

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISIS TAVARES VILAS BOAS

***BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*: avaliação química e formulação com ação
fotoprotetora e antioxidante**

Belo Horizonte

2021

ISIS TAVARES VILAS BOAS

BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA: avaliação química e formulação com ação fotoprotetora e antioxidante

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rachel Oliveira Castilho, UFMG.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Scopel

Belo Horizonte

2021

Vilas Boas, Isis Tavares.
V697b *Baccharis Dracunculifolia* [recurso eletrônico] : avaliação química e formulação com ação fotoprotetora e antioxidante / Isis Tavares Vilas Boas. – 2021.

1 recurso eletrônico (126 f. : il.) : pdf

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. Flavonoides – Teses. 3. Compostos orgânicos – Teses. 4. Antioxidantes – Teses. 5. Pele – Teses. I. Castilho, Rachel Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.537

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA ÍSIS TAVARES VILAS BOAS

Realizou-se, no dia 30 de julho de 2021, às 08:30 horas, por videoconferência, a 353ª defesa de dissertação, intitulada *Baccharis dracunculifolia: AVALIAÇÃO QUÍMICA E FORMULAÇÃO COM AÇÃO FOTOPROTETORA E ANTIOXIDANTE* apresentada por ÍSIS TAVARES VILAS BOAS, número de registro 2019672248, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Rach Oliveira Castilho - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Marina Scopel - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a) André Augusto Gomes Faraco - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Rodrigo Rodrigues de Oliveira (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), Prof(a). Bianca Aloise Maneira Corrêa Santos (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Dr(a) Tiago Juliano Tasso de Souza (Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental Ltda), Prof(a). Vinícius Gonçalves Maltarollo.

A Comissão considerou a Dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Bianca Aloise Maneira Corrêa Santos, Usuário Externo**, em 02/08/2021, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 02/08/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Augusto Gomes Faraco, Professor do Magistério Superior**, em 02/08/2021, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Scopel, Professora do Magistério Superior**, em 02/08/2021, às 21:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Juliano Tasso de Souza, Usuário Externo**, em 11/08/2021, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Goncalves Maltarollo, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2021, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0867770** e o código CRC **3F7FA470**.

Dedico este trabalho àqueles que são
A minha força, inspiração, exemplo
E o bem mais precioso que tenho:
Minha família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Rachel Oliveira Castilho, pela sua sensibilidade, por compartilhar tanto conhecimento e pelo encantamento que provoca onde passa. Obrigada por me inspirar, por me permitir criar e participar dessa revolução que você provoca em todos nós.

À Professora Marina Scopel, pela coorientação deste trabalho. Obrigada pela ajuda na análise de LC-MS, por todo conhecimento compartilhado, pelas dicas nos experimentos, por ser tão presente e por dividir a sua experiência e trajetória comigo.

Ao Professor André Augusto Gomes Faraco, pela coorientação deste trabalho. Obrigada pela energia, animação e valiosas contribuições.

À Juliana Mendes Amorim, pela colaboração na análise de CLAE e pelos desafios que passamos juntas. Obrigada por todo aprendizado.

À Professora Bianca Aloise M.C. Santos e sua equipe, pela colaboração na realização dos experimentos *in silico* com as moléculas do Alecrim do Campo e pelas valiosas contribuições.

À minha amiga e doutoranda Caroline de Almeida Freitas Accioli, obrigada pela sua parceria, por dividir os momentos de angústia e felicidades comigo, e pelas suas contribuições sempre positivas em tudo o que eu faço e em tudo o que fazemos juntas. Obrigada pela colaboração com os experimentos *in silico* deste projeto.

À Raiane Rosales Diniz, pela colaboração na realização dos experimentos com *Saccharomyces*. Obrigada pela dedicação e esforço mesmo durante esse período que vivemos.

