

Multifuncionalidade do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* para as atividades antioxidante, fotoprotetora e anti-inflamatória

Multifunctionality of methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* for antioxidant, photoprotective and anti-inflammatory activities

Multifuncionalidad del extracto metanólico de *Mitracarpus frigidus* para actividades antioxidantes, fotoprotectoras y antiinflamatorias

Recebido: 24/04/2022 | Revisado: 05/05/2022 | Aceito: 13/05/2022 | Publicado: 18/05/2022

Thayná Gomes Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6170-7841>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: thaynagferreira@hotmail.com

Thalita de Freitas Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7316-2233>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: thalitadf.souza@gmail.com

Matheus Torres Branca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6915-3150>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: matheus.tbranca@gmail.com

Priscila de Paula Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6848-6604>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: plppriscila23@gmail.com

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2980-7647>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: arisergiolemos@hotmail.com

Lara Melo Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3039-0559>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: laramelo95@yahoo.com.br

Luciana Moreira Chedier

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8212-8056>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: lmchedier@hotmail.com

Rodrigo Luiz Fabri

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0167-2277>
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil
E-mail: rodrigo.fabri@ufjf.edu.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo de flavonoides no extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (MFM), bem como avaliar a viabilidade celular e o potencial antioxidante, anti-inflamatório e fotoprotetor desse extrato. O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo ensaio em espectrofotômetro com o reativo de cloreto de alumínio. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do complexo de fosfomolibdênio e do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelos ensaios de viabilidade celular, dosagem de níveis de óxido nítrico celular (NO) e atividade de metaloproteases (MMP). A atividade fotoprotetora in vitro foi avaliada pelos métodos de Mansur e COLIPA. O teor de flavonoides determinado para o método espectrométrico foi de $102,46 \pm 5,66$ mg/g equivalentes a rutina, respectivamente. O ensaio de fosfomolibdênio apresentou 33,80% de Atividade Antioxidante Relativa (AAR) para a quercetina e 51,52% AAR para a rutina, enquanto que o ensaio β -caroteno/ácido linoleico obteve $45,10 \pm 1,79\%$ de inibição na concentração de $38,46 \mu\text{g/mL}$. A atividade anti-inflamatória evidenciou que o extrato reduziu os níveis de NO celular e da atividade da MMP-9, nas concentrações testadas, sem alterar significativamente a atividade da MMP-2. A atividade fotoprotetora pelo método de Mansur obteve FPS baixos. Já pelo método COLIPA, a formulação contendo 5% de MFM e 5% de filtro obteve FPS de $8,61 \pm 0,49$, considerado aceitável pela ANVISA. Os resultados indicam que a espécie *M. frigidus* apresenta grande potencial como antioxidante, anti-inflamatório e para compor, como coadjuvante, formulações fotoprotetoras.

Palavras-chave: *Mitracarpus frigidus*; Flavonoides; Antioxidante; Metaloproteases; Óxido nítrico; Filtros solares.

Abstract

The objective of this study was to determine the flavonoid content in the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* (MFM), as well as to evaluate cell viability and the antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective potential of this extract. Flavonoid content was determined by spectrophotometer assay with aluminum chloride reagent. The antioxidant activity was evaluated by the phosphomolybdenum complex and β -carotene/linoleic acid system methods. The anti-inflammatory activity was evaluated by cell viability assays, dosage of cellular nitric oxide (NO) levels and metalloprotease (MMP) activity. The in vitro photoprotective activity was evaluated by the Mansur and COLIPA methods. The flavonoid content determined for the spectrometric method was 102.46 ± 5.66 mg/g rutin equivalent, respectively. The phosphomolybdenum assay showed 33.80% Relative Antioxidant Activity (RAA) for quercetin and 51.52% RAA for rutin, while the β -carotene/linoleic acid assay obtained $45.10 \pm 1.79\%$ inhibition at a concentration of $38.46 \mu\text{g/mL}$. The anti-inflammatory activity showed that the extract reduced cellular NO levels and MMP-9 activity at the tested concentrations, without significantly altering MMP-2 activity. The photoprotective activity by the Mansur method obtained low SPF. By COLIPA method, the formulation containing 5% of MFM and 5% of filter obtained SPF of 8.61 ± 0.49 , considered acceptable by ANVISA. The results indicate that the species *M. frigidus* has great potential as an antioxidant, anti-inflammatory and to compose, as an adjuvant, photoprotective formulations.

Keywords: *Mitracarpus frigidus*; Flavonoids; Antioxidant; Metalloproteases; Nitric Oxide; Sunscreens.

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de flavonoides en el extracto metanólico de las partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (MFM), así como evaluar la viabilidad celular y el potencial antioxidante, antiinflamatorio y fotoprotector de este extracto. El contenido de flavonoides se determinó mediante un ensayo de espectrofotómetro con el reactivo de cloruro de aluminio. La actividad antioxidante se evaluó mediante los métodos del complejo de fosfomolibdeno y del sistema β -caroteno/ácido linoléico. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante ensayos de viabilidad celular, dosificación de los niveles de óxido nítrico (NO) celular y actividad de metaloproteasas (MMP). La actividad fotoprotectora in vitro se evaluó mediante los métodos Mansur y COLIPA. El contenido de flavonoides determinado por el método espectrométrico fue de $102,46 \pm 5,66$ mg/g de equivalente de rutina, respectivamente. El ensayo de fosfomolibdeno mostró un 33,80% de actividad antioxidante relativa (RAA) para la quercetina y un 51,52% de RAA para la rutina, mientras que el ensayo de β -caroteno/ácido linoléico obtuvo un $45,10 \pm 1,79\%$ de inhibición a una concentración de $38,46 \mu\text{g/mL}$. La actividad antiinflamatoria mostró que el extracto redujo los niveles de NO celular y la actividad de MMP-9 en las concentraciones probadas, sin alterar significativamente la actividad de MMP-2. La actividad fotoprotectora por el método Mansur obtuvo FPS bajos. Por el método COLIPA, la formulación que contenía un 5% de MFM y un 5% de filtro obtuvo un FPS de $8,61 \pm 0,49$, considerado aceptable por ANVISA. Los resultados indican que la especie *M. frigidus* presenta un gran potencial como antioxidante, antiinflamatorio y para componer, como coadyuvante, formulaciones fotoprotectoras.

Palabras clave: *Mitracarpus frigidus*; Flavonoides; Antioxidante; Metaloproteasas; Óxido nítrico; Protectores solares.

1. Introdução

O estresse oxidativo é uma condição proveniente do desequilíbrio das defesas antioxidantes e da produção excessiva de radicais livres, que resulta na incapacidade do organismo em neutralizá-los (Conrad et al., 2018). Tal condição pode causar oxidação de biomoléculas e torná-las inativas, levando ao processo inflamatório que pode desencadear diversas patologias, como algumas doenças metabólicas e determinados tipos de câncer, bem como ao envelhecimento precoce (Phaniendra et al., Araújo et al., 2021).

