

*Author correspondente

Email address: josean@lft.ufpb.br

Figura S1. Gráfico de Pareto correspondente ao teor de AR de amostras do planejamento fatorial.

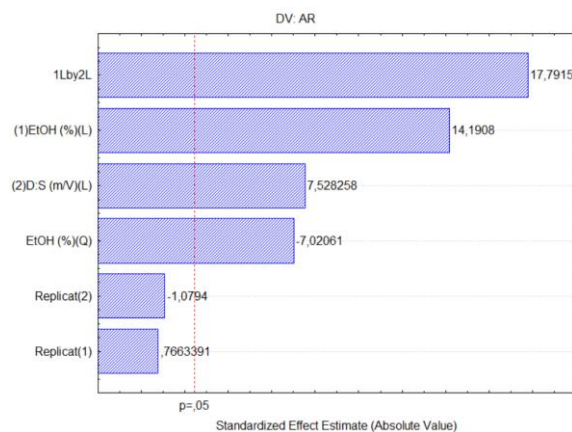


Figura S2. Gráfico de contornos correspondente ao teor de AR das amostras do planejamento fatorial.

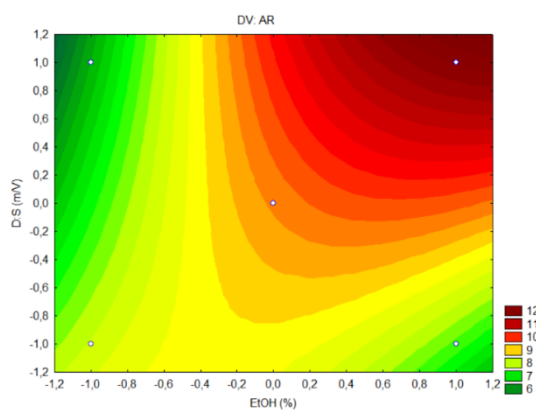


Figura S3. Gráfico de Pareto correspondente ao teor de polifenóis torais de amostras do planejamento fatorial.

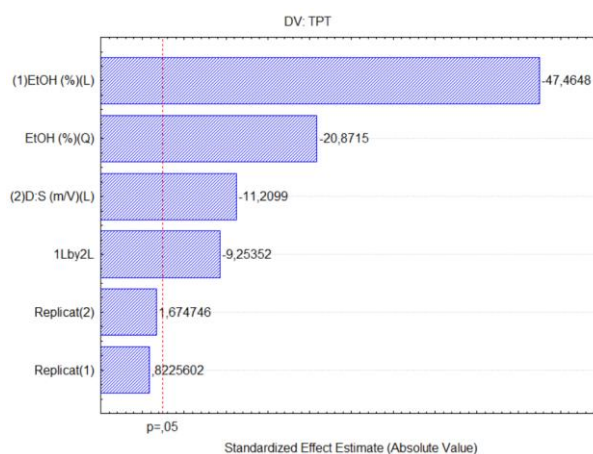


Figura S4. Gráfico de contornos correspondente ao teor de polifenóis das amostras do planejamento fatorial.

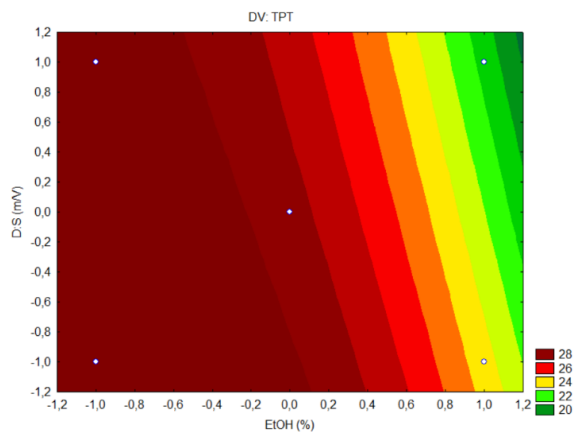


Figura S5. Gráfico de Pareto correspondente ao resíduo seco de amostras do planejamento fatorial.

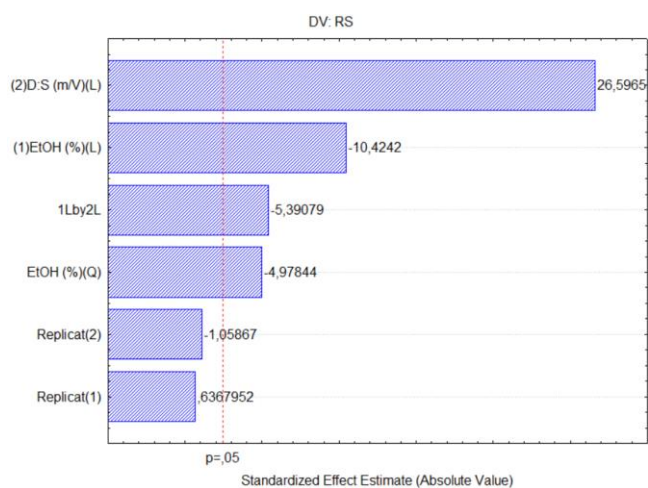


Figura S6. Gráfico de contornos correspondente ao teor resíduos secos das amostras do planejamento fatorial.

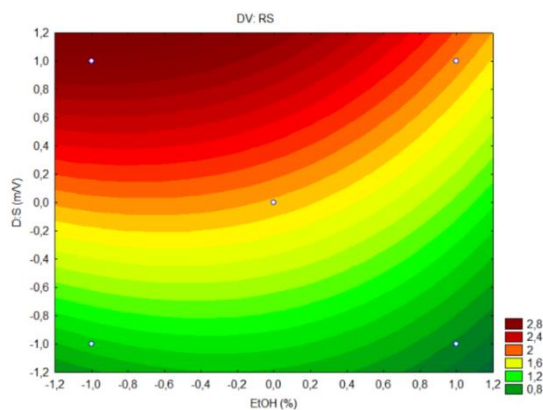


Figura S7. Gráfico de Pareto correspondente da eficiência da extração do planejamento fatorial.

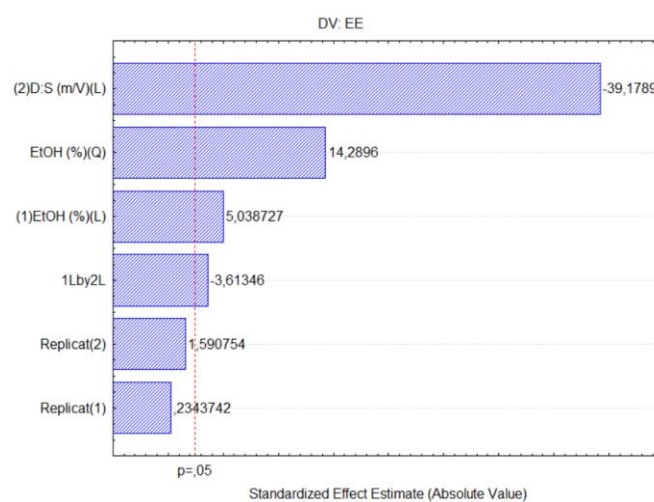


Figura S8. Gráfico de contornos correspondente da eficiência da extração do planejamento fatorial.

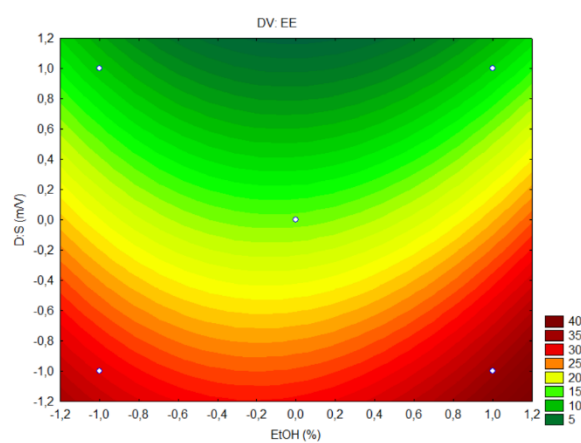


Figura S9. Gráfico de valores de predição e desejabilidade relacionados a amostras de planejamento fatorial.

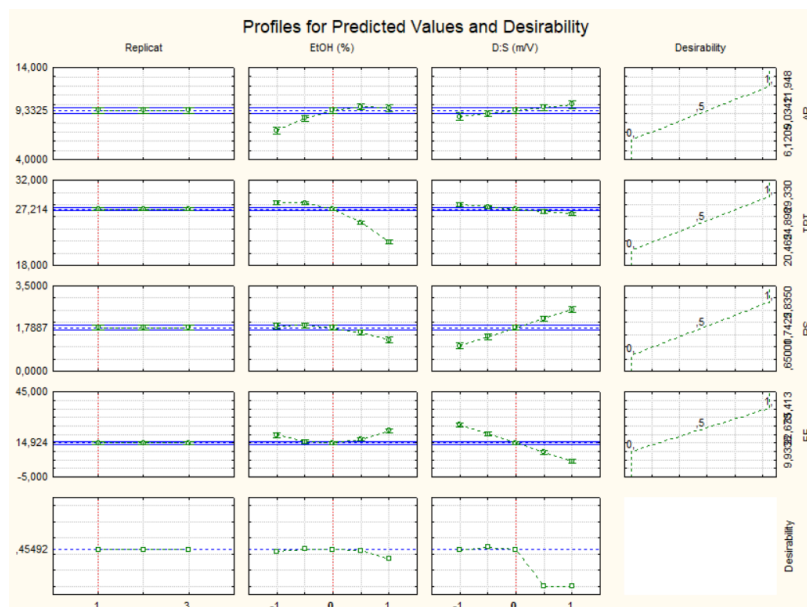


Tabela S1. Matriz bruta do planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais, apresentando todas as triplicatas utilizadas.

Design: $2^{**}(2-0)$ design (Spreadsheet3 in Workbook3)

	Replicat	EtOH (%)	D:S (m/V)	AR	TPT	RS	EE
1	1	-1,00000	-1,00000	8,05681896	28,077305	1,01	27,7993118
2	1	1,00000	-1,00000	7,76414817	23,3964539	0,71	32,952752
3	1	-1,00000	1,00000	6,41467453	28,1624113	2,835	9,93383116
4	1	1,00000	1,00000	11,7642959	20,6021277	1,795	11,4775084
5 (C)	1	0,00000	0,00000	9,40135092	27,5312033	1,63	16,8903088
6 (C)	1	0,00000	0,00000	9,18990173	27,3137133	1,8	15,1742852
7 (C)	1	0,00000	0,00000	9,0325763	26,81253	1,89	14,1865238
8	2	-1,00000	-1,00000	7,69907509	28,3255319	0,93	30,4575612
9	2	1,00000	-1,00000	7,47160993	23,8503546	0,675	35,338587
10	2	-1,00000	1,00000	6,2635404	28,2475177	2,785	10,1427353
11	2	1,00000	1,00000	11,947958	20,4650118	1,94	10,5489752
12 (C)	2	0,00000	0,00000	9,55900201	27,5524867	1,685	16,3516241
13 (C)	2	0,00000	0,00000	9,6080913	27,5052033	1,82	15,1127491
14 (C)	2	0,00000	0,00000	9,3673669	27,62577	1,88	14,6945585
15	3	-1,00000	-1,00000	8,35975935	29,33026	0,94	31,2024043
16	3	1,00000	-1,00000	7,01448898	23,0182033	0,65	35,4126205
17	3	-1,00000	1,00000	6,12045876	28,5312057	2,63	10,8483672
18	3	1,00000	1,00000	11,6551017	20,9141844	1,86	11,2441852
19 (C)	3	0,00000	0,00000	9,72108547	27,24752	1,79	15,2220782
20 (C)	3	0,00000	0,00000	8,83970672	27,5595733	1,755	15,7034606
21 (C)	3	0,00000	0,00000	9,0134552	27,40118	1,735	15,7931873

*D:S = razão droga:solvent; AR = acido rosmaríncio; TPT = teor de polifenóis totais; RS = resíduo seco; EE = eficiência da extração.

Tabela S2. Análise de ANOVA do teor de AR relacionada às asmtoras do planejamento fatorial.

ANOVA; Var.:AR; R-sqr=,97878; Adj.:96968 (Design: $2^{**}(2-0)$ design (Spreadsheet3 in Workbook3) in Fatoria_2^2_2022) 2 factors, 3 Blocks, 21 Runs; MS Pure Error=,0894609 DV: AR

	SS	df	MS	F	p
Blocks	0,11036	2	0,05518	0,6168	0,570679
(1)EtOH (%) (L)	18,01553	1	18,01553	201,3787	0,000008
EtOH (%) (Q)	4,40944	1	4,40944	49,2890	0,000417
(2)D:S (m/V) (L)	5,07017	1	5,07017	56,6747	0,000285
1L by 2L	28,31797	1	28,31797	316,5401	0,000002
Lack of Fit	0,67586	8	0,08448	0,9444	0,543567
Pure Error	0,53677	6	0,08946		
Total SS	57,13609	20			

Tabela S3. Análise de ANOVA do teor de polifenóis totais relacionada às asmotras do planejamento fatorial.

ANOVA; Var.:TPT; R-sqr=,99028; Adj.:98612 (Design: 2**(2-0) design (Spreadsheet3 in Workbook3) in Fatoria_2^2_2022) 2 factors, 3 Blocks, 21 Runs; MS Pure Error=,0546221 DV: TPT

	SS	df	MS	F	p
Blocks	0,3539	2	0,1769	3,239	0,111162
(1)EtOH (%) (L)	123,0586	1	123,0586	2252,909	0,000000
EtOH (%) (Q)	23,7944	1	23,7944	435,618	0,000001
(2)D:S (m/V) (L)	6,8640	1	6,8640	125,663	0,000030
1L by 2L	4,6772	1	4,6772	85,628	0,000090
Lack of Fit	1,2300	8	0,1537	2,815	0,112064
Pure Error	0,3277	6	0,0546		
Total SS	160,3057	20			

Tabela S4. Análise de ANOVA do teor resíduos secos relacionada às asmotras do planejamento fatorial.