Aos meus familiares, que são a minha base e força. Em especial: Minha mãe: Mônica Tavares Vilas Boas, meu pai: Florisvaldo Santos Vilas Boas Filho e meu irmão: Felipe Tavares Vilas Boas, por acreditarem em mim (até mais do que eu acreditei) e por me levantarem em todas as quedas. Meus sobrinhos, cunhada, tios e avó, a vocês todo o meu amor e gratidão. Obrigada pela melhor família que eu poderia ter.

Ao Norberto Fernandes (Beto), por ser luz e um porto seguro na minha vida. Pela sua amizade verdadeira, pelas suas contribuições e conselhos desde que nos conhecemos.

Pela sua incansável ajuda em tudo o que pode no meu projeto e na minha vida. Obrigada, a sua excelência e o amor que você coloca em tudo na vida e na profissão me inspiram.

A todos os alunos e técnicos do laboratório de farmacognosia e homeopatia da UFMG: GnosiaH. Obrigada por tornar melhor os meus dias, pelos ensinamentos, pela ajuda e pela inspiração, em especial, Thais Magalhães de Acácio e Olavo Mateus de Carvalho, pela amizade construída, por cada momento compartilhado e pelas risadas que demos e damos sempre.

A todos os meus amigos, pela compreensão, ensinamentos, força e torcida. Em especial: Cinthia Bárbara, Carlos Pinheiro, Marina Nader, Ademar Júnior, Larissa Albuquerque e Victor Albuquerque, que acompanharam de perto essa jornada desafiadora.

À botânica Nayara, pela ajuda na primeira coleta da *Baccharis dracunculifolia* e depósito no herbário da UFMG.

À CAPES pelo apoio financeiro para que este projeto fosse possível.

Foi o meu amor
Que me disse assim
Que a flor do campo é o Alecrim
É o alecrim

RESUMO

Baccharis dracunculifolia (alecrim-do-campo) é uma planta nativa do Brasil, tradicionalmente utilizada pela população na forma de chá para tratar condições inflamatórias. Esta indicação de uso é confirmada por estudos sobre sua composição química e atividades farmacológicas, incluindo patologias da pele. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação fotoprotetora e antioxidante da espécie *B. dracunculifolia*, utilizando métodos *in vitro* e *in silico*, correlacionando-os com o seu perfil fitoquímico. Para isso, as condições de extração do material vegetal foram estudadas para obtenção de extratos ricos em substâncias fenólicas e sua composição química foi verificada por análises cromatográficas e espectrometria de massa. O extrato etanólico de *B. dracunculifolia* otimizado foi avaliado quanto ao (i) potencial antioxidante pela eliminação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; (ii) auto-oxidação de ácido linoleico; (iii) fator de proteção solar (FPS) *in vitro*; e (iv) avaliação do potencial antimutagênico em modelo de leveduras. Por fim, foram estudadas *in silico* as propriedades estereoeletrônicas envolvidas com a ação antioxidante e de absorção UV. Foi possível concluir que a utilização do solvente etanol associado ao refluxo a 70 °C como método extrativo permitiu a extração, principalmente, de flavonoides e derivados cafeoilquínicos, artepilina C e derivados prenilados. Em sinergia, estas substâncias permitiram maior ação antioxidante, com concentração efetiva (CE₅₀) igual a 12,9, e FPS 18,9 *in vitro*, responsável pela proteção UV de amplo espectro e atividade antioxidante, observada em todos os experimentos realizados. Em estudos *in silico*, a melhor capacidade doadora de elétrons foi observada no flavonoide quercetina, enquanto a maior capacidade antioxidante, no ácido clorogênico. A análise *in vitro* do extrato otimizado em modelo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* permitiu a confirmação do potencial de proteção contra lesões citotóxicas e mutagênicas induzidas pela radiação UV. Os resultados obtidos fornecem perspectivas para as investigações mais detalhadas do efeito fotoprotetor e antioxidante de *B. dracunculifolia* e da sua padronização quantitativa, visando seu futuro uso em formulações cosméticas fotoprotetoras. Palavras-chave: alecrim do campo; flavonoides; fenilpropanoides; proteção solar; antioxidante; pele.