A inflamação é a resposta inicial do organismo contra um agente agressor. Quando essa resposta é exacerbada, há uma crescente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, secretadas por células inflamatórias ativas, que levam a destruição tissular e danos ao DNA, promovendo instabilidade genômica inflamatória e aumento das taxas de mutação e proliferação celular (Barboza et al., 2018). Neste sentido, se faz necessário o uso de substâncias anti-inflamatórias exógenas, a fim de regular a resposta imunológica, já que tais condições podem aumentar o risco potencial para o desenvolvimento de várias patologias, dentre elas o câncer (Wu et al., 2018; Grivennikov et al., 2010; Vijay et al., 2018).

O câncer de pele tem como principal causa a exposição à luz solar sem proteção. Isso deve-se à formação de radicais livres e danos ao DNA provocados pela radiação ultravioleta (UV), quando esta atinge as barreiras cutâneas (Guinea et al., 2012). Tal condição desencadeia processos inflamatórios a fim de proteger a epiderme. Porém, após exposição prolongada e

excessiva à radiação, há perda da barreira protetora, causando um estresse oxidativo importante nas células epidérmicas, com os queratinócitos apresentando maior resistência à apoptose (Batista et al., 2018). Logo, o acúmulo significativo de DNA danificado e alterações proteicas, favorecem processos neoplásicos. Diante disso, devido à maior incidência de raios solares e, conseqüentemente, de neoplasias cutâneas, formulações com proteção UV tornam-se cada vez mais urgentes e necessárias (Ma et al., 2001; Widell et al., 2014; De Medeiros et al., 2020).

Mitracarpus frigidus (Willd. ex ReemSchult.) K. Schum. é uma espécie nativa de regiões tropicais, pertencente à família Rubiaceae (Pereira et al., 2006). Apesar de não possuir relatos de uso popular, análises farmacológicas das partes aéreas da planta mostraram potencial para diversas atividades, dentre elas atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana e leishmanicida. O potencial farmacoterapêutico da espécie está relacionado à presença de metabólitos de importância clínica como alcaloides, triterpenos e fenólicos (Fabri et al., 2009; Fabri et al., 2022).

Apesar do potencial farmacológico de *M. frigidus* ter sido relatado, ainda há necessidade de novas investigações, a fim de consolidar as atividades já descritas para a espécie e investigar novos potenciais terapêuticos. Neste sentido, o trabalho tem por objetivo avaliar as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e determinar a capacidade fotoprotetora do extrato na sua forma livre e incorporado a uma formulação.

2. Metodologia

2.1 Extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*

As partes aéreas de *M. frigidus* (CESJ 46076) foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em maio de 2011, coordenadas geográficas -43.38223, -21.78073, de acordo com a licença número A032F41-23 SISGEN/BRASIL, a exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob número CESJ 46076. As partes aéreas de *M. frigidus* foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C e pulverizadas para obtenção do material vegetal seco (1,0 kg). Este foi extraído por maceração estática com metanol, à temperatura ambiente, até a exaustão. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotatório. O extrato obtido (MFM - 150 g) foi mantido sob refrigeração até o momento da realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos.

2.2 Determinação do conteúdo de flavonoides pelo ensaio reativo com cloreto de alumínio

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas et al. (2004), com modificações. A rutina (Teor de 95 % marca) foi utilizada para a construção da curva de calibração. Uma solução do extrato MFM a 0,5 mg/mL em etanol foi preparada juntamente com 0,2 mL de $AlCl_3$ a 2 %. A absorbância foi medida a 415 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific SkanIt® Multiskan GO, software 3.2) e a equação da reta obtida como $Y = 0.0088x + 0.0035$ ($R^2 = 0.9986$). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de rutina.

2.3 Atividade antioxidante

2.3.1 Capacidade antioxidante total por ensaio de fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total foi determinada pela redução do complexo fosfomolibdênio com base no método proposto por Prieto et al. (1999). Tubos de ensaio contendo 300 μ L do extrato em solução etanólica (500 μ g/mL) e 2 mL de solução reagente (1,12 mL de solução de fosfato de sódio, 0,48 mL de molibdato de amônio e 0,40 mL de H_2SO_4) foram aquecidos a 95 °C por 90 min. A curva padrão foi realizada com o quercetina e rutina (controles positivos). A leitura foi analisada em espectrofotômetro UV a 695 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade antioxidante relativa (RAA%) em relação aos controles positivos. Equação para o cálculo do RAA%: $RAA\% = [(Abs\ Amostra - Abs$

Branco da amostra) / Abs Controle positivo - Abs Branco do controle positivo] x 100. Onde Abs Amostra: absorvância medida para as amostras; Abs Controle positivo: absorvância medida para os controles positivos; Abs Branco da amostra: absorvância medida para o branco da amostra; Abs Branco do controle positivo: absorvância medida para o branco de controle positivo. O experimento foi em triplicata.

2.3.2 Determinação da atividade antioxidante utilizando-se o sistema β -caroteno/ácido linoleico

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pelo método β -caroteno/ácido linoleico, descrito por Melo & Mancini Filho (1989), com modificações. Uma emulsão contendo β -caroteno e ácido linoleico foi preparada e ajustada para uma leitura entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Um volume de 250 μ L de emulsão e 10 μ L de soluções de MFM e rutina (controle positivo), na concentração final de 38,46 μ g/mL, foram adicionados. O controle negativo foi realizado com 250 μ L desta emulsão e 10 μ L de metanol (100 % de oxidação). A placa foi incubada a 45 °C, para acelerar as reações de oxidação e iniciar a descoloração do β -caroteno, e a absorvância foi lida a 470 nm. As leituras foram realizadas em tempo zero e em intervalos de 15 min até completar 120 min de reação. A diminuição da absorvância da amostra (Abs Amostra (tempo 0 min ao tempo 120 min)) foi relacionada à diminuição da absorvância do controle negativo (Abs controle (tempo 0 min ao tempo 120 min)), obtendo-se o percentual de inibição da peroxidação lipídica (% I) pela fórmula: % I = (Abs Controle - Abs Amostra) x 100 / Abs Controle.