ANOVA; Var.:RS; R-sqr=,98953; Adj.:98504 (Design: 2**(2-0) design (Spreadsheet3 in Workbook3) in Fatoria_2^2_2022) 2 factors, 3 Blocks, 21 Runs; MS Pure Error=,0093944 DV: RS

	SS	df	MS	F	p
Blocks	0,010674	2	0,005337	0,5681	0,594369
(1)EtOH (%) (L)	1,020833	1	1,020833	108,6635	0,000046
EtOH (%) (Q)	0,232840	1	0,232840	24,7848	0,002506
(2)D:S (m/V) (L)	6,645408	1	6,645408	707,3764	0,000000
1L by 2L	0,273008	1	0,273008	29,0606	0,001678
Lack of Fit	0,030215	8	0,003777	0,4020	0,883684
Pure Error	0,056367	6	0,009394		
Total SS	8,269345	20			

Tabela S5. Análise de ANOVA da eficiência de extração relacionada às asmotras do planejamento fatorial.

ANOVA; Var.:EE; R-sqr=,99189; Adj.:98841 (Design: 2**(2-0) design (Spreadsheet3 in Workbook3) in Fatoria_2^2_2022) 2 factors, 3 Blocks, 21 Runs; MS Pure Error=,9029094 DV: EE

	SS	df	MS	F	p
Blocks	3,561	2	1,781	1,972	0,219647
(1)EtOH (%) (L)	22,924	1	22,924	25,389	0,002360

EtOH (%) (Q)	184,367	1	184,367	204,193	0,000007
(2)D:S (m/V)(L)	1385,953	1	1385,953	1534,985	0,000000
1L by 2L	11,789	1	11,789	13,057	0,011184
Lack of Fit	7,734	8	0,967	1,071	0,480385
Pure Error	5,417	6	0,903		
Total SS	1621,746	20			

Figura S10. Curva de calibração de AR usada para determinar o teor de AR nas amostras do planejamento fatorial e em MV-OE.

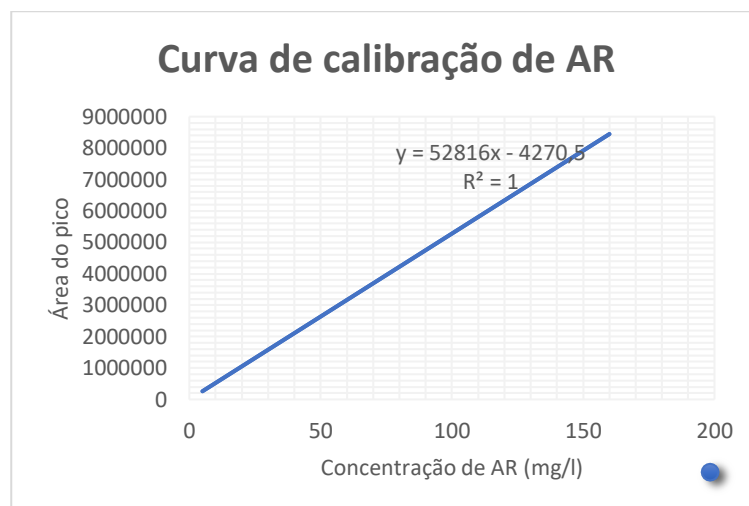


Tabela S6. Quantificação de AR por HPLC -DAD. Resultados em triplicada de todas as sete amostras produzidas para o planejamento fatorial e MV-OE.

		Quantificação de AR							MV-OE
Área dos picos em triplicata	Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	
	1	4251019	4096442	3228311	6209160	4961147	4849468	4766375	5426240
	2	4062073	3941935	3303881	6306163	5044412	5070339	4943198	5411538
	3	4411020	3700502	3383704	6151488	5130018	4664509	4756276	5304165
Concentração (mg/g)		1	2	3	4	5	6	7	
	1	80,56819	77,64148	64,14675	117,643	94,01351	91,89902	90,32576	
	2	76,99075	74,7161	62,6354	119,4796	95,59002	96,08091	93,67367	
	3	83,59759	70,14489	61,20459	116,551	97,21085	88,39707	90,13455	
Média		80,38551	74,16749	62,66225	117,8912	95,60479	92,12567	91,37799	101,9561907
Desvio padrão		3,307207	3,778287	1,471262	1,479977	1,598724	3,846934	1,99041	1,261788065
Desvio relativo (%)		4,114183	5,094263	2,347925	1,255376	1,672222	4,175746	2,178216	1,237578666

Figura S11. Curva de calibração de ácido gálico (AG) usada para determinar o teor de polifenóis totais nas amostras do planejamento fatorial e em MV-OE.

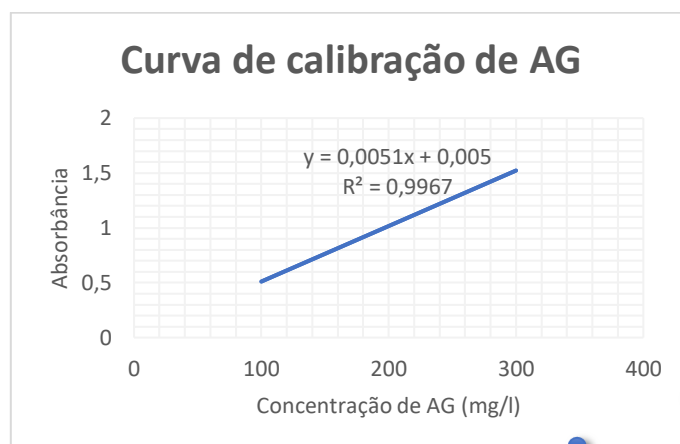


Figura S12. Curva de calibração de ácido ascórbico (AA, controle positivo) usada para determinar a CE_{50} do no ensaio de DPPH.

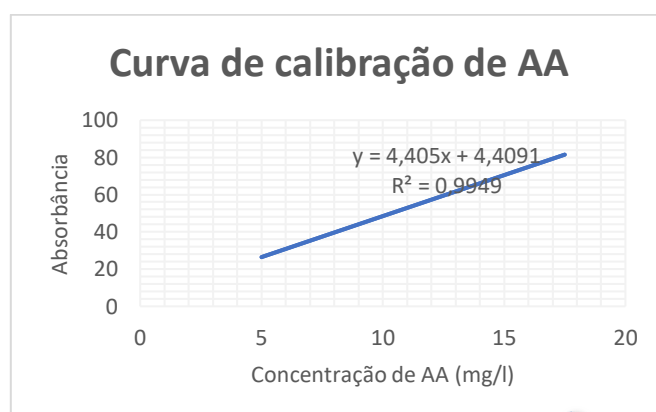


Tabela S7. Resultados da quantificação do teor de polifenóis totais. Resultados em triplicata de todas as sete amostras produzidas para a análise de planejamento fatorial e MV-OE.

Teor de polifenóis totais									
Triplicate	Concentração (mg/g)	1	2	3	4	5	6	7	MV-OE
	1	280,773	233,9645	281,6241	206,0213	275,312	273,1371	268,1253	261,3072
	2	283,2553	238,5035	282,4752	204,6501	275,5249	275,052	276,2577	266,2092
	3	293,3026	230,182	285,3121	209,1418	272,4752	275,5957	274,0118	266,2092
	Média	285,777	234,2167	283,1371	206,6044	274,4374	274,595	272,7983	264,5752
Desvio padrão	6,634495	4,166484	1,931024	2,301942	1,702615	1,291457	4,199819	2,830148	
Desvio relativo (%)	2,321564	1,778901	0,68201	1,114178	0,620402	0,470313	1,539533	1,069695	

Tabela S8. Resultados da quantificação de resíduos secos. Resultados em triplicata de todas as sete amostras produzidas para a análise de planejamento fatorial e MV-OE.

		Resíduos secos (RS)						
Experimentos		1	2	3	4	5	6	7
Teor RS (g)	1	0,0202	0,0142	0,0567	0,0359	0,0326	0,036	0,0378
	2	0,0186	0,0135	0,0557	0,0388	0,0337	0,0364	0,0376
	3	0,0188	0,013	0,0526	0,0372	0,0358	0,0351	0,0347
Média		0,0192	0,013567	0,055	0,0373	0,034033	0,035833	0,0367
Desvio padrão		0,000872	0,000603	0,002138	0,001453	0,001626	0,000666	0,001735
Desvio relativo (%)		4,54052	4,443032	3,886829	3,894327	4,777179	1,858138	4,727344
Resíduo seco (%)		1,01	0,71	2,835	1,795	1,63	1,8	1,89
		0,93	0,675	2,785	1,94	1,685	1,82	1,88
		0,94	0,65	2,63	1,86	1,79	1,755	1,735
Média (%)		0,96	0,678333	2,75	1,865	1,701667	1,791667	1,835

Tabela S9. Resultados em triplicata de todas as sete amostras produzidas para a análise de planejamento fatorial.

	Variáveis Naturais		Variáveis codificadas		Respostas (1)				Respostas (2)				Respostas (3)				Variáveis de respostas (média)			
Exp.	EtOH (%)	D:S (%; m/v)	EtOH (%)	D:S (%; m/v)	AR (g%)	TPT (g%)	RS (g%)	EE	AR (g%)	TPT (g%)	RS (g%)	EE	AR (g%)	TPT (g%)	RS (g%)	EE	AR (g%)	TPT (g%)	RS (g%)	EE
1	50	2,5	-1,00	-1,00	8,0568	28,077	1,01	27,799	7,6991	28,326	0,93	30,458	8,3598	29,33	0,94	31,202	8,038551	28,5777	0,96	29,81976
2	90	2,5	1,00	-1,00	7,7641	23,396	0,71	32,953	7,4716	23,85	0,675	35,334	7,0145	23,018	0,65	35,413	7,416749	23,42167	0,678333	34,56641
3	50	7,5	-1,00	1,00	6,4147	28,162	2,835	9,9338	6,2635	28,248	2,785	10,143	6,1205	28,531	2,63	10,848	6,266225	28,31371	2,75	10,30831
4	90	7,5	1,00	1,00	11,764	20,602	1,795	11,478	11,948	20,465	1,94	10,549	11,655	20,914	1,86	11,244	11,78912	20,66044	1,865	11,09022
5	70	5,0	0,00	0,00	9,4014	27,531	1,63	16,89	9,559	27,552	1,685	16,352	9,7211	27,248	1,79	15,222	9,560479	27,44374	1,701667	16,15467
6	70	5,0	0,00	0,00	9,1899	27,314	1,8	15,174	9,6081	27,505	1,82	15,113	8,8397	27,56	1,755	15,703	9,212567	27,4595	1,791667	15,33016
7	70	5,0	0,00	0,00	9,0326	26,813	1,89	14,187	9,3674	27,626	1,88	14,695	9,0135	27,401	1,735	15,793	9,137799	27,27983	1,835	14,89142

Figura S13. Curva de calibração de MV-OE construída para determinação da sua CE_{50} no ensaio de DPPH.

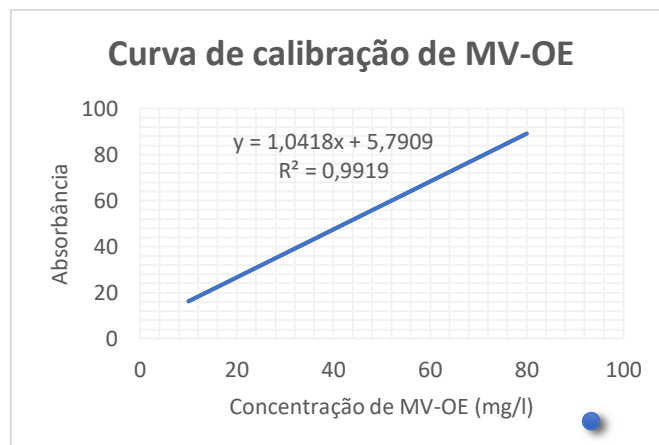


Figura S14. Curva de calibração de Trolox (controle positivo) construída para determinação da sua CE_{50} no ensaio do ABTS.

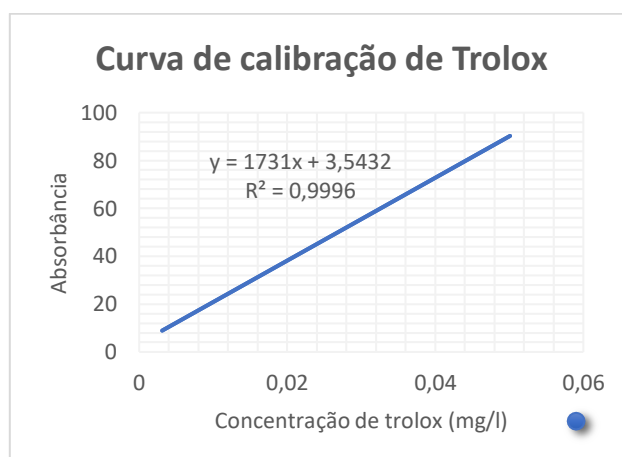


Figura S15. Curva de calibração de MV-OE construída para determinação da sua CE_{50} no ensaio do ABTS.

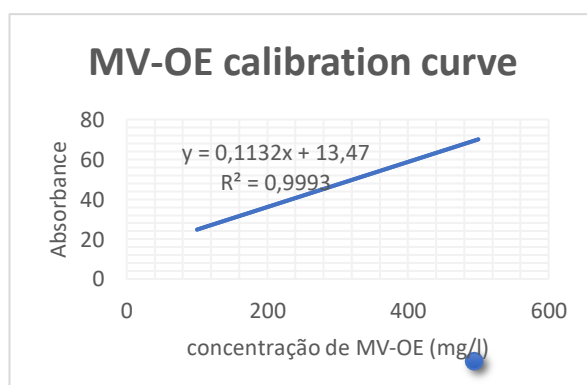


Tabela S10. Parâmetros cromatográficos usados para a quantificação de AR nas amostras do planejamento factorial e em MV-OE por HPLC-DAD.