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia is a plant native to Brazil, traditionally used by the population in the form of tea to treat inflammatory conditions. This indication for use is confirmed by studies on its chemical composition and pharmacological activities, including skin pathologies. Thus, the objective of this study was to evaluate the photoprotective and antioxidant action of the species *B. dracunculifolia*, using *in vitro* and *in silico* methods, correlating them with its phytochemical profile. For this, the extraction conditions of the plant material were studied to obtain extracts rich in phenolic substances and their chemical composition was verified by chromatographic analysis and mass spectrometry. The optimized ethanolic extract of *B. dracunculifolia* was evaluated for (i) antioxidant potential by scavenging the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; (ii) autoxidation of linoleic acid; (iii) *in vitro* sun protection factor (SPF); and (iv) evaluation of the antimutagenic potential in a yeast model. Finally, the stereoelectronic properties involved with the antioxidant action and UV absorption were studied *in silico*. It was possible to conclude that the use of ethanol solvent associated with reflux at 70 °C as an extractive method allowed the extraction, mainly, of flavonoids and caffeoylquinic derivatives, artepillin C and prenylated derivatives. In synergy, these substances allowed greater antioxidant action, with effective concentration (EC₅₀) equal to 12.9, and SPF 18.9 *in vitro*, responsible for broad-spectrum UV protection and antioxidant activity, observed in all experiments carried out. In *in silico* studies, the best electron donating capacity was observed in the flavonoid quercetin, while the highest antioxidant capacity was observed in chlorogenic acid. The *in vitro* analysis of the optimized extract in a model of *Saccharomyces cerevisiae* strains allowed confirmation of the potential for protection against cytotoxic and mutagenic lesions induced by UV radiation. The results obtained provide perspectives for more detailed investigations of the photoprotective and antioxidant effect of *B. dracunculifolia* and its quantitative standardization, aiming at its future use in photoprotective cosmetic formulations. Keywords: wild rosemary; flavonoids; phenylpropanoids; solar protection; antioxidant; skin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Espectro da radiação solar, com demonstrativo da ação de polifenóis nas faixas correspondentes.	24
Figura 2	Semelhança estrutural entre filtros orgânicos tradicionalmente utilizados em cosméticos e os fenólicos. Os fenilpropanoides estão representados pelo ácido ciâmico e os flavonóides estão representados pela crisina.	28
Figura 3	<i>B. dracunculifolia</i> . A. Arbusto em ambiente natural em Caxias do Sul (29°02'27.9"S 50°59'39.1"W), B. Galho de coleta realizada na Estação Ecológica da UFMG-Belo Horizonte, C e D. Detalhes das folhas. Fontes: arquivo pessoal (B, C e D) e (A) cedida por Marina Scopel.	33
Figura 4	Mecanismos de ação descritos para <i>B. dracunculifolia</i>	38
Figura 5	Rendimento extrativos (p/p) obtidos para os extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> no planejamento experimental 2 ³ e no fracionamento para a seleção de condições extrativas ótimas e composição química.	58
Figura 6	Fator de proteção solar dos extratos etanólicos <i>in vitro</i> . Método de Mansur (1986)	61
Figura 7	Valores de CE ₅₀ obtidos pelo método de DPPH para análise da ação antioxidante <i>in vitro</i> de extratos de <i>B. dracunculifolia</i> .	62
Figura 8	Análise de componentes principais do extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> . Componentes avaliados no <i>score plot</i> : 1- FPS, 2- área dos picos fenilpropanoides majoritários. 3- Atividade antioxidante (DPPH). À direita (<i>loading plot</i>) estão as amostras (A-N).	64
Figura 9	Análise de componentes principais do extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> . Componentes avaliados: 1- FPS, 2- área dos picos flavonoides majoritários. 3- Atividade antioxidante (DPPH).	65
Figura 10	Análise de componentes principais do extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> . Componentes avaliados: 1- ação antioxidante (DPPH), 2- área dos picos dos fenilpropanoides majoritários. 3- área dos picos flavonoides majoritários	66