A curva de oxidação do controle negativo e das amostras foi avaliada para encontrar os valores de F1 e F2. F1 é a capacidade de bloquear a formação de peróxido entre 15 e 45 min após o início da reação, e F2 é a capacidade de inibir outras reações durante o processo oxidativo, que produzem espécies radicais entre 75 e 90 min após o início da reação, conforme a equação: F1 = tgAbs Amostra / tgAbs Controle; F2 = tgAbs Amostra / tgAbs Controle. Onde Abs Controle: absorvância medida para controle negativo; Abs Amostra: absorvância medida para a amostra; % I: porcentagem de inibição da lipoperoxidação; Tg: tangente. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4 Atividade anti-inflamatória

2.4.1 Linhagem celular

A linhagem celular RAW 264.7 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ-RJ, Brasil). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10 % (SFB) e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) em incubadora umidificada com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

2.4.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A atividade anti-inflamatória foi investigada pela inibição da produção de óxido nítrico (Silva et al., 2017). A produção de NO foi determinada indiretamente por reação de Griess para medir a concentração de nitrito no meio de cultura. Células RAW 264.7 foram semeadas em microplacas (96 poços) a uma densidade de 8 x 10⁴ células/poço, e incubadas durante 24h. Em seguida, as células foram expostas a 100 ng/mL de LPS, com a amostra nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ g/mL, por 48h. O sobrenadante da cultura juntamente ao reagente de Griess foram incubados à temperatura ambiente durante 10 min. A absorvância foi medida a 540 nm. A concentração de NO foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂), e posterior leitura das absorvâncias de onze concentrações, no intervalo de 500 a 8,7 μ g de NO₂. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4.3 Atividade de metaloproteases

O efeito do extrato MFM sobre a atividade das metaloproteases de matriz, sintetizadas por células RAW 264.7 induzidas com LPS, foi avaliado por zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina. Células RAW 264.7 foram semeadas

em microplacas, na concentração de 8×10^4 células/poços. Em seguida, foram estimuladas com 100 ng/mL de LPS e tratadas com o extrato em diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 µg/mL), por 48h. Os sobrenadantes foram submetidos à quantificação proteica, pelo método BCA, de acordo com as informações do fabricante do Kit, (ThermoScientific® - Kit PRICE BCA, Waltham, MA, USA), e reservadas. Posteriormente, foram preparados géis de 0,75 mm com solução de acrilamida-bisacrilamida (7,5 %), e como substrato foi adicionada gelatina a 2,5 %. Volumes equivalentes a 10 µg de proteína de cada amostra, previamente quantificadas, foram aplicadas ao gel para migração eletroforética (30 mA a 4 °C) em tampão de Tris-glicina (25 mM / 192 mM). Após a migração, os géis foram lavados com Triton X-100 (2 %) e incubados com (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5 mM de CaCl₂ e 1 µM ZnCl₂) por 24h a 37 °C. Os géis foram corados com Coomassie Blue R250 (0,5 % de corante, 30 % de metanol e 10 % ácido acético) e descorados (30 % de metanol e 10 % ácido acético). A atividade das gelatinases foi evidenciada por regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas, foi utilizado o programa TotalLab Quant® (Miura et al., 1995; Shapiro; Kelley & Kobayashi, 2001).

2.5 Atividade fotoprotetora

2.5.1 Preparo da formulação

Para este ensaio, foi selecionada uma formulação com característica “oilfree” (produto praticamente livre de óleo). A formulação foi feita misturando-se a fase aquosa (Fase B) e fase oleosa (Fase A) sob agitação mecânica, rotação de 3000 rpm, por 25 minutos, até a formação de uma emulsão. A medida do pH da emulsão foi realizada com fita de pH e ajustado para o valor de 5,5, com adição de solução de ácido cítrico a 5 mg/mL. Os componentes da fase A consistem em silicone DCR 5225 e silicone CCR 245. O Silicone DCR 5225 apresenta quantidade de 10 % (função estabilizador da formulação) e Silicone CCR 245, com quantidade de 7 % e consiste em veículo lipossolúvel volátil. A fase B consiste em NaCl, com quantidade de 2 % (espessante), glicerina, quantidade de 5 % (umectante), solução de parabeno (4-hidroxibenzoato de metila e 6-propilparabeno) quantidade de 3,3 % (antimicrobiano) e água q.s.p, quantidade de 100 % (veículo).

A formulação base e a formulação contendo 5 % de extrato e 5 % de filtro UVA e UVB hidrossolúvel foram testadas no teste preliminar ao estudo de estabilidade. Para iniciar o teste, foram pesados 6 g da formulação base e da formulação contendo 5 % de extrato e 5 % de filtro em tubos falcon. Os dois tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 30 min. Neste estudo, o produto deverá permanecer estável. Se aprovado nesse teste, o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade (Anvisa, 2004).

2.5.2 Incorporação do extrato e filtro à formulação

Seis formulações contendo diferentes concentrações de MFM e de filtro solar UVA e UVB hidrossolúvel foram avaliadas para melhor compreensão do ensaio de atividade fotoprotetora, sendo esses componentes incorporados sozinhos ou em combinação na formulação base. As formulações foram preparadas em microtubos, incorporando-se os ativos (extrato e filtro) na formulação base. Para todas as formulações, foi preparado 1 g para os testes.

A formulação do MFM a 5 % consiste em uma quantidade de 50 mg (extrato) com formulação base de 950 mg, a formulação de 10% consiste em 100 mg, com formulação de 900 mg, a formulação de filtro a 5 % consiste em 50 mg do filtro, com formulação de 950 mg, a formulação do filtro 2,5 % e MFM 2,5 % consiste em extrato a 25 mg, filtro 25 mg e formulação base de 950 mg e formulação de filtro 5 % e MFM 5 % com extrato de 50 mg, filtro 50 mg e formulação de 900 mg.

2.5.3 Determinação do FPS *in vitro* pelo método de Mansur (1986)

A atividade fotoprotetora foi avaliada pelo método de Mansur et al. (1986), com modificações. Esse ensaio é realizado para formulações, visto que apresenta ser eficaz e rápido, além de ter uma boa correlação com os resultados *in vivo* (Barth,

2000; Santos et al., 1999; Ribeiro et al., 2004). A técnica consiste em espectrofotometria na região do UV para a avaliação das formulações, medindo-se a absorvância de uma solução da formulação em uma faixa de comprimentos de onda (290 a 320 nm, realizando leituras em intervalos de 5 min). Após a leitura, é aplicada a fórmula: $FPS = FC \times EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$; onde FC = fator de correção (igual a 10); $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda; $I(\lambda)$ = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; $Abs(\lambda)$ = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda (λ), que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação ($EE \times I$) (Mansur et al., 1986; Santos et al., 1999; Freitas et al., 2001; Monteiro, 2008).

Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda: 290 λ (nm) corresponde a 0,0150 $EE(\lambda) \times I(\lambda)$, 295 a 0,0817, 300 a 0,2874, 305 a 0,3278, 310 a 0,1864, 315 a 0,0839 e 320 a 0,0180.

O extrato e o filtro foram diluídos em etanol até 0,2 mg/mL para analisar a varredura de absorvância (200 a 400 nm) e os picos de maior absorção. Para calcular o FPS das formulações foram preparadas soluções com concentração final de 0,2 mg/mL em etanol (95 %), de acordo com o método de Mansur (Ribeiro, 2004). As diluições das formulações foram analisadas no espectrofotômetro nos comprimentos de onda descritos acima. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de FPS.