Parâmetros	Condições do método
Fase móvel A Fase móvel B	Água acidificada (0,1% de H_3PO_4) Metanol
Gradiente	0 min – 38% B 5 min – 42% B 9 min – 42% B 12 min – 45% B 15 min – 50% B 17 min – 45% B 20 min – 45% B 24 min – 38% B
Fluxo	0.6 ml / min
Temperatura do forno	26° C
Solução diluente	MeOH: Água acidificada (0,1% de H_3PO_4) (1:1)
Tempo de corrida	24 min
Volume de injeção	20 μl
Comprimento de onda	330 nm
Coluna	Kromasil® C18 (250 $\times$ 4.6 mm d.i. filled with particles 5 μm)

Tabela S11. Resultados em triplicata de todas as formulações utilizadas em testes fotoprotetores.

Formulação	Triplicata	FPS	Média FPS	Desvio padrão FPS	FPUVA	Média de FPUVA	Desvio padrão do FPUVA	λc (nm)	Média λc	Desvio padrão do λc
1	1	5,61			4,44			374,4		
	2	5,33	5,34666667	0,25540817	4,26	4,266666667	0,170098011	374,0	374,1	0,264575
	3	5,10			4,10			373,9		
2	1	13,44			6,47			368,7		
	2	12,39	13,15333333	0,66785727	5,87	6,316666667	0,39310728	368,6	368,4667	0,321455
	3	13,63			6,61			368,1		
3	1	18,91			9,09			366,6		
	2	16,27	17,09333333	1,57557397	7,40	8,01	0,937923238	365,4	366,1	0,6245
	3	16,10			7,54			366,3		
4	1	12,32			10,00			379,9		
	2	8,12	9,73666667	2,26071523	6,51	7,846666667	1,882879001	379,7	379,6667	0,251661
	3	8,77			7,03			379,4		
5	1	23,54			12,41			374,6		
	2	22,05	23,2	1,02327904	12,40	12,253333333	0,262741952	374,4	374,6667	0,305505
	3	24,01			11,95			375,0		
6	1	30,49			16,10			372,3		
	2	32,79	30,6266667	2,09834061	18,59	16,563333333	1,839302404	373,1	372,7333	0,404145
	3	28,60			15,00			372,8		
7	1	4,19			1,64			330,0		
	2	4,51	4,23	0,26229754	1,72	1,656666667	0,056862407	330,4	330,2333	0,208167
	3	3,99			1,61			330,3		
8	1	5,87	6,26666667	0,47289886	2,13	2,296666667	0,181475435	331,4	333,2667	1,616581
	2	6,79			2,49			334,2		

3 6,14

2,27

334,2

Figura S16. Cromatograma do extrato de *Mentha x villosa* extract avaliado por HPLC-MS-DAD-ESI.

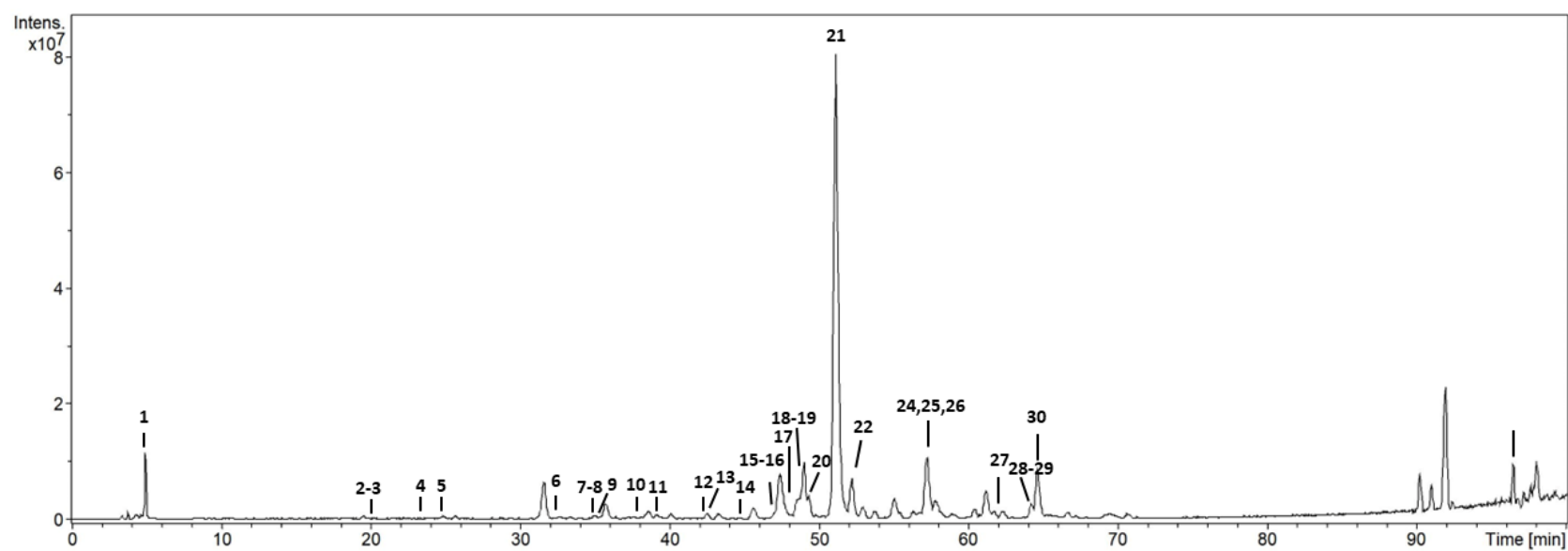


Figura S17. Cromatograma do experimento 1 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 17.98; 17.71 e 18.87.

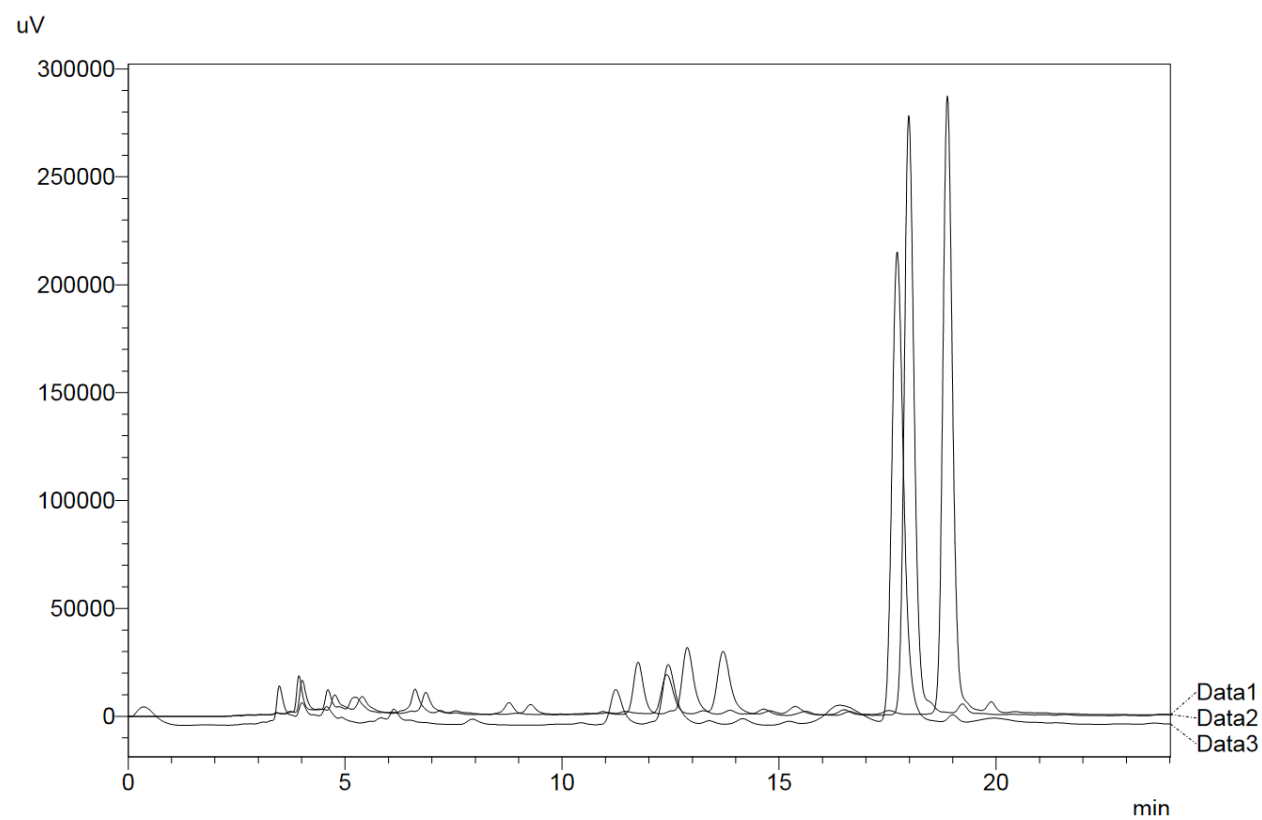


Figura S18. Cromatograma do experimento 2 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 17.10; 17.31 e 18.70.

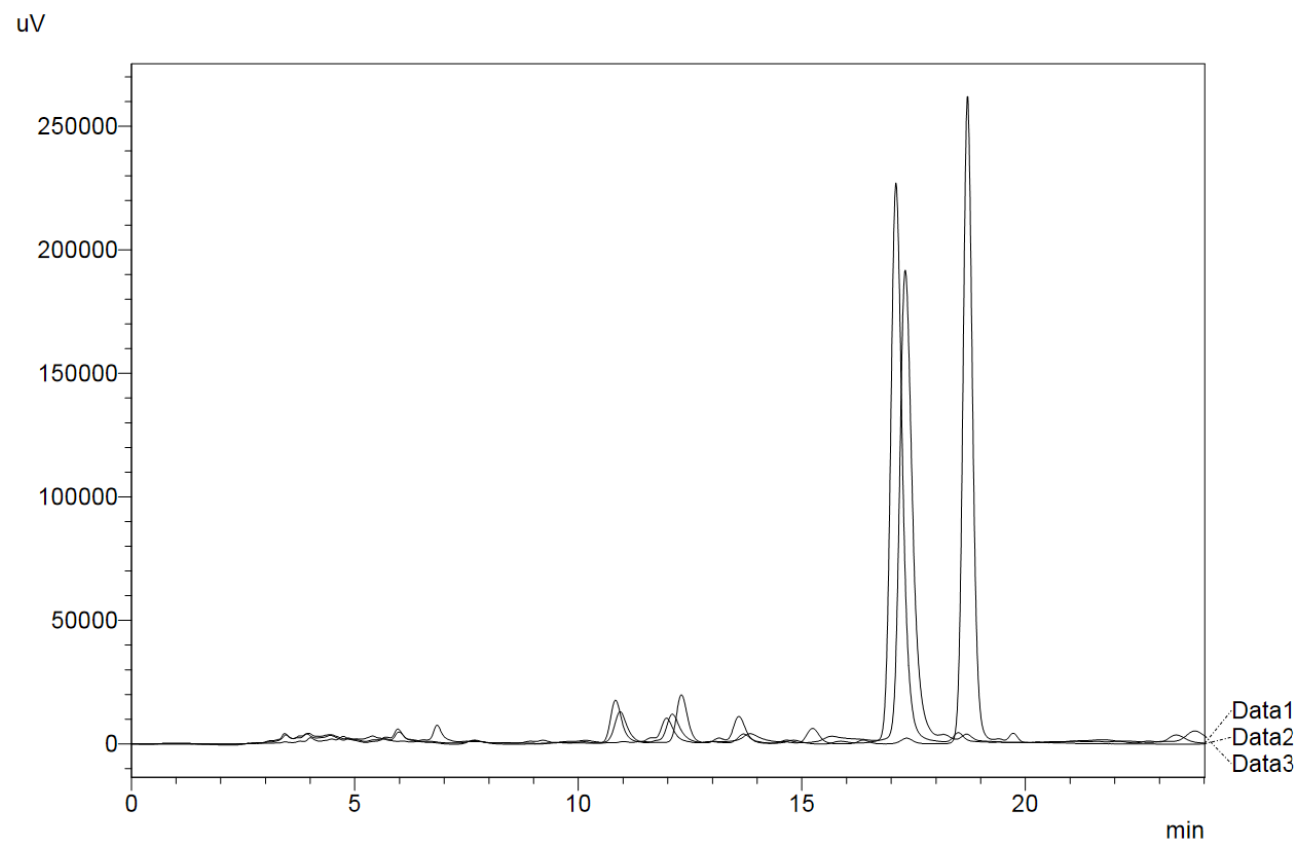


Figura S19. Cromatograma do experimento 3 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 17.75; 17.63 e 18.17.