Figura 11	Cromatograma de CLAE-DAD do extrato G visualizado em 270 nm. Gráficos do espectro de ultravioleta de A-K dos principais picos do cromatograma	71
Figura 12	Cromatograma de CLAE-DAD do extrato G co-injetado com ácido cafeico (270 nm) e espectro UV-vis do ácido cafeico.	72
Figura 13	Cromatograma de CLAE-DAD do extrato G co-injetado com ácido ferúlico (270 nm) e espectro UV-vis do ácido ferúlico.	72
Figura 14	Cromatograma de CLAE-DAD do extrato G co-injetado com apigenina (270 nm) e espectro UV-vis da apigenina	73
Figura 15	Cromatogramas do extrato G de <i>B. dracunculifolia</i> obtidos no experimento de ESI-QTOF-LC-MS/MS. A. Cromatograma de pico base (BPC – <i>base peak chromatogram</i>) B. Cromatograma observado em 270 nm C. Cromatograma observado em 350 nm.	74
Figura 16	Comparação da absorção UV experimental	82
Figura 17	Comparação entre o comprimento de absorção máximo (nm) teórico e experimental de artepilina C, ácido cafeico, ácido cinâmico, 3-prenilcinamato de alila, ácido ferúlico, canferol, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, rutina e quercetina, presentes no extrato de <i>B. dracunculifolia</i>	84
Figura 18	Superposição do espectro de absorção UV das substâncias estudadas, mostrando um amplo espectro de proteção na faixa ultravioleta (UV-B, UV-A I e UV-A II)	91
Figura 19	Sobrevivência da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) na presença e ausência de tratamento com o extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> (amostra G)	97
Figura 20	Mutagênese na DL ₃₇ da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) na presença e ausência de tratamento com o extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (amostra G)	98
Quadro 1	Dados da Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usada na avaliação do potencial fotoprotetor e antimutagênico do extrato G de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades biológicas descritas para a espécie <i>B. dracunculifolia</i>	37
Tabela 2	Níveis estudados no planejamento experimental 2 ³ para a seleção de condições do método extrativo, com realização de 2 replicatas	44
Tabela 3	Sistema em gradiente de eluição linear empregado para obtenção dos perfis cromatográficos	50
Tabela 4	Doses de UV-A e UV-B contidos na Luz Solar Simulada (LSS) e seus respectivos tempos de irradiação.	54
Tabela 5	Valores do fator de proteção solar dos extratos etanólicos de <i>B. dracunculifolia</i>	60
Tabela 6	Dados brutos analisados preliminarmente no planejamento experimental	67
Tabela 7	Quantificação de flavonoides totais segundo a monografia de Calêndula adaptada e fenólicos totais segundo a monografia do Barbatimão adaptada (Farmacopeia Brasileira, 6 ^a ed.).	68
Tabela 8	Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desrepliação do extrato G de <i>Baccharis dracunculifolia</i> utilizando ESI-QTOF-LC-MS	77
Tabela 9	Comprimento de onda (λ), energia de transição, força de oscilação (f), orbitais de fronteira molecular (FMO) envolvidos e faixa obtida com TD-DFT/B3LYP/6-31G(d) para a artepilina C, ácido cafeico, ácido cinâmico, 3-prenilcinamato de alila, ácido ferúlico, canferol, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, rutina e quercetina,.	85
Tabela 10	Energia de fronteira do orbital molecular e mapa de isodensidade de ácidos fenólicos: 3-prenilcinamato de alila, artepilina C, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido clorogênico	88
Tabela 11	Energia do orbital de fronteira molecular e mapa de isodensidade de flavonoides quercetina, rutina, canferol.	90
Tabela 12	Parâmetros antioxidantes dos ácidos fenólicos e flavonoides de <i>B. dracunculifolia</i> obtidos por cálculos teóricos (eV).	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ação antioxidante
AME	Aromadendrina-4-metiléter
BHCB	Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE50	Concentração efetiva
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DL37	Dose responsável pela sobrevivência de 37% da população
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila.
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-QTOF -LC/MS	<i>Electrospray Ionization-Time-of Flight-Liquid Chromatography Mass Spectra</i>
FP UVA	Fator de proteção UV-A
FPS	Fator de proteção solar
IV	Radiação infravermelho
LSS	Luz solar simulada
MeOH	Metanol
MMFF	Campo de força molecular Merck
NFKB	Fator nuclear kappa β