2.5.4 Determinação do FPS *in vitro* pelo Método COLIPA

A atividade de fotoproteção foi conduzida em um analisador UV-2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*, seguindo o método COLIPA. Aplicaram-se 32,5 mg das amostras na superfície da placa, por meio de gotas do produto de forma uniforme e em seguida foram espalhadas por toda a superfície da mesma. As amostras foram pesadas de forma precisa e rápida, satisfazendo a taxa de aplicação de 1,3 mg/cm² em cada placa de polimetilmetacrilato. Para cada amostra, foram preparadas três placas, que foram mantidas protegidas da exposição à luz em câmara escura à temperatura de 20 °C durante 15 min. A radiação UV através da amostra foi medida de 290 a 450 nm, em intervalos de 1 nm, em 9 locais diferentes de cada placa (área de medição total = 2,0 cm²). As placas foram inseridas na fonte de radiação UV (temperatura mantida abaixo de 40 °C) e, depois, expostas à dose UV calculada. Logo, foram realizadas novas medições das amostras, para aquisição do segundo espectro UV. Para o cálculo do Valor do Comprimento de Onda Crítico (λ_c), utilizou-se uma série de valores de absorvância para cada uma das três placas separadas. A razão UVA/UVB foi, então, calculada como a razão entre o UVA-FP final e o marcador FPS. Todos os resultados foram expressos como uma média de 27 determinações (3 placas, 9 leituras cada, em locais diferentes) para cada formulação testada.

2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos completamente aleatórios, com cálculo de estatísticas F e respectivos valores de P. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias do tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey, e a diferença mínima significativa foi calculado para $\alpha = 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Determinação do conteúdo de flavonoides pelo ensaio reativo com cloreto de alumínio

A análise do teor de flavonoides foi realizada a fim de avaliar a porcentagem de substâncias presentes em MFM, e com isso, correlacionar as atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato, já que estas classes de substâncias são comumente associadas a tais atividades, devido a sua capacidade de sequestrar radicais livres (Seddiki et al., 2017).

Na Tabela 1 observa-se o teor de flavonoides para o extrato MFM, que apresentou $102,46 \pm 5,66$ mg/g equivalente a

rutina. Este resultado corrobora dados já descritos na literatura para as partes aéreas da planta, em que também foi utilizado o metanol para extração, e realizado o doseamento de flavonoides, que apresentou uma concentração semelhante ao encontrado neste estudo ($108 \pm 0,02$ mg/g equivalente a rutina) (Fabri et al., 2009).

Tabela 1 - Teor de flavonoides e atividade antioxidante de MFM pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio e sistema β -caroteno/ ácido linoleico.

Amostras	Teor de flavonoides (mg/g)	Fosfomolibdênio Atividade Antioxidante Relativa (%)		Sistema β -caroteno/ácido linoleico (38,5 μ g/mL)		
		Quercetina	Rutina	% Inibição	F1	F2
MFM	$102,46 \pm 5,66$	$33,80 \pm 5,88$	$51,52 \pm 1,66$	$45,10 \pm 1,79$	$0,49 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,01$
Rutina	-	-	-	$52,88 \pm 0,86$	$0,43 \pm 0,08$	$0,87 \pm 0,07$

Valores expressos como média \pm DP de três amostras. Fonte: Autores.

3.2 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante total do extrato foi avaliada pelo método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio (Prieto et al., 1999; Urban et al., 2021). Para isso, foram utilizadas duas substâncias padrão: quercetina e rutina, e os resultados foram expressos em porcentagem antioxidante relativa (RAA%).

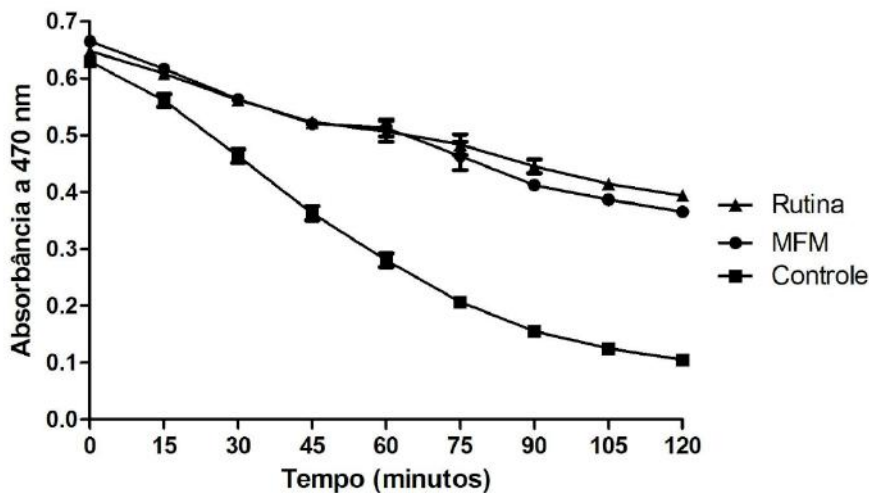
MFM obteve $33,80 \pm 5,88$ e $51,52 \pm 1,66$ % da atividade antioxidante em relação aos flavonoides quercetina e rutina, respectivamente (Tabela 1). Tais resultados sugerem que o extrato é promissor quanto a capacidade antioxidante total.

A atividade antioxidante de MFM também foi testada pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. O método se baseia em medidas espectrofotométricas da despigmentação (oxidação) do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Através desta técnica, a amostra é avaliada pela capacidade de proteger um substrato lipídico da peroxidação (Duarte-Almeida et al., 2006).

Na tabela 1, estão representados os resultados da porcentagem de inibição de MFM e rutina. MFM apresentou $45,10 \pm 1,79$ % de inibição da oxidação na concentração de $38,46 \mu$ g/mL, sendo considerado significativo quando comparado ao padrão. A eficiência antioxidante das amostras também foi estimada a partir dos parâmetros F1 e F2. Neste caso, para que o desempenho do antioxidante seja satisfatório, estes valores não devem ser superiores a 1 (Nascimento, Araújo & Melo, 2010). Conforme apresenta a Tabela 1, na concentração de $38,46 \mu$ g/mL, o extrato se mostrou eficiente em bloquear a formação inicial de radicais livres (F1 igual a $0,49 \pm 0,04$), contudo, para a fase de propagação, o extrato não demonstrou eficiência antioxidante, pois atingiu valores superiores a 1 (F2 igual a $1,34 \pm 0,01$). Dessa forma, MFM age no início do processo oxidativo, bloqueando a reação em cadeia. A porcentagem de inibição e a eficiência antioxidante do padrão rutina foram significativamente superiores às do extrato ($P < 0,05$).

Na curva de decaimento (Figura 1), observa-se que o controle evidencia uma inclinação maior em relação ao extrato e rutina, revelando que estes foram capazes de reduzir a despigmentação do β -caroteno (refletido na absorbância), que está diretamente relacionada com a inibição da oxidação do ácido linoleico. As curvas do controle (100% de oxidação), da rutina e MFM apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$).