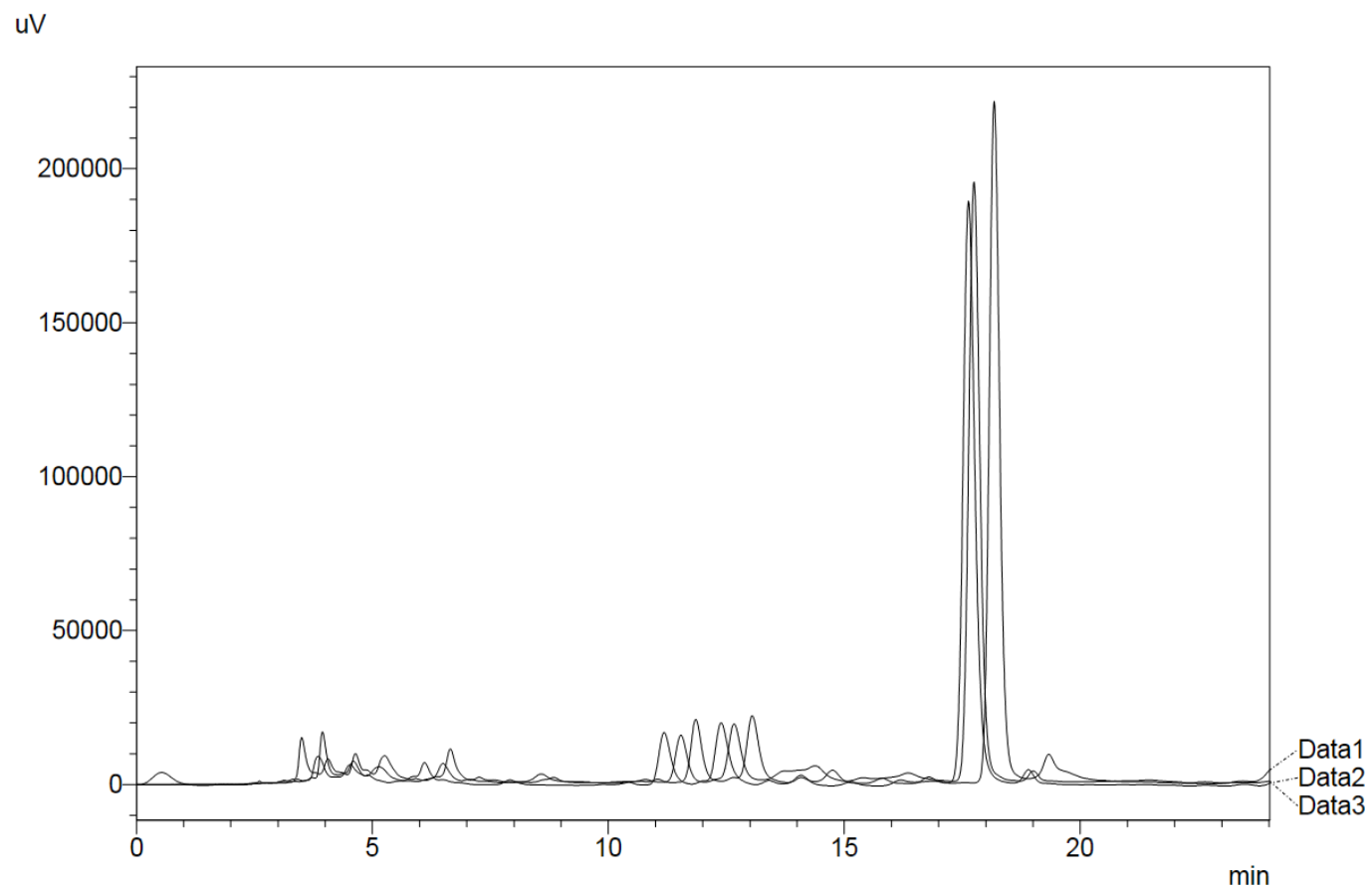


Figura S20. Cromatograma do experimento 4 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 16.54; 17.36 e 17.34.

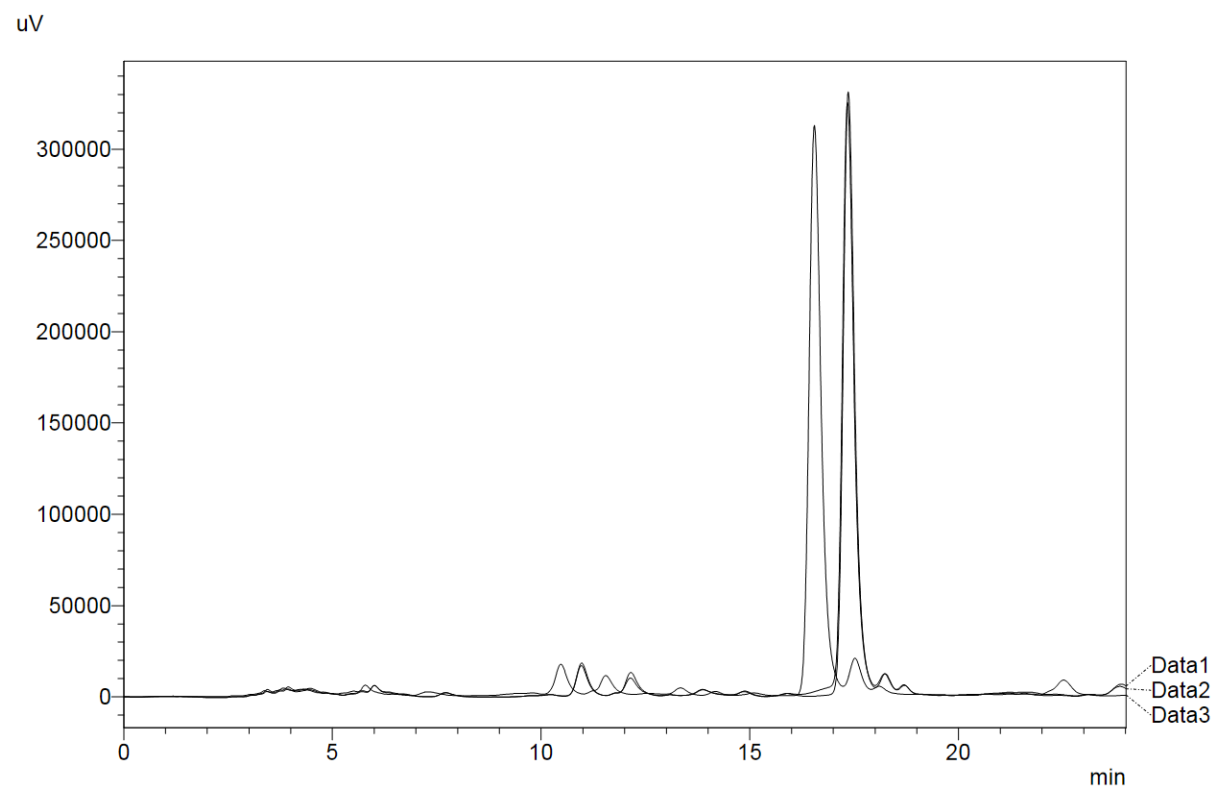


Figura S21. Cromatograma do experimento 5 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 17.24; 17.81 e 18.24.

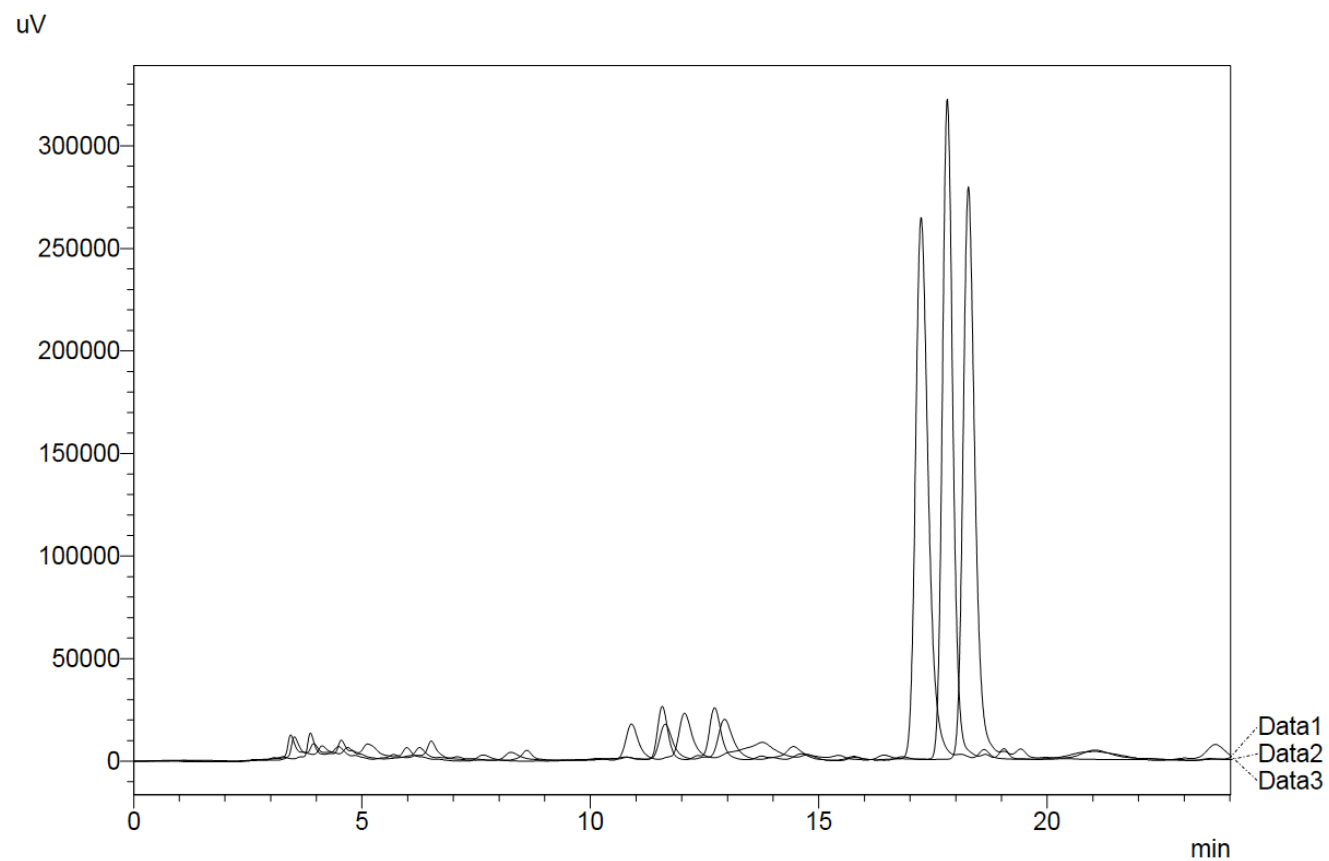


Figura S21. Cromatograma do experimento 6 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 16.35; 16.54 e 17.26.

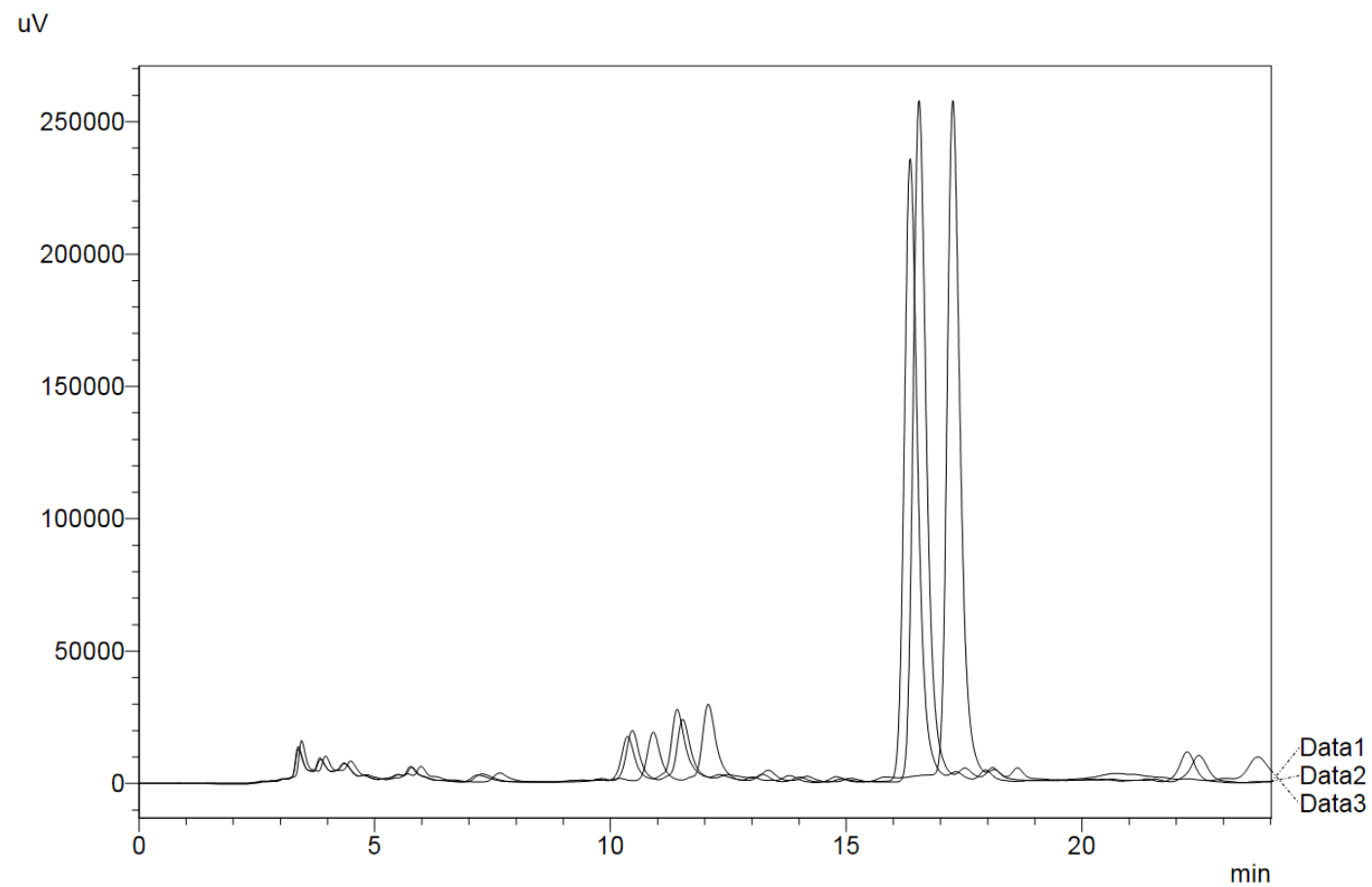
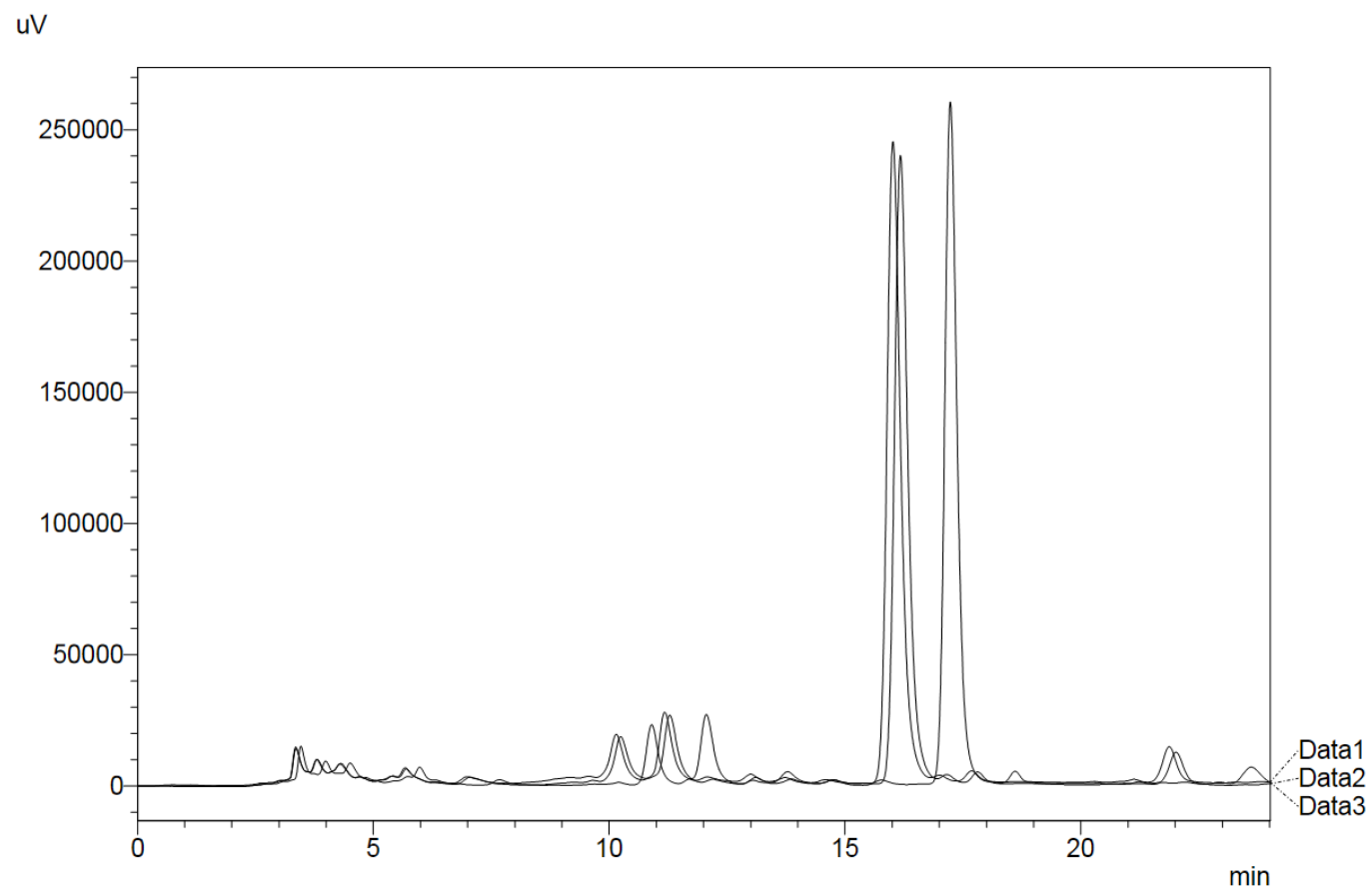