Figura 1 – Cinética da reação sistema β -caroteno/ácido linoleico. Comparação do decaimento da absorbância de MFM e da rutina em relação ao controle 100% de oxidação ao longo das duas horas de reação. MFM – cinética da reação do extrato metanólico de *M. frigidus*; Rutina – cinética da reação da substância de referência rutina; Controle – cinética da reação da emulsão e metanol, considerado como 100% de oxidação.



Fonte: Autores.

A atividade antioxidante dos flavonoides já é bem elucidada. Por meio de doação de prótons e sequestro de íons metálicos, essa classe de substância promove a neutralização de radicais livres, além de inibir a propagação da peroxidação lipídica (Seddiki et al., 2017). Neste sentido, a presença de flavonoides, como a rutina, corrobora o potencial antioxidante de MFM.

Apesar da atividade antioxidante de MFM ter sido estatisticamente inferior aos controles positivos, os resultados obtidos nos testes são promissores, visto que MFM se comporta como uma mistura complexa, com substâncias antioxidantes e não antioxidantes, enquanto os padrões apresentam alto grau de pureza.

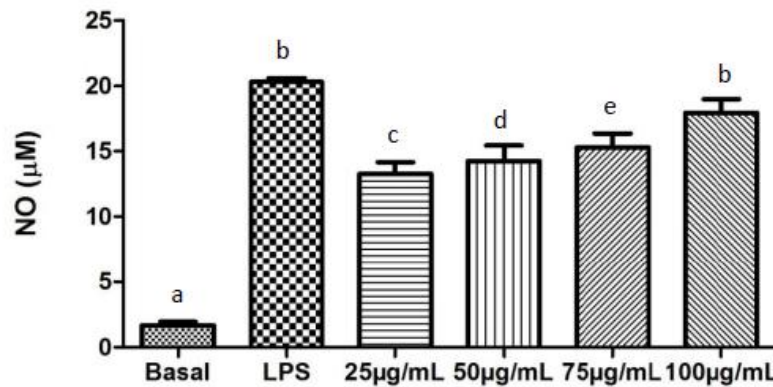
Alguns estudos anteriores investigaram a atividade antioxidante das partes aéreas *M. frigidus* e obtiveram resultados satisfatórios. Os métodos de redução do fosfomolibdênio e do sistema β -caroteno/ácido linoleico também já foram propostos, a fim de avaliar a atividade antioxidante das partições do extrato metanólico de *M. frigidus*, que demonstraram potencial antioxidante promissor (Fabri et al., 2009; Ferreira et al., 2021).

3.3 Atividade anti-inflamatória

3.3.1 Dosagem de óxido nítrico

Na Figura 2 são apresentadas as dosagens indiretas de NO pelo método de Griess. As células tratadas com MFM nas concentrações de 25 e 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram redução significativa dos níveis de NO, em relação às células tratadas com LPS sem nenhum tratamento, sendo que a menor concentração de MFM, 25 $\mu\text{g/mL}$, apresentou maior diminuição do NO celular ($13,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$). O extrato é uma matriz complexa, composta por uma variedade de substâncias que, quando em altas concentrações no meio, podem se aglomerar e sofrer precipitação. Desta forma, a capacidade de interagir com o radical NO e doar prótons é alterada, justificando a maior atividade do extrato em baixas concentrações (Adachi, 1995).

Figura 2 - Dosagem indireta de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7, basais, tratados com LPS e após tratamento com MFM nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Barras identificadas com letras distintas diferem entre si (95%).

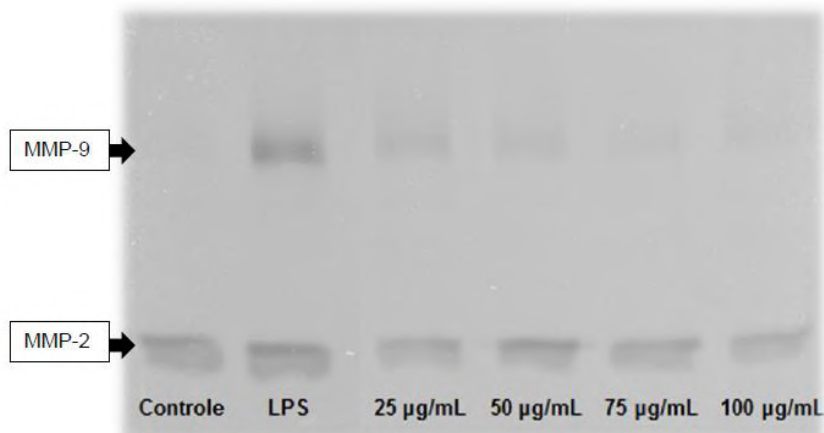


Fonte: Autores.

3.3.2 Atividade de metaloproteases

A avaliação da atividade anti-inflamatória por meio de metaloproteinase foi determinada pelo doseamento das matrizes MMP-2 e MMP-9. A atividade de MMP-2 e MMP-9 foram analisadas por zimografia em eletroforese em gel de poliacrilamida com gelatina (Figura 3).

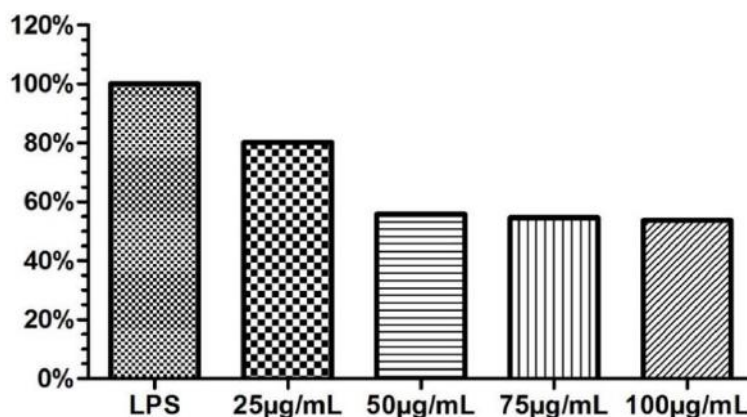
Figura 3 - Zimografia em eletroforese de gel de poliacrilamida para doseamento das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 tratados com LPS e MFM nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL.



Fonte: Autores.