Figure S22. Cromatograma do experimento 7 (em triplicata) do planejamento fatorial obtido para determinação do teor de AR. Tempo de retenção do AR = 16.01; 16.17 e 17.23.



Referências

1. Passeron T, Bouillon R, Callender V, Cestari T, Diepgen TL, Green AC, et al. Sunscreen photoprotection and vitamin D status. *British Journal of Dermatology*. 2019 Nov 15;181(5).
2. Marionnet C, Tran C, Bastien P, Bielicki A, Golebiewski C, Vieu DL, et al. A broader filtration of UVA1 wavelengths improves skin photoprotection. *J Dermatol Sci*. 2018 Sep;91(3).
3. Balogh TS, Pedriali CA, Baby AR, Velasco MVR, Kaneko TM. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção*. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):732–42.
4. Friedman BJ, Lim HW, Wang SQ. Photoprotection and Photoaging. In: *Principles and Practice of Photoprotection* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 61–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-29382-0_4
5. Torres-Contreras AM, Garcia-Baeza A, Vidal-Limon HR, Balderas-Renteria I, Ramírez-Cabrera MA, Ramirez-Estrada K. Plant Secondary Metabolites against Skin Photodamage: Mexican Plants, a Potential Source of UV-Radiation Protectant Molecules. *Plants* [Internet]. 2022 Jan 15;11(2):220. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/2/220>
6. el Aanachi S, Gali L, Nacer SN, Bensouici C, Dari K, Aassila H. 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. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2020 Oct;29.
7. Faccio G. Plant Complexity and Cosmetic Innovation. *iScience*. 2020 Aug;23(8).
8. de Araújo FF, de Paulo Farias D, Neri-Numa IA, Pastore GM. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chem* [Internet]. 2021 Feb;338:127535. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620313972>
9. Ferreira M, Sousa P, Machado J, Soares L. EXTRACTION OF MONOMERS OF HYDROLYSABLE TANNINS FROM PODS OF *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. QUEIROZ: EFFECTS OF SOLVENT AND AMOUNT OF DRUG USING RESPONSE-SURFACE METHODOLOGY AND DESIRABILITY PROFILE. *Quim Nova* [Internet]. 2020; Available from: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9088&nomeArquivo=AR20200022.pdf
10. Tenório CJL, Silva SL, Raimundo e Silva JP, Tavares JF, Ferreira MRA, Soares LAL. HPLC-ESI-MSn Analysis and Validation of UV-Vis and RP-HPLC-PDA Methods for Polyphenols Quantification from *Hymenaea eriogyne*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [Internet]. 2022 Jun 12;32(3):365–74. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s43450-022-00260-y>
11. Cabral B, Gonçalves TAF, Abreu LS, Andrade AWL, de Azevedo F de LAA, de Castro FD, et al. Cardiovascular Effects Induced by Fruit Peels from *Passiflora edulis* in Hypertensive Rats and Fingerprint Analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. *Planta Med* [Internet]. 2022 Apr 3;88(05):356–66. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1385-8863>

12. Dantas CAG, Abreu LS, Cunha HN, Veloso CAG, Souto AL, Fátima Agra M, et al. Dereplication of phenolic derivatives of three *Erythroxylum* species using liquid chromatography coupled with ESI-MS n and HRESIMS. *Phytochemical Analysis* [Internet]. 2021 Nov 18;32(6):1011–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.3043>
13. Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018 Jul;133:301–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661817310253>
14. Skendi A, Irakli M, Chatzopoulou P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J Appl Res Med Aromat Plants* [Internet]. 2017 Sep;6:62–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214786117300724>
15. Charles Dorni AI, Amalraj A, Gopi S, Varma K, Anjana SN. Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. *J Appl Res Med Aromat Plants* [Internet]. 2017 Dec;7:1–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214786117302747>
16. Lee CJ, Chen LG, Chang TL, Ke WM, Lo YF, Wang CC. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chem* [Internet]. 2011 Feb;124(3):833–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610008265>
17. el Menyiy N, Mrabti HN, el Omari N, Bakili AE, Bakrim S, Mekkaoui M, et al. Medicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Mentha spicata*. Ramachandran S, editor. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [Internet]. 2022 Apr 12;2022:1–32. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2022/7990508/>
18. Alamgeer, Asif H, Chohan TA, Irfan HM, Asim MH, Bukhari SNA, et al. Ex vivo, in vitro, and in silico approaches to unveil the mechanisms underlying vasorelaxation effect of *Mentha Longifolia* (L.) in porcine coronary artery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2022 Sep;153:113298. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332222006874>
19. Mahendran G, Verma SK, Rahman LU. The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata* L.): A review. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021 Oct;278:114266. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874121004931>
20. Anwar F, Abbas A, Mehmood T, Gilani A, Rehman N. *Mentha*: A genus rich in vital nutraceuticals—A review. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2019 Oct 9;33(10):2548–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.6423>
21. Park Y, Baek SA, Choi Y, Kim J, Park S. Metabolic Profiling of Nine *Mentha* Species and Prediction of Their Antioxidant Properties Using Chemometrics. *Molecules* [Internet]. 2019 Jan 11;24(2):258. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/2/258>
22. Ćavar Zeljković S, Šišková J, Komzáková K, de Diego N, Kaffková K, Tarkowski P. Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected *Mentha* Species. *plants*. 2021;10:1–18.
23. Tekel'ová D, Fialová SB, Tóth J, Czige S. Phenolic compounds in leaves insertions of *Mentha × villosa* Huds. cv. *Snežná*. *Farmaceuticke Spolecnosti*. 2016;65(6):161–5.

24. Fialovaa S, Veizerova L, Nosalova V, Drabikova K, Tekelova D, Grancai D, et al. Water Extract of *Mentha x villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. *Nat Prod Commun* [Internet]. 2015 Jun;10(6):937–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197521>
25. Brosková Z, Drábiková K, Sotníková R, Fialová S, Knezl V. Effect of Plant Polyphenols on Ischemia-Reperfusion Injury of the Isolated rat Heart and Vessels. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2013 Jul 30;27(7):1018–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.4825>
26. Kapp K, Püssa T, Orav A, Roasto M, Raal A, Vuorela P, et al. Chemical Composition and Antibacterial Effect of *Mentha* spp. Grown in Estonia. *Nat Prod Commun* [Internet]. 2020 Dec 8;15(12):1934578X2097761. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X20977615>
27. Kapp K. Polyphenolic and essential oil composition of *Mentha* and their antimicrobial effect [Internet] [Dissertation]. University of Helsinki, Finland; 2015. Available from: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/158806/polyphen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. de Medeiros Gomes J, Cahino Terto MV, Golzio do Santos S, Sobral da Silva M, Fachine Tavares J. Seasonal Variations of Polyphenols Content, Sun Protection Factor and Antioxidant Activity of Two Lamiaceae Species. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Jan 16;13(1):110. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/1/110>
29. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde B. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição [Internet]. 2019. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br>
30. Brito TG da S, Silva APS da, Cunha RX da, Fonseca CSM da, Araújo TF da S, Campos JK de L, et al. Anti-inflammatory, hypoglycemic, hypolipidemic, and analgesic activities of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Brazilian grape) epicarp. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021 Mar;268:113611. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874120334991>
31. Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem*. 2012;84(11):5035–9.
32. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999 Jan 1;299:152–78.
33. Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Miguita CH. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quim Nova*. 2009;32(2).
34. Moreira DC. ABTS decolorization assay – in vitro antioxidant capacity. [Internet]. 2019. Available from: <https://www.protocols.io/view/abts-decolorization-assay-in-vitro-antioxidant-cap-14egnxk86l5d/v1>
35. Kale S, Ghoge P, Ansari A, Waje A, Sonawane A. Formulation and in-vitro determination of Sun Protection Factor of *Nigella sativa* Linn. Seed Oil Sunscreen Cream. *Int J Pharmtech Res*. 2010;2(4):2194–7.

36. Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, Nash JF. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2000 Dec;43(6):1024–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962200292529>
37. Springsteen A, Yurek R, Frazier M, Carr KF. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance¹This paper is dedicated to the memory of our colleague and friend, Mona Yurek (1959–1998), who was involved in the quantitation and methodology of the sample preparation. *Anal Chim Acta* [Internet]. 1999 Feb;380(2–3):155–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267098005777>
38. Bastos D, Saldanha L, Catharino R, Sawaya A, Cunha I, Carvalho P, et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules* [Internet]. 2007 Mar 12;12(3):423–32. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/12/3/423>
39. Saldanha L, Vilegas W, Dokkedal A. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules* [Internet]. 2013 Jul 16;18(7):8402–16. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/7/8402>
40. Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, di Lecce G, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). *Food Chem* [Internet]. 2011 Dec;129(3):877–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611007278>
41. Catarino MD, Silva AMS, Saraiva SC, Sobral AJFN, Cardoso SM. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. *Arabian Journal of Chemistry* [Internet]. 2018 Jan;11(1):62–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535215001203>
42. Liu AH, Guo H, Ye M, Lin YH, Sun JH, Xu M, 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. *J Chromatogr A* [Internet]. 2007 Aug;1161(1–2):170–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307009867>
43. Cirlini M, Mena P, Tassotti M, Herrlinger K, Nieman K, Dall'Asta C, et al. Phenolic and Volatile Composition of a Dry Spearmint (*Mentha spicata* L.) Extract. *Molecules*. 2016 Aug 3;21(8).
44. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2005 May 1;53(10):3821–32. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf050046h>
45. Lin LZ, Harnly JM. Identification of Hydroxycinnamoylquinic Acids of Arnica Flowers and Burdock Roots Using a Standardized LC-DAD-ESI/MS Profiling Method. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2008 Nov 12;56(21):10105–14. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf802412m>
46. Zhang JY, Zhang Q, Li N, Wang ZJ, Lu JQ, Qiao YJ. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids