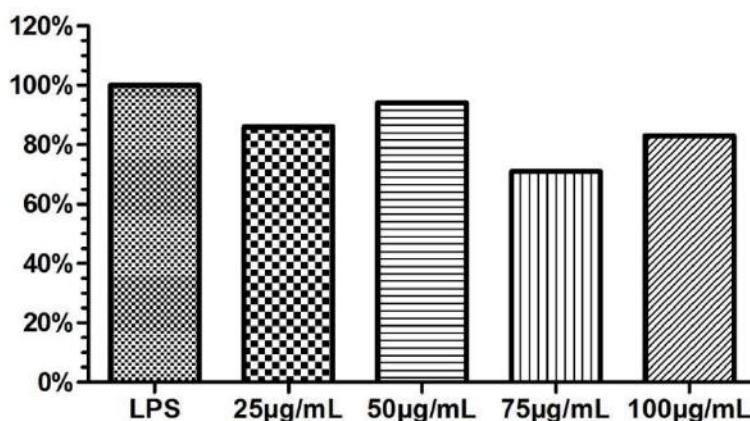
As intensidades das bandas estão expressas nas figuras 4 e 5. O zimograma e as análises densitométricas mostraram que, no controle, foi possível identificar somente a atividade de MMP-2. Nas células estimuladas com LPS, observam-se bandas de atividade de MMP-2 e MMP-9. Nas células tratadas com MFM, observou-se uma redução da atividade da MMP-9 com o aumento da concentração de MFM, além disso, MFM não inibiu a atividade da MMP-2. Sendo um fator importante, visto que a inibição da atividade da MMP-9 é apresenta uma relevância maior, visto que ela está presente em processos inflamatórios, enquanto que a MMP-2 está presente normalmente nos tecidos, como observado no grupo controle da zimografia, e não está associada à inflamação. Neste caso, não houve interferência de outras substâncias presentes no extrato, como no teste de dosagem indireta de NO. Tal fato é esperado, visto que o parâmetro avaliado e o método usado são diferentes.

Figura 4 - Análise densitométrica da atividade de MMP-9, obtida pela zimografia.



Fonte: Autores.

Figura 5 - Análise densitométrica da atividade de MMP-2, obtida pela zimografia.



Fonte: Autores.

O óxido nítrico é um importante mediador inflamatório, secretado por macrófagos e neutrófilos (CARNEIRO et al, 2019). Este radical livre atua na expressão da ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), aumentando a produção de prostaglandinas, além de estimular a vasodilatação, o que promove a quimiotaxia e o processo de diapedese pelo gradiente de citocinas pró inflamatórias que estão presentes (Cross & Wilson, 2003; Dusse ET AL., 2003).

As metaloproteinases (MMPs) de matriz são expressas em resposta a estímulos patológicos. Estas têm papel importante na eliminação de infecções durante a fase inicial da resposta imune. Porém, a hiperexpressão dessas MMPs pode desencadear a degradação da matriz, além de vários processos patológicos (Suárez, 2014). Essas enzimas são mediadores importantes da inflamação, remodelação do tecido e aumento da carcinogênese (Pujada, 2017).

Os resultados obtidos sugerem que MFM pode atuar na redução do processo inflamatório, bem como, na proteção contra danos causados pela resposta exacerbada. Estudos anteriores com o extrato metanólico de *M. frigidus* demonstraram que o extrato apresentou potencial anti-inflamatório promissor, sendo tal atividade associada à presença de polifenóis e terpenos na espécie (Fabri et al., 2014).

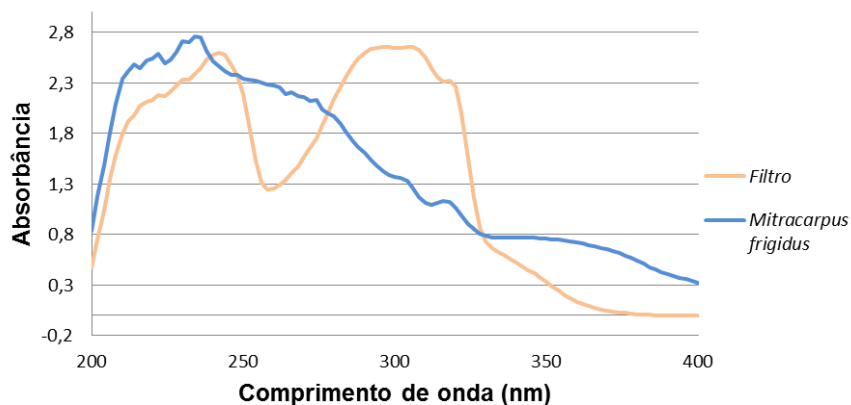
3.4 Atividade fotoprotetora

3.4.1 Determinação do FPS in vitro pelo método de Mansur (1986)

A avaliação da atividade fotoprotetora foi realizada a partir de MFM e filtro UVA e UVB puros ou em combinação,

incorporados a uma formulação base. Os espectros de absorção para MFM e para o filtro (Figura 6) mostram picos de absorbância na região do ultravioleta. O extrato apresentou maior absorbância que o filtro no intervalo da radiação UVA (320-400). O filtro apresentou picos nos comprimentos de onda 242, 298 e 306 nm. Já MFM apresentou picos nos comprimentos de onda 220, 234, 304 e 316 nm, compatível com a presença de metabólitos fenólicos (Zeraik, 2010).

Figura 6 - Espectro de varredura do filtro e de MFM na concentração de 0,2 mg/mL.



Fonte: Autores.

Um FPS considerado aceitável, dentro da legislação brasileira, deve apresentar fator de proteção maior que 6 (Anvisa, 2012). O cálculo de FPS pelo método de Mansur foi realizado na concentração 0,2 mg/mL. As formulações também foram diluídas na mesma concentração e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de FPS das amostras livres e incorporadas à formulação pelo método de Mansur.

Amostras	FPS (0,2 mg/mL)
MFM	10,72 ± 0,08
Filtro	27,70 ± 0,14
Formulação	0,12 ± 0,01
Formulação Filtro 5%	2,38 ± 0,04
Formulação Filtro 10%	4,85 ± 0,11
Formulação MFM 5%	0,57 ± 0,03
Formulação MFM 10%	1,38 ± 0,03
Formulação MFM 2,5% e Filtro 2,5%	1,67 ± 0,06
Formulação MFM 5% e Filtro 5%	2,78 ± 0,26

Fonte: Autores.

De acordo com Cabral et al., (2011), os filtros solares naturais apresentam absorção consideravelmente baixa. O recomendado é a utilização dos extratos vegetais como coadjuvantes aos filtros sintéticos, a fim de promover uma intensificação dos valores de FPS através do efeito sinérgico dos extratos com o filtro sintético empregado (Nascimento et al.,

2009). Os FPS encontrados para as formulações não apresentaram resultados significativos ($FPS > 6$) utilizando o método de Mansur.

3.4.2 Determinação do FPS *in vitro* pelo Método COLIPA

A atividade fotoprotetora *in vitro* de MFM também foi determinada pelo método COLIPA, preconizado pela ANVISA. Na tabela 3, são expressos os resultados das formulações com MFM e filtro. O extrato contribuiu para o aumento do FPS da formulação, visto que, na formulação que continha apenas 5% do filtro, o FPS foi menor do que na formulação da associação. As formulações que apresentaram FPS maior que 6 caracterizam-se pela composição de filtro 10% e a associação de 5% de MFM e 5% do filtro.

Tabela 3 - Valores do FPS das amostras incorporadas à formulação pelo método de transmitância difusa (COLIPA).

Amostra	FPS Pré-irradiação	FPS Pós-irradiação	Relação UVA/UVB	Comprimento de onda crítico (nm) - λ_c
Formulação	0,82 ± 0,08	0	-	-
Formulação Filtro 5%	4,86 ± 0,66	4,38 ± 1,05	0,23	345
Formulação Filtro 10%	6,51 ± 0,46	6,97 ± 1,99	0,24	346
Formulação MFM 5%	2,37 ± 0,34	2,12 ± 0,30	0,71	379
Formulação MFM 10%	3,02 ± 0,14	3,02 ± 0,10	0,76	382
Form. MFM 2,5% e Filtro 2,5%	2,96 ± 0,01	2,65 ± 0,22	0,33	364
Form. MFM 5% e Filtro 5%	8,61 ± 0,49	4,69 ± 0,63	0,35	368

Fonte: Autores.

Após exposição à radiação UV, observou-se que a maioria das formulações apresentou estabilidade fotoprotetora, exceto a formulação contendo a associação de MFM e filtro a 5%. O desvio padrão entre as placas das formulações contendo somente o extrato, e também a formulação contendo filtro e extrato a 2,5%, se mantiveram baixa, sugerindo que o extrato apresentou estabilidade após a radiação. Contudo, os desvios padrão das formulações contendo somente o filtro aumentaram consideravelmente após a radiação. Ainda na tabela 3, observa-se o comprimento de onda crítico (λ_c). A FDA classifica os produtos em uma escala composta por cinco categorias, sendo 0 ($\lambda_c < 325$ nm), 1 ($325 \leq \lambda_c < 335$), 2 ($335 \leq \lambda_c < 350$), 3 ($350 \leq \lambda_c < 370$) e 4 ($370 \geq \lambda_c$) (FDA, 2007). Das formulações estudadas, duas se enquadram na categoria 2, duas na categoria 3 e duas formulações contendo MFM se enquadram na categoria 4. Outra possível classificação é a que foi criada por Springsteen et al. (1999), que classifica os produtos com λ_c maior que 370 nm como de proteção solar de largo espectro, oferecendo proteção contra UVA e UVB. A RDC nº 30 de junho de 2012 coloca como pré-requisito para filtros solares, FPS UVA igual ou maior que 1/3 do valor do FPS declarado, e comprimento de onda crítico mínimo de 370 nm (ANVISA, 2012). Por isso, foi avaliada também, a razão UVA/UVB pela transmitância difusa (Tabela 3). Três das formulações contendo MFM apresentaram razão UVA/UVB superior à que é exigida, o que reforça a importância do extrato como coadjuvante para intensificar a fotoproteção.

No presente estudo, a análise da atividade fotoprotetora do extrato pelos métodos de Mansur e COLIPA evidenciaram resultados estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), como pode ser observado nas tabelas 2 e 3. Contudo, o método COLIPA é preconizado ao se realizar testes fotoprotetores *in vitro* (Ruvolo Júnior, 1997; Ribeiro, 2004).

As formulações fotoprotetoras com associações de extratos vegetais, comumente ricos em constituintes fenólicos, e outros filtros químicos de radiação UV têm despertado grande interesse, pois a atuação dos constituintes fenólicos na absorção da radiação solar e sua ação antioxidante, podem intensificar a proteção final do produto e/ou neutralizar os radicais livres produzidos na pele, após exposição ao sol (Souza et al., 2013; De Medeiros et al., 2020).

O extrato e filtro apresentaram uma ação sinérgica, entretanto, o resultado da fotoproteção não foi tão significativo para um produto fotoprotetor, nas concentrações testadas. Neste sentido, deve-se testar concentrações superiores tanto do extrato quanto do filtro nas formulações, ou ainda a utilização de outros filtros sintéticos, para obter uma formulação com ação fotoprotetora considerável. Outra sugestão seria a incorporação do extrato a um produto fotoprotetor como um coadjuvante, exercendo ação antioxidante, anti-inflamatória e de fotoenvelhecimento, visto que a radiação UVA é a principal indutora de processos oxidativos: ao ser absorvida, reage com o oxigênio molecular, produzindo espécies reativas capazes de induzir reações inflamatórias na pele e danos ao DNA (Souza et al., 2004). A partir do que foi discutido, observa-se que o MFM tem potencial para compor, como coadjuvante, um produto com a função de proteção solar ou pós sol.

4. Conclusão

A partir deste estudo observou-se que MFM tem potencial promissor para as atividades antioxidante e anti-inflamatória. Tais atividades podem estar relacionadas ao conteúdo flavonoídico do extrato. Além disso, a formulação contendo MFM e um filtro solar UVA e UVB, em combinação, apresentou sinergismo. Neste sentido, a associação do extrato com filtros solares sintéticos é interessante visto que, o extrato age como coadjuvante no efeito fotoprotetor, anti-inflamatório e antioxidante, sendo capaz de proporcionar uma proteção total da pele, principalmente quando são considerados os efeitos crônicos como o fotoenvelhecimento e o envelhecimento precoce.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pelo suporte financeiro e ao Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich do Departamento de Botânica da UFJF pela identificação botânica da espécie vegetal.

Referências

- Adachi, Y. (1995). Dynamic aspects of coagulation and flocculation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 56, 1-31.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012). *Resolução - RDC nº 30, 01 de junho de 2012*. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências, Brasília, DF, 01 jul. 2012.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004). *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, 1, 1-52. Brasília, DF, maio. 2004.
- Araújo, A. D. De, Oliveira, F. G. Da S., Lacerda, F. F., Silva, C. E. S. Da, Santos, B. S. Dos, Bezerra-Filho, C. M., Ramos, B. De A., Harand, W., Silva, N. H. Da, Paiva, P. M. G., Almeida, J. R. G. Da S., Silva, M. V. Da & Correia, M. T. Dos S. (2021). Phytochemical screening, in vitro antioxidant, photoprotective and hemolytic activities of ethyl acetate extracts of the fruits and branches from *Spondias tuberosa* (umbu). *Research, Society and Development*, [S. l.], 10 (1), e38610111825.
- Barboza, J. N., Bezerra Filho, C. S. M., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R. & de Sousa, D. P. (2018). An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-9.
- Barth, A. L. (2000). *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas*. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos.
- Batista, C. M., Alves, A. V. F., Queiroz, L. A., Lima, B. S., Filho, R. N. P., Araújo, A. A. S., De Albuquerque Júnior, R. L. C. & Cardoso, J. C. (2018). The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 198-207.
- Cabral, L. D. S.; Pereira, S. O. & Partata, A. K. (2011). Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. *Revista Científica do ITPAC*, 4, 1-10.