- isomers in Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-ESI-MSn. *Talanta* [Internet]. 2013 Jan;104:1–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914012009447>
47. Elsadig Karar MG, 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*. 2016;01(02).
 48. Hofmann T, Nebhaj 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. *Ind Crops Prod*. 2016 Sep;87.
 49. Chen H, Zhang Q, Wang X, Yang J, Wang Q. Qualitative Analysis and Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS n. *Phytochemical Analysis* [Internet]. 2011 May;22(3):247–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1272>
 50. Kang J, Price WE, Ashton J, Tapsell LC, Johnson S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chem* [Internet]. 2016 Nov;211:215–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616307336>
 51. Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Al-Nuri M, Warad I, Segura-Carretero A. Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. *Food Chem*. 2019 May;279.
 52. Taamalli A, Arráez-Román D, Abaza L, Iswaldi I, Fernández-Gutiérrez A, Zarrouk M, et al. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical Analysis*. 2015 Sep;26(5).
 53. Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena extract by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2010 Sep;33(17–18).
 54. Marzouk MM, Hussein SR, Elkhateeb A, El-shabrawy M, Abdel-Hameed ESS, Kawashty SA. Comparative study of *Mentha* species growing wild in Egypt: LC-ESI-MS analysis and chemosystematic significance. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2018 Aug;116–22. Available from: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=2705
 55. Hamany Djande CY, Steenkamp PA, Piater LA, Tugizimana F, Dubery IA. Hordatinins and Associated Precursors Dominate Metabolite Profiles of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings: A Metabolomics Study of Five Cultivars. *Metabolites* [Internet]. 2022 Mar 31;12(4):310. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/4/310>
 56. Silva DB, Turatti ICC, Gouveia DR, Ernst M, Teixeira SP, Lopes NP. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. *Sci Rep* [Internet]. 2015 May 7;4(1):4309. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep04309>
 57. Zhu Z, Zhang H, Zhao L, Dong X, Li X, Chai Y, et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia 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*. 2007 Jun 30;21(12).
58. Zeng G, Xiao H, Liu J, Liang X. Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006 Feb 15;20(3).
 59. Fabre N, Rustan I, Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001 Jun;12(6).
 60. Zhao HY, Fan MX, Wu X, Wang HJ, Yang J, Si N, et al. Chemical Profiling of the Chinese Herb Formula Xiao-Cheng-Qi Decoction Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2013 Mar 1;51(3):273–85. Available from: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bms138>
 61. Brito A, Ramirez J, Areche C, Sepúlveda B, Simirgiotis M. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules* [Internet]. 2014 Oct 29;19(11):17400–21. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/11/17400>
 62. Wang S, Liu L, Wang L, Hu Y, Zhang W, Liu R. 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*. 2012 Sep 3;17(9).
 63. Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem* [Internet]. 2015 Mar;170:378–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614013211>
 64. Shi P, He Q, Song Y, Qu H, Cheng Y. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus *Citrus* in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2007 Aug;598(1):110–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007012299>
 65. Pereira OR, Peres AM, Silva AMS, Domingues MRM, Cardoso SM. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International* [Internet]. 2013 Dec;54(2):1773–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005036>
 66. Zhang Y, Xiong H, Xu X, Xue X, Liu M, Xu S, et al. Compounds Identification in Semen *Cuscutae* by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UPLCs) Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* [Internet]. 2018 May 17;23(5):1199. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1199>
 67. Li ZH, Guo H, Xu WB, Ge J, Li X, Alimu M, et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves

- by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2016 May;54(5):805–10. Available from: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bmw016>
68. Spínola V, Pinto J, Castilho PC. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC–DAD–ESI–MSⁿ and screening for their antioxidant activity. *Food Chem* [Internet]. 2015 Apr;173:14–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614015520>
 69. Wang S, Liu L, Wang L, Hu Y, Zhang W, Liu R. 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*. 2012 Sep 3;17(9).
 70. Justesen U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J Chromatogr A* [Internet]. 2000 Dec;902(2):369–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730000861X>
 71. Barros L, Dueñas M, Dias MI, Sousa MJ, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem* [Internet]. 2013 Jan;136(1):1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612012228>
 72. Zhao Y, Chang YS, Chen P. Differentiation of *Aurantii Fructus Immaturus* from *Poniciri Trifoliatae Fructus Immaturus* using flow-injection mass spectrometric (FIMS) metabolic fingerprinting method combined with chemometrics. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2015 May;107:251–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514006426>
 73. Liu AH, Guo H, Ye M, Lin YH, Sun JH, Xu M, 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. *J Chromatogr A*. 2007 Aug;1161(1–2).
 74. Salem MA, Radwan RA, Mostafa ES, Alseekh S, Fernie AR, Ezzat SM. Using an UPLC/MS-based untargeted metabolomics approach for assessing the antioxidant capacity and anti-aging potential of selected herbs. *RSC Adv* [Internet]. 2020;10(52):31511–24. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA06047J>
 75. Osman IH. In Vitro Antioxidant activity of *Mentha pulegium* from Saudi Arabia. *Bioscience Research*. 2013 Jan 1;10:33–7.
 76. YUMRUTAS O, D. SAYGIDEGER S. Determination of antioxidant and antimutagenic activities of *Phlomis armeniaca* and *Mentha pulegium*. *J Appl Pharm Sci*. 2012;02(01):36–40.
 77. Benabdallah A, Rahmoune C, Boumendjel M, Aissi O, Messaoud C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2016 Sep;6(9):760–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169116306074>

78. Fatiha B, Didier H, Naima G, Khodir M, Martin K, Léocadie K, et al. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015 Nov;74:722–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015300467>
79. Kaur P, Purewal SS, Sandhu KS, Kaur M. DNA damage protection: an excellent application of bioactive compounds. *Bioresour Bioprocess* [Internet]. 2019 Dec 21;6(1):2. Available from: <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-019-0237-9>
80. Almeida AF, dos Santos CN, Ventura MR. Polyphenols, their Metabolites and Derivatives as Drug Leads. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2018 Sep 24;24(19):2188–207. Available from: <https://www.eurekaselect.com/162194/article>
81. Saewan N, Jimtaisong A. Natural products as photoprotection. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2015 Mar;14(1):47–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jocd.12123>
82. Fernando PMDJ, Piao MJ, Kang KA, Ryu YS, Hewage SRKM, Chae SW, et al. Rosmarinic Acid Attenuates Cell Damage against UVB Radiation-Induced Oxidative Stress via Enhancing Antioxidant Effects in Human HaCaT Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016 Jan 1;24(1).
83. 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*. 2011 Dec;1808(12).
84. Ranjbar M, Kiani M, Nikpay A. Antioxidant and scolicidal activities of four Iranian *Mentha* species (Lamiaceae) in relation to phenolic elements. *Journal of Herbmed Pharmacology* [Internet]. 2020 May 2;9(3):200–8. Available from: <http://herbmedpharmacol.com/Article/jhp-20422>
85. Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2008;7(3):203–9.
86. Abbou F, Azzi R, Ouffai K, el Haci IA, Belyagoubi-Benhammou N, Bensouici C, et al. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory properties of phenolic-rich fractions from the aerial parts of *Mentha pulegium* L. *South African Journal of Botany* [Internet]. 2022 May;146:196–204. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629921004403>
87. el Hassani FZ. Characterization, activities, and ethnobotanical uses of *Mentha* species in Morocco. *Heliyon* [Internet]. 2020 Nov;6(11):e05480. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020323239>
88. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 8;21(3):1131. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1131>
89. Ding HY, Chou TH, Liang CH. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. *Food Chem* [Internet]. 2010 Nov;123(2):254–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610004814>

90. Zuo AR, Dong HH, Yu YY, Shu QL, Zheng LX, Yu XY, et al. The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. *Chin Med* [Internet]. 2018 Dec 19;13(1):51. Available from: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0206-9>
91. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde B. RESOLUÇÃO - RDC N° 629, DE 10 DE MARÇO DE 2022. 2022; Available from: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-629-de-10-de-marco-de-2022-386099957>
92. Mota MD, Costa RYS, Guedes A aa S, Silva LCRC e, Chinalia FA. Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. *J Photochem Photobiol B*. 2019 Dec;201.
93. Mota MD, da Boa Morte AN, Silva LCRC e, Chinalia FA. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. *J Photochem Photobiol B*. 2020 Apr;205.
94. Bhattacharya S, Sherje AP. Development of resveratrol and green tea sunscreen formulation for combined photoprotective and antioxidant properties. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020 Dec;60:102000. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224720312892>
95. Morocho-Jácome AL, Freire TB, Oliveira AC, Almeida TS, Rosado C, Velasco MVR, et al. In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Jul 29;154
96. Silva ACP, Santos BAMC, Castro HC, Rodrigues CR. Ethylhexyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane: Toxicological effects on marine biota and human concerns. *Journal of Applied Toxicology* [Internet]. 2022 Jan 7;42(1):73–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.4210>
97. Schneider SL, Lim HW. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2019 Jan;80(1):266–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962218321893>
98. Huang Y, Law JCF, Zhao Y, Shi H, Zhang Y, Leung KSY. Fate of UV filter Ethylhexyl methoxycinnamate in rat model and human urine: Metabolism, exposure and demographic associations. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2019 Oct;686:729–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719325008>
99. González S, Aguilera J, Berman B, Calzavara-Pinton P, Gilaberte Y, Goh CL, et al. Expert Recommendations on the Evaluation of Sunscreen Efficacy and the Beneficial Role of Non-filtering Ingredients. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2022 Mar 31;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.790207/full>
100. Tortini G, Ziosi P, Cesa E, Molesini S, Baldini E, de Lucia D, et al. Criticisms in the Development of High-Protection and Broad-Spectrum “Natural/Organic” Certifiable Sunscreen. *Cosmetics* [Internet]. 2022 May 31;9(3):56. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-9284/9/3/56>

Conclusão

5. Conclusão

A partir de todos os resultados encontrados, pode-se concluir que a sazonalidade parece não apresentar uma influência direta na produção quantitativa de compostos fenólicos, flavonoides e ácido rosmarínico e o melhor mês para a coleta de *Mentha x villosa* visando altos teores desses metabólitos é setembro. Foi visto também que maiores concentrações de polifenóis e flavonoides favorecem o aumento do FPS na espécie e que o teor de ácido rosmarínico influencia a melhora da atividade antioxidante. Além disso, foi possível observar que quanto maior o nível de radiação, maior o teor de polifenóis e dessa forma, maior o FPS que o extrato pode oferecer, bem como melhor a atividade antioxidante. Em relação a precipitação, foi observado que ela parece não afetar as atividades fotoprotetoras e antioxidantes da espécie.

Pode-se concluir também que através da otimização de extração utilizada, as melhores condições para aumentar a extração de polifenóis e ácido rosmarínico foram a extração por turbólise utilizando etanol 70% e uma razão pó/solvente de 5%. Através da PCA e da desreplicação do extrato foi visto que 7 compostos, em sua maioria fenólicos, contribuíram para diferenciar as amostras do planejamento fatorial, nos permitindo entender quais metabólitos foram favorecidos ou não. Além disso, foi realizada a identificação de 29 compostos presentes no extrato de *Mentha x villosa*, que pertencem a classe dos polifenóis.

O teor de polifenóis e ácido rosmarínico obtidos no extrato etanólico após a otimização da extração foi de $264,58 \pm 2,83$ mg EAG/g e $101,96 \pm 1,26$ mg/g, respectivamente, o que resultou no aumento da atividade antioxidante do extrato, mostrando ser esta, uma maneira mais eficiente de extração para esses metabólitos em *Mentha x villosa*.

A atividade fotoprotetora do extrato otimizado também foi favorecida, onde as formulações 5 e 6 apresentaram altos valores de FPS, PFUVA e λ_c *in vitro*, permitindo uma proteção de amplo espectro. Além do extrato ter potencializado o FPS dessas formulações contendo metoxicinamato de etilhexila. Demonstrando dessa forma, que a espécie *Mentha x villosa* apresenta um grande potencial fotoprotetor, o que pode permitir a diminuição da concentração do filtro metoxicinamato de etilhexila nas formulações, no intuito de contribuir para o desenvolvimento de produtos mais seguros.

Referências

6. Referencias

- ABU-REIDAH, I. M. et al. Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. **Food Chemistry**, v. 279, maio 2019.
- 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, p. 1720–1732, 24 jun. 2020.
- ALAMGEER et al. Ex vivo, in vitro, and in silico approaches to unveil the mechanisms underlying vasorelaxation effect of *Mentha Longifolia* (L.) in porcine coronary artery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113298, set. 2022.
- AL-FARTOSI, K. G.; RADI, H.; AL-REKABI, E. A. Lipid Profile of Diabetic Male Rats Treated with Phenolic Compounds of Leaves Extracts from *Mentha longifolia* and *Mentha spicata*. **International Journal of Pharmacy, Biology and Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 26–31, 2014.
- ALMEIDA, A. F.; DOS SANTOS, C. N.; VENTURA, M. R. Polyphenols, their Metabolites and Derivatives as Drug Leads. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 19, p. 2188–2207, 24 set. 2018.
- ALMUTAWA, F. et al. Current status of photoprotection by window glass, automobile glass, window films, and sunglasses. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 29, n. 2, p. 65–72, abr. 2013.
- AL-RIMAWI, F. et al. Free radicals and enzymes inhibitory potentials of the traditional medicinal plant *Echium angustifolium*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 38, p. 101196, set. 2020.
- ALSOHAILI, S. Seasonal Variation in the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil Extracted from *Achillea fragrantissima* Grown in Northern - Eastern Jordanian Desert. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 139–145, 2 jan. 2018.
- ALVES, L. F. et al. Biomass, content, yield and chemical composition of mint (*Mentha x villosa* Huds.) essential oil in response to withholding irrigation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 04, p. 519–523, 20 abr. 2018.
- AMARAL, R. G. et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 8, p. 1100–1106, 14 jul. 2015.
- AMARAL, R. G. et al. Antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* combined with 5-fluorouracil in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 3, p. 250–254, maio 2016.
- AMOAH, S. et al. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. **Planta Medica**, v. 82, n. 05, p. 388–406, 4 fev. 2016.

ANTAR, G. M.; HARLEY, R. M. **Reflora: Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23329>>. Acesso em: 27 jun. 2022.

ANUNCIATO, T. P.; DA ROCHA FILHO, P. A. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 51–54, mar. 2012.

ANVISA, A. DE V. S. M. DA S. B. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 69, DE 23 DE MARÇO DE 2016**. Distrito Federal: [s.n.].

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 629, DE 10 DE MARÇO DE 2022**. 2022.

ANWAR, F. et al. Mentha: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals—A review. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 10, p. 2548–2570, 9 out. 2019.

AOUSSAR, N. et al. Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of Pseudevernia furfuracea, Evernia prunastri and Ramalina farinacea from Morocco. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–6, jan. 2020.

ARRUDA, T. A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of Mentha x villosa Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 307–311, 2006.

BALLISTRERI, G. et al. Anthocyanins and Other Polyphenols in Citrus Genus: Biosynthesis, Chemical Profile, and Biological Activity. Em: **Polyphenols in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 191–215.

BARNES, P. W. et al. Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 7, p. 569–579, 24 jul. 2019.

BARROS, L. et al. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of Melissa officinalis L. infusions. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 1–8, jan. 2013.

BASTOS, D. et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (Ilex paraguariensis) and Green Tea (Camelia sinensis) Extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 12 mar. 2007.

BAYANI, M.; AHMADI-HAMEDANI, M.; JAVAN, A. J. Study of Hypoglycemic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Iranian Mentha Spicata Leaves Aqueous Extract in Diabetic Rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. Special issue, p. 75–82, 2017.

BENABDALLAH, A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild Mentha species from northeastern Algeria. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 131–139, maio 2018.

BERNARD, J. J.; GALLO, R. L.; KRUTMANN, J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 11, p. 688–701, 18 nov. 2019.

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.

BESSADA, S. Coffee Silverskin: A Review on Potential Cosmetic Applications. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, p. 5, 3 jan. 2018.

BEZERRA, A. C. et al. Structural Characterization of Mint (*Mentha x villosa* Huds) Stem and Leaf. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1–6, 17 maio 2019.

BHATTACHARYA, S.; SHERJE, A. P. Development of resveratrol and green tea sunscreen formulation for combined photoprotective and antioxidant properties. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, p. 102000, dez. 2020.

BOO, Y. C. Human Skin Lightening Efficacy of Resveratrol and Its Analogs: From in Vitro Studies to Cosmetic Applications. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 332, 22 ago. 2019.

BORTOLUZZI, B. B. et al. *Mentha villosa* Huds., *M. x piperita* and their bioactives against gastrointestinal nematodes of ruminants and the potential as drug enhancers. **Veterinary Parasitology**, v. 289, p. 109317, jan. 2021.

BOSE, B. et al. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 686–695, ago. 2017.

BRAHMI, F. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of two Algerian *Mentha* species *M. rotundifolia* (L.) Huds, *M. pulegium* L., extracted with different solvents. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 14, n. 4, 27 nov. 2017.

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, p. 17400–17421, 29 out. 2014.

BROSKOVÁ, Z. et al. Effect of Plant Polyphenols on Ischemia-Reperfusion Injury of the Isolated rat Heart and Vessels. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 7, p. 1018–1022, 30 jul. 2013.

CÂNDIDO, T. M. et al. Prospecting In Vitro Antioxidant and Photoprotective Properties of Rosmarinic Acid in a Sunscreen System Developed by QbD Containing Octyl p-Methoxycinnamate and Bemotrizinol. **Cosmetics**, v. 9, n. 2, p. 29, 28 fev. 2022.

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, set. 2010.

CATARINO, M. D. et al. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 62–69, jan. 2018.

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, p. 111500, ago. 2019.

ĆAVAR ZELJKOVIĆ, S. et al. Phenolic Compounds and Biological Activity of Selected *Mentha* Species. **plants**, v. 10, p. 1–18, 2021.

ĆAVAR ZELJKOVIĆ, S. et al. Antiviral Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils and Their Monoterpenes Against SARS-Cov-2. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2 maio 2022.

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.

CHEDEA, V. S.; POP, R. M. Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples. Em: **Polyphenols in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 169–183.

CHEN, H. et al. Qualitative Analysis and Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS n. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 247–257, maio 2011.

CHEN, J. et al. Commonalities of genetic resistance to spontaneous autoimmune and free radical-mediated diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1263–1270, 1 nov. 2008.

CHERUBIM, D. J. et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33–37, 7 jan. 2020.

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

CHOJNACKA, K. et al. Antiviral Properties of Polyphenols from Plants. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2277, 26 set. 2021.

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

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821–3832, 1 maio 2005.

CORY, H. et al. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, 21 set. 2018.

DA CRUZ ALMEIDA, E. T. et al. Inactivation of Spoilage Yeasts by *Mentha spicata* L. and *M. x villosa* Huds. Essential Oils in Cashew, Guava, Mango, and Pineapple Juices. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 25 maio 2018.

DA SILVA, A. C. P. et al. Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 162–171, abr. 2019.

DALY, S.; OUYANG, H.; MAITRA, P. Chemistry of Sunscreens. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 159–178.

DE ANDRADE, T. et al. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1539, 17 set. 2017.

DE JAGER, T. L.; COCKRELL, A. E.; DU PLESSIS, S. S. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. Em: [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.

DE SOUSA BARROS, A. et al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 557–564, dez. 2015.

DE SOUSA, D.; LIMA, T.; STEVERDING, D. Evaluation of Antiparasitic Activity of *Mentha crispata* Essential Oil, Its Major Constituent Rotundifolone and Analogues against *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, v. 82, n. 15, p. 1346–1350, 24 maio 2016.

DE SOUSA, D. P. et al. Antinociceptive Activity of Structural Analogues of Rotundifolone: Structure-Activity Relationship. **Z. Naturforsch.**, v. 62c, p. 2007, 2007.

DE SOUSA, D. P. et al. Structure and Spasmolytic Activity Relationships of Monoterpene Analogues Found in Many Aromatic Plants. **Z. Naturforsch.**, v. 63c, p. 808–812, 2008.

DELINASIOS, G. J. et al. Vitamin E inhibits the UVA1 induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 11 dez. 2018.

DEO, R. C. et al. Very short-term reactive forecasting of the solar ultraviolet index using an extreme learning machine integrated with the solar zenith angle. **Environmental Research**, v. 155, p. 141–166, maio 2017.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–32, 24 abr. 2020.

DIANO, S.; HORVATH, T. L. A Sympathetic View on Free Radicals in Diabetes. **Neuron**, p. 809–811, 2010.

DIWAKAR, G. et al. Inhibitory effect of a novel combination of *Salvia hispanica* (chia) seed and *Punica granatum* (pomegranate) fruit extracts on melanin production. **Fitoterapia**, v. 97, p. 164–171, set. 2014.

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4313–4318, 27 maio 2009.

DOS PASSOS BRAGA, S. et al. Application of coatings formed by chitosan and Mentha essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 631–639, out. 2019.

DUQUE, L.; BRAVO, K.; OSORIO, E. A holistic anti-aging approach applied in selected cultivated medicinal plants: A view of photoprotection of the skin by different mechanisms. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 431–439, mar. 2017.

DZIAŁO, M. et al. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 160, 18 fev. 2016.

EFTEKHARI, A. et al. Phytochemical and nutra-pharmaceutical attributes of *Mentha* spp.: A comprehensive review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 103106, maio 2021.

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 MENYIY, N. et al. Medicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Mentha spicata*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–32, 12 abr. 2022.

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.

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.

FATIH, B. et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. Em: **Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature**. [s.l.] InTech, 2017.

FATIHA, B. et al. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 722–730, nov. 2015.

FERRAZ, E. DE O. et al. Seasonality effects on chemical composition, antibacterial activity and essential oil yield of three species of *Nectandra*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0204132, 18 set. 2018.

FIALOVAA, S. et al. Water Extract of *Mentha x villosa*: Phenolic Fingerprint and Effect on Ischemia-Reperfusion Injury. **Natural product communications**, v. 10, n. 6, p. 937–40, jun. 2015.

FOGAÇA, R. T. H. et al. The Effects of Essential Oil of *Mentha x villosa* on Skeletal Muscle of the Toad. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 552–557, 1997.

FREZZA, C. et al. Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology, and Nutraceuticals of Lamiaceae. Em: [s.l: s.n.]. p. 125–178. 2019

FRIEDMAN, B. J.; LIM, H. W.; WANG, S. Q. Photoprotection and Photoaging. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 61–74.

GALICKA, A.; SUTKOWSKA-SKOLIMOWSKA, J. The Beneficial Effect of Rosmarinic Acid on Benzophenone-3-Induced Alterations in Human Skin Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11451, 23 out. 2021.

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

GBIF SECRETARIAT (2021). **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2927173>>. Acesso em: 27 jun. 2022.

GHAZIPURA, M. et al. Exposure to benzophenone-3 and reproductive toxicity: A systematic review of human and animal studies. **Reproductive Toxicology**, v. 73, p. 175–183, out. 2017.

GHIASVAND, R. et al. Sunscreen Use and Subsequent Melanoma Risk: A Population-Based Cohort Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 33, p. 3976–3983, 20 nov. 2016.

GHOLAMIPOURFARD, K.; SALEHI, M.; BANCHIO, E. *Mentha piperita* phytochemicals in agriculture, food industry and medicine: Features and applications. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 183–195, set. 2021.

GOMES, A. F. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 186–193, fev. 2019.

GOMES, J. M. **Estudo preliminar da potencial atividade fotoprotetora e antioxidante de *Mentha x villosa***. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 2018.

GUEDES, D. N. et al. Muscarinic Agonist Properties involved in the Hypotensive and Vasorelaxant Responses of Rotundifolone in Rats. **Planta Medica**, v. 68, p. 700–704, 2002.

GUERRA, I. C. D. et al. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 168–178, dez. 2015.

HAMANY DJANDE, C. Y. et al. Hordatines and Associated Precursors Dominate Metabolite Profiles of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings: A Metabolomics Study of Five Cultivars. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 310, 31 mar. 2022.

HANAFY, D. M. et al. Biophenols of mints: Antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 345–362, jun. 2017.

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.

HIBLER, B. P.; DUSZA, S. W.; WANG, S. Q. Photoprotection and Skin Cancer Prevention. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 23–38.

HINES, M. R. et al. Extracellular biomolecular free radical formation during injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 188, p. 175–184, ago. 2022.

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.

HU, S. et al. Dietary polyphenols as photoprotective agents against UV radiation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 108–118, mar. 2017.

HUERTA-MADROÑAL, M. et al. Chitosan – Rosmarinic acid conjugates with antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 273, p. 118619, dez. 2021.

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.

IFEANYI, O. E. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **International Journal of Current Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 123–133, 2018.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Câncer de pele**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-de-pele>>.

JAMSHIDI-KIA, F. et al. Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 191–199, 29 mar. 2020.

JEONG, J. et al. Characterization of Melanogenesis Inhibitory Constituents of *Morus alba* Leaves and Optimization of Extraction Conditions Using Response Surface Methodology. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8730–8741, 14 maio 2015.

JESUMANI, V. et al. Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227308, 7 jan. 2020.

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, p. 369–379, dez. 2000.

KANDPAL, V.; JOSHI, P. K.; JOSHI, N. Effect of Seasonal Variation on Chemical Compositions of Essential Oils of Root, Shoot and Inflorescence of *Selinum wallichianum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 4, p. 795–802, 3 jul. 2020.

KANG, J. et al. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 211, p. 215–226, nov. 2016.

KAPP, K. **Polyphenolic and essential oil composition of Mentha and their antimicrobial effect**. Dissertation—[s.l.] University of Helsinki, Finland, 2015.

KAPP, K. et al. Chemical Composition and Antibacterial Effect of *Mentha* spp. Grown in Estonia. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 12, p. 1934578X2097761, 8 dez. 2020.

KCIUK, M. et al. Focus on UV-Induced DNA Damage and Repair—Disease Relevance and Protective Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7264, 1 out. 2020.

KHATOON, A. et al. Silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. **Life Sciences**, v. 209, p. 430–434, set. 2018.

KHAZAN, M.; HDAYATI, M. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases. **Scimetr**, v. 3, n. 1, 8 dez. 2014.

KIM, S.; CHOI, K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. **Environment International**, v. 70, p. 143–157, set. 2014.

KOSTYUK, V. et al. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. **Rejuvenation Research**, v. 21, n. 2, p. 91–101, abr. 2018.

KUMAR, V. et al. Antioxidant potential of essential oils from some Himalayan Asteraceae and Lamiaceae species. **Medicine in Drug Discovery**, v. 1, p. 100004, mar. 2019.

KUMARI, R. et al. Influence of seasonal variation on phenolic composition and antioxidant capacity of eggplant (*Solanum melongena* L.) hybrids. **Scientia Horticulturae**, v. 295, p. 110865, mar. 2022.

LAHLOU, S. et al. Involvement of Nitric Oxide in the Mediation of the Hypotensive Action of the Essential oil of *Mentha x villosa* in Normotensive Conscious Rats. **Planta Medica**, v. 68, p. 694–699, 2022.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 715–720, 2002.

LAN, C.-C. E. Effects and interactions of increased environmental temperature and UV radiation on photoageing and photocarcinogenesis of the skin. **Experimental Dermatology**, v. 28, p. 23–27, fev. 2019.

LATOSIŃSKA, M.; LATOSIŃSKA, J. N. Modern approach to study trends in global ultraviolet index maps variation over solar cycles by the complementary use of time series, mathematical metrics and artificial neural networks. **Aerospace Science and Technology**, v. 69, p. 48–59, out. 2017.

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, p. 805–810, maio 2016.

LIEBELT, D. J.; JORDAN, J. T.; DOHERTY, C. J. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 6, p. 1409–1433, 14 dez. 2019.

LIMA, T. C. et al. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. **Chemosphere**, v. 104, p. 37–43, jun. 2014.

LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M. Identification of Hydroxycinnamoylquinic Acids of Arnica Flowers and Burdock Roots Using a Standardized LC-DAD-ESI/MS Profiling Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10105–10114, 12 nov. 2008.