- Carneiro, N.V.Q., Da Silva, H.B.F., Da Silva, R.R., Carneiro, T.C.B., Costa, R.S., Pires, A.O., Marques, C.R., Velozo, E.S., Conceição, A.S. Da Silva, T.M.S., Da Silva, T.M.G., Alcântara-Neves, N.M. & Figueiredo, C.A. (2019). *Sambucus australis* modulates inflammatory response via inhibition of nuclear factor kappa b (nf-kb) *in vitro*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91, 1-12.
- De Medeiros, M. A. C., Simões, M. M., Santos, B., Marques, F. M. C., Leite, M. F. M. da S., Oliveira, H. M. B. F. de, Oliveira, V. F. de, Cunha, S. M. D. da, Maia, G. L. de A., Sousa, A. P. de & Oliveira Filho, A. A. de. (2020) Evaluation of the photoprotective activity of the ethanolic extract of *Rhaphidodon echinus* Schauer. *Research, Society and Development*, [S. 1.], 9 (7), e585974410.
- Conrad, M., Kagan, V.E., Bayir, H., Pagnussat, G.C., Head, B., Traber, M.G. & Stockwell, B.R. (2018). Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes & Development*, 32, 602-619.
- Cross, R. K. & Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9, 179-189.
- Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (2), 446-452.
- Dusse, L. M. S.; Vieira, L. M. & Carvalho, M. G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39 (4), 343-350.
- Fabri, R. L., Garcia, R.A., Florêncio, J.R., Pinto, N.C.C., Oliveira, L.G., Aguiar, J.A.K., Ribeiro, A. & Scio, E. (2014). Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66 (5), 722-732.
- Fabri, R. L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S. & Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100 (1), 428-433.
- Lemos, A. S. de O., Campos, L. M., Souza, T. F., Paula P. L., Granato, J. T., Da Silva, J. V. G., Aragão, D. M. O., Rocha, V. N., Coimbra, E. S. & Fabri, R. L. (2022). Pharmacological investigation of antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022, rgac005.
- Ferreira, K. C., Oliveira, L. M., Paula, P. L. & Fabri, R. L. (2021). Avaliação do potencial antioxidante in vitro de partições do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*. *HU Revista*, 47, 1-10.
- Freitas, Z. M. F.; Gonçalves, J. C. S.; Santos, E. P. & Vergnanini, A. (2001). Glycerid esters of p-methoxycinnamic acid. A new sunscreen of the cinnamate class. *International Journal of Cosmetic Science*, 23, 147-152.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140, (6), 883-899.
- Guinea, M., Franco, V.A., Bazán, L., Martín, I.R. & González, S. (2012). In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (3-4), 1109-1117.
- Ma, W., Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Schneider, L. A., Nader, I.L., Raziwolf, Z., Schuller, J. & Scharffetter-Kochalek, K. (2001). Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26, 592-599.
- Mansur, J. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. A. & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61 (4), 121-124.
- Melo, M. S. O. M. & Mancini Filho, J. (1989). Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq). *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 25 (2), 147-157.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. & Van-Beer, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. *Food Chemistry*, 85 (2), 231-237.
- Miura, R.O., Yamagata, S., Miura, Y., Harada, T. & Yamagata, T. (1995). Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). *Analytical Biochemistry*, 225, 333-340.
- Monteiro, M. S. S. B. (2008). *Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas*. Filtros Solares em Nanocosméticos - Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia.
- Nascimento, C. S., Nunes, L. C. C., Lima, Á. A. N. De, Grangeiro Júnior, S. & Rolim Neto, P. J. (2009). Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, 4, 334-339.
- Nascimento, R. J., Araújo, C. R. & Melo, E. A. (2010). Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). *Alimentos e Nutrição*, 21 (2), 209-216.
- Pereira, Z.V., De Carvalho-Okano, R.M. & Garcia, F.C.P. (2006). *Rubiaceae* Juss. da reserva florestal Mata do paraíso, Viçosa, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, 20 (1), 207-224.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B. & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30 (1), 11-26.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269 (2), 337-341.
- Pujada, A., Walter, L., Patel, A., Bui, T., Zhang, Z., Zhang, Y., Denning, T. & Garg, P. (2017). Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis-associated cancer. *Oncotarget*, 8, 94650-94665.

- Ribeiro, R. P., Santos, V. M., Medeiros, E. C., Silva, V. A., Volpato, N. M. & Garcia, S. (2004). Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. *Infarma*, 16, 7-8.
- Ruvolo Júnior, E. C. (1997). Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (*in vivo*), FDA, COLIPA, SAA. *Cosmetics OnLine*, 19 (105), 37-46.
- Santos, E. P., Freitas, Z. M., Souza, K. R., Garcia, S. & Vergnanini, A. (1999). *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *International Journal of Cosmetic Science*, 21 (1), 1-5.
- Seddiki, Y., Silva, H.M. & Silva, F.M. (2017). Antioxidant properties of polyphenols and their potential use in improvement of male fertility: A review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1, 612-617.
- Shapiro, S. D., Kelley, D. & Kobayashi, D. (2001). Measurement of metalloproteinases. *Methods in Molecular Medicine*, 56, 383-390.
- Silva, J. B., Mendes, R. F., Tomasco, V., Pinto, N. C. C., Oliveira, L. G., Rodrigues, M. N., Aragão, D. M. O., Aguiar, J. A. K., Alves, M. S., Nogueira, M. C., Castañon, M., Ribeiro, A. & Scio, E. (2017). New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 399-406.
- Souza, F. P., Campos, G. R. & Packer, J. F. (2013). Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34 (1), 69- 77.
- Souza, S. R. P., Fischer, F. M. & Souza, J. M. P. (2004). Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. *Revista de Saúde Pública*, 38 (4), 588-598.
- Springsteen, A., Yurek, R., Frazier, M. & Carr, K. F. (1999). In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Analytica Chimica Acta*, 380 (2-3), 155-164.
- Suárez, D.F., Consuegra, J., Trajano, V.C., Gontijo, S.M.L., Guimarães, P.P.G., Cortés, M.E., Denadai, Â.L. & Sinisterra, R.D. (2014). Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. *Colloids and Surface B*, 118, 194-201.
- Urban, A. M., Swiech, J. N. D., Moraes, G. S., Paludo, K., Ito, C. A. S., Dias, J. de F. G., Montrucchio, D. P., Miguel, O. G. & Miguel, M. D. (2021). *Cantinoa althaeifolia* essential oil: chemical composition and biological, antioxidant, antimicrobial, and antitumor activities. *Research, Society and Development*, [S. 1.], 10 (2), e9910212040.
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*, 59, 391-412.
- Widel, M., Krzywon, A., Gajda, K., Skonieczna, M. & Rzeszowska-Wolny, J. (2014). Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species Free Radical. *Biology and Medicine*, 68, 278-287.
- Wu, Q., Yu, J., Li, M., Tan, L., Ren, X., Fu, C., Chena, Z., Cao, F., Ren, J., Li, L., Liang, P., Zhang, Y. & Meng, X. (2018). Nanoengineering of nanorattles for tumor treatment by CT imaging-guided simultaneous enhanced microwave thermal therapy and managing inflammation. *Biomaterials*, 179, 122-133.
- Zeraik, M. L. (2010). *Tese de Doutorado em Química Analítica*. Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Degener).