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, p. 170–182, ago. 2007a.

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. 2007b.

LIU-SMITH, F.; ZIOGAS, A. Age-dependent interaction between sex and geographic ultraviolet index in melanoma risk. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 5, p. 1102–1108.e3, maio 2020.

LUCAS, R. M. et al. Human health in relation to exposure to solar ultraviolet radiation under changing stratospheric ozone and climate. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 641–680, 2019.

LUO, C. et al. A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 28 fev. 2020.

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

MAHDAVIKIA, F.; SAHARKHIZ, M. J.; KARAMI, A. Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha × piperita* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 133–140, jan. 2017.

MAHENDRAN, G.; VERMA, S. K.; RAHMAN, L.-U. The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata* L.): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114266, out. 2021.

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

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

MARINELI, R. DA S. et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1304–1310, 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.

MARIUTTI, L. (UNICAMP); BRAGAGNOLO, N. (UNICAMP). No Title. **Braz. J. Food Technol**, v. 10, n. 2, p. 96–103, 2007.

MARTINS, N. et al. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 170, p. 378–385, mar. 2015.

MARZOUK, M. M. et al. Comparative study of *Mentha* species growing wild in Egypt: LC-ESI-MS analysis and chemosystematic significance. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 116–122, ago. 2018.

MATOS-ROCHA, T. 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 Medica**, v. 79, n. 14, p. 1307–1312, 14 ago. 2013.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. In vivo effect of essential oil of *Mentha x villosa* and its active compound against *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 3, p. 582–588, set. 2020.

MAZZIO, E. et al. High Throughput Screening of Natural Products for Anti-mitotic Effects in MDA-MB-231 Human Breast Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 856–867, jun. 2014.

MCDANIEL, D.; FARRIS, P.; VALACCHI, G. Atmospheric skin aging-Contributors and inhibitors. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 124–137, abr. 2018.

MICHEL, J.; ABD RANI, N. Z.; HUSAIN, K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 5 jun. 2020.

MILLER, R. G. et al. Mechanisms of Fire Seasonality Effects on Plant Populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 34, n. 12, p. 1104–1117, dez. 2019.

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.

MOETAMEDIPOOR, S. A. et al. Essential oil chemical diversity of Iranian mints. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114039, nov. 2021.

MOETAMEDIPOOR, S. A. et al. Hexaploidy induction improves morphological, physiological and phytochemical characteristics of mojito mint (*Mentha × villosa*). **Scientia Horticulturae**, v. 295, p. 110810, mar. 2022.

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.

MOREIRA, D. C. **ABTS decolorization assay – in vitro antioxidant capacity**. , 2019. Disponível em: <<https://www.protocols.io/view/abts-decolorization-assay-in-vitro-antioxidant-cap-14egnxk86l5d/v1>>

MOROCHO-JÁCOME, A. L. et al. In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 29 jul. 2020.

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.

MOTA, M. D. et al. Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 205, abr. 2020.

MURPHY, G. M.; RALPH, N. Photoprotection, Photoimmunology and Autoimmune Diseases. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 75–93.

MUSHTAQ, A. et al. ANTI-DIABETIC AND ANTI-HYPERLIPIDEMIC ACTION OF AQUEOUS ETHANOLIC EXTRACTS OF MENTHA SPICATA (LEAVES), PLUMERIA ALBA (LEAVES) AND NYMPHAEA ALBA (FLOWERS AND RHIZOMES). **IJBPAS**, v. 6, n. 1, p. 108–124, 2017.

MWAMATOPE, B. et al. Seasonal Variation of Phytochemicals in Four Selected Medicinal Plants. **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 4, p. 218–226, 20 out. 2021.

NA, J.-I. et al. Resveratrol as a Multifunctional Topical Hypopigmenting Agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 956, 22 fev. 2019.

NAPOLI, E.; SIRACUSA, L.; RUBERTO, G. New Tricks for Old Guys: Recent Developments in the Chemistry, Biochemistry, Applications and Exploitation of Selected Species from the Lamiaceae Family. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 3, 9 mar. 2020.

NASH, J. F.; TANNER, P. R. The Controversy of Sunscreen Product Exposure: Too Little, Too Much, or Just Right. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 125–139.

NAZARI, M.; ZARINKAMAR, F. Ultraviolet-B induced changes in *Mentha aquatica* (a medicinal plant) at early and late vegetative growth stages: Investigations at molecular and genetic levels. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112618, out. 2020.

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.

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

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

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 119–123, dez. 2018b.

NUNES GUEDES, D. et al. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 490–497, set. 2004.

OLIVEIRA, M. B. S. et al. Photoprotective and antiglycation activities of non-toxic *Cocos nucifera* Linn. (Arecaceae) husk fiber ethanol extract and its phenol chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 162, p. 113246, abr. 2021.

OMS, O. M. DE S. **Radiation: The ultraviolet (UV) index**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-the-ultraviolet-\(uv\)-index](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/radiation-the-ultraviolet-(uv)-index)>. 2022.

PARK, J. et al. Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 5, p. 475–487, 11 jul. 2014.

PARK, Y. et al. Metabolic Profiling of Nine *Mentha* Species and Prediction of Their Antioxidant Properties Using Chemometrics. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 258, 11 jan. 2019.

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. 2019.

PEÑA-BAUTISTA, C. et al. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 85–90, abr. 2019.

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, p. 1773–1780, dez. 2013.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 136, p. 12–18, jul. 2014.

PERUGINI, P. et al. Topical Sunscreen Application Preventing Skin Cancer: Systematic Review. **Cosmetics**, v. 6, n. 3, p. 42, 11 jul. 2019.

PORTILLO-ESNAOLA, M. et al. Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers after UVA Exposure (Dark-CPDs) Is Inhibited by an Hydrophilic Extract of *Polypodium leucotomos*. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1961, 7 dez. 2021.

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.

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.

RAKEBIZADEH, M.; ZAHEDIZADEH, M.; PANAHI, Y. E. Supplemental Effect of Zinc Oxide Nanoparticles and *Mentha spicata* butanol Extract on Blood Glucose of Diabetic Wistar Rats. **UCT JOURNAL OF RESEARCH IN SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY**, v. 6, n. 3, p. 1–5, 2018.

RANA, A. et al. Health benefits of polyphenols: A concise review. **Journal of Food Biochemistry**, 13 jun. 2022.

RATHORE, S. et al. Seasonal variability in essential oil composition and biological activity of *Rosmarinus officinalis* L. accessions in the western Himalaya. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 3305, 28 dez. 2022.

RATTRAY, R. D.; VAN WYK, B.-E. The Botanical, Chemical and Ethnobotanical Diversity of Southern African Lamiaceae. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3712, 18 jun. 2021.

RIBEIRO, D. A. et al. Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Secundaria floribunda* A. DC. (Apocynaceae). **Food Chemistry**, v. 315, jun. 2020.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 47–63, mar. 2015.

SALDANHA, L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 16 jul. 2013.

SALEHI, B. et al. Plants of Genus *Mentha*: From Farm to Food Factory. **Plants**, v. 7, n. 3, p. 70, 4 set. 2018.

SALEM, M. A. et al. Using an UPLC/MS-based untargeted metabolomics approach for assessing the antioxidant capacity and anti-aging potential of selected herbs. **RSC Advances**, v. 10, n. 52, p. 31511–31524, 2020.

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, p. 336–349, out. 2017.

SANDER, M. et al. The efficacy and safety of sunscreen use for the prevention of skin cancer. **Canadian Medical Association Journal**, v. 192, n. 50, p. E1802–E1808, 14 dez. 2020.

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.

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

SCHMIDT, P. C.; ORTEGA, G. G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamt flavonoid gehaltes von *Passiflorae herba*. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, p. 17–26, 1999.

SCHNEIDER, S. L.; LIM, H. W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 266–271, jan. 2019.

SHAATH, N. A. The Chemistry of Ultraviolet Filters. Em: **Principles and Practice of Photoprotection**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 143–157.

SHAHEEN, F. et al. Chemical constituents of *Marrubium vulgare* as potential inhibitors of nitric oxide and respiratory burst. **Natural product communications**, v. 9, n. 7, p. 903–6, jul. 2014.

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.

SHEN, D. et al. A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from *Mentha* spp. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. C900–C908, ago. 2011.

SHI, P. et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus *Citrus* in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 1, p. 110–118, ago. 2007.

SHIN, J.-W. et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2126, 29 abr. 2019.

SILVA, A. C. P. et al. Ethylhexyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane: Toxicological effects on marine biota and human concerns. **Journal of Applied Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 73–86, 7 jan. 2022.

SILVA, D. B. et al. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4309, 7 maio 2015.

SILVA, D. F. et al. Rotundifolone-Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 6, p. 465–475, dez. 2011.

SIMEONI, M. C. et al. Analysis of Polyphenols in the Lamiaceae Family by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction Followed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination. **ACS Omega**, v. 3, n. 12, p. 17610–17616, 31 dez. 2018.

SINGH, A. et al. Preparation, optimization, characterization and bioevaluation of rosmarinic acid loaded phytovesicles for anti-inflammatory activity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 101888, out. 2020.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.

SIRACUSA, L.; RUBERTO, G. Not Only What Is Food Is Good—Polyphenols From Edible and Nonedible Vegetable Waste. Em: **Polyphenols in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 3–21.

SITZMANN, J. et al. Comparative Analysis of Antioxidant Activities of Fourteen Mentha Essential Oils and Their Components. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v. 11, p. 1978–1989, 2014.

SKENDI, A. et al. Antifungal Activity of Aromatic Plants of the Lamiaceae Family in Bread. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1642, 10 nov. 2020.

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.

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, p. 14–30, abr. 2015.

STAGOS, D. et al. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4115–4124, nov. 2012.

SUJANA, P. et al. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint)—An Important

Multipurpose Medicinal Plant. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 01, p. 77–83, 2013.

SUN, Z. et al. Angelica archangelica Prevented Collagen Degradation by Blocking Production of Matrix Metalloproteinases in UVB-exposed Dermal Fibroblasts. **Photochemistry and Photobiology**, v. 92, n. 4, p. 604–610, jul. 2016a.

SUN, Z. et al. Dietary Foeniculum vulgare Mill extract attenuated UVB irradiation-induced skin photoaging by activating of Nrf2 and inhibiting MAPK pathways. **Phytomedicine**, v. 23, n. 12, p. 1273–1284, nov. 2016b.

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.

TAFRIHI, M. et al. The Wonderful Activities of the Genus Mentha: Not Only Antioxidant Properties. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1118, 20 fev. 2021.

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.

TEKELOVÁ, D. et al. Phenolic compounds in leaves insertions of *Mentha × villosa* Huds. cv. Snežná. **Farmaceuticke Spolecnosti**, v. 65, n. 6, p. 161–165, 2016.

TERTO, M. V. C. et al. Photoprotective Activity of Plectranthus amboinicus Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 2, p. 183–188, 18 abr. 2020.

TORRES, A. E.; LUK, K. M.; LIM, H. W. Botanicals for photoprotection. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2020, 21 out. 2020.

TURKEZ, H. et al. A Comparative Evaluation of the Cytotoxic and Antioxidant Activity of Mentha crispa Essential Oil, Its Major Constituent Rotundifolone, and Analogues on Human Glioblastoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–12, 2 jul. 2018.

TZIMA, K.; BRUNTON, N.; RAI, D. Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in Lamiaceae Plants—A Review. **Plants**, v. 7, n. 2, p. 25, 26 mar. 2018.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 877–883, dez. 2011.

VAN WYK, B.-E. **Culinary Herbs and Spices of the World**. [s.l.] University of Chicago Press, 2014.

VIDOVIĆ, M.; MORINA, F.; JOVANOVIĆ, S. V. Stimulation of Various Phenolics in Plants Under Ambient UV-B Radiation. Em: **UV-B Radiation**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 9–56.

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. 2012a.

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. 2012b.

WANG, Y. et al. NF- κ B signaling in skin aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 184, p. 111160, dez. 2019.

WATTS, C. G. et al. Sunscreen use and melanoma risk among young Australian adults. **JAMA Dermatology**, v. 154, n. 9, p. 1001–1009, 1 set. 2018.

WFO (2022). **The World Flora Online**. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000023748>>. Acesso em: 27 jun. 2022.

WNUK, W. et al. Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 39, n. 1, p. 26–33, 2022.

XU, H. et al. Tyrosinase inhibitory mechanism and the anti-browning properties of piceid and its ester. **Food Chemistry**, v. 390, p. 133207, out. 2022.

YAKOUBI, R. et al. Photoprotective, antioxidant, anticholinesterase activities and phenolic contents of different Algerian *Mentha pulegium* extracts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102038, jul. 2021.

YAMADA, M.; MOHAMMED, Y.; PROW, T. W. Advances and controversies in studying sunscreen delivery and toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 153, jan. 2020.

YEAGER, D. G.; LIM, H. W. What's New in Photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 2, p. 149–157, abr. 2019.

ZENG, G. et al. Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 3, 15 fev. 2006.

ZHANG, J.-Y. et al. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in *Flos Lonicerae Japonicae* by HPLC-ESI-MSn. **Talanta**, v. 104, p. 1–9, jan. 2013.

ZHANG, Y. et al. Compounds Identification in *Semen Cuscutae* by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UPLCs) Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1199, 17 maio 2018.

ZHAO, H.-Y. et al. Chemical Profiling of the Chinese Herb Formula Xiao-Cheng-Qi Decoction Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 3, p. 273–285, 1 mar. 2013.

ZHAO, Y.; CHANG, Y.-S.; CHEN, P. Differentiation of Aurantii Fructus Immaturus from Poncirus Trifoliatae Fructus Immaturus using flow-injection mass spectrometric (FIMS) metabolic fingerprinting method combined with chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 251–257, mar. 2015.

ZHU, Z. et al. Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from Radix Salvia 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.

ZUO, A.-R. et al. The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 51, 19 dez. 2018.