OH	Hidroxila
PABA	Ácido para-amino benzóico
PEG	Polietilenoglicol
q.s.p	Quantidade suficiente para
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
DFT	Teoria funcional da densidade
UV	Radiação ultravioleta
UV-A	Radiação ultravioleta A
UV-B	Radiação ultravioleta B
TiO₂	Dióxido de titânio
YPD	Peptona dextrose para leveduras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 O câncer de pele.....	23
2.2 Fotoproteção.....	23
2.3 Potencial dos produtos naturais utilizados com finalidade fotoprotetora.....	27
2.4 A família Asteraceae e a espécie <i>B. dracunculifolia</i>	32
2.5 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Equipamentos e instrumentos	41
4.2 Materiais de consumo.....	41
4.2.1 <i>Solventes e reagentes</i>	41
4.2.2 <i>Substâncias Químicas de Referência (SQR)</i>	42
4.2.3 <i>Materiais para cultivo celular</i>	42
4.3 Coleta e identificação botânica.....	42
4.4 Seleção do método extrativo.....	43
4.4.1 <i>Planejamento experimental 2³ para obtenção dos extratos</i>	43
4.5 Avaliação da atividade fotoprotetora (FPS).....	44
4.5.1 <i>Avaliação de fator de proteção solar (FPS) por método espectrofotométrico</i>	44

4.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	45
4.6.1 Método por sequestro de radicais livres (DPPH).....	45
4.6.2 Método de auto-oxidação com ácido linoléico.....	46
4.7 Análise quimiométrica.....	46
4.8 Doseamento de fenóis totais.....	47
4.9 Determinação do perfil fitoquímico por análises cromatográficas.....	48
4.9.1 Perfil fitoquímico dos extratos de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia em camada delgada (CCD).....	48
4.9.2 Identificação de flavonoides.....	48
4.9.3 Identificação de fenóis.....	48
4.9.4 Perfil fitoquímico dos extratos de <i>B. dracunculifolia</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
4.10 Avaliação <i>in silico</i>	51
4.10.1 Análise conformacional e otimização geométrica.....	51
4.10.2 Estudos de absorção ultravioleta teórico.....	52
4.10.3 Avaliação de parâmetros antioxidante <i>in silico</i>	52
4.11 Ensaio de potencial fotoprotetor e antimutagênico com <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	52
4.11.1 Cepa de <i>S. cerevisiae</i> , meio de cultivo e condições de crescimento.....	52
4.11.2 Protocolo de irradiação: luz solar simulada (LSS).....	53
4.11.3 Preparo inicial das culturas celulares para tratamento.....	54
4.11.4 Avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade do extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> na ausência de irradiação com LSS...	55

4.11.5 Avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico do extrato etanólico de <i>B. dracunculifolia</i> na presença de irradiação com LSS.....	55
4.12 Análises estatísticas.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	57
5.1 Planejamento experimental 2 ³ para obtenção dos extratos: otimização do método extrativo.....	57
5.2 Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i>	59
5.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	62
5.3.1 Auto-oxidação com ácido linoleico.....	63
5.4 Análise por componente principal (PCA).....	64
5.5 Doseamento de fenóis totais em <i>Baccharis dracunculifolia</i>	67
5.6 Análise dos extratos de <i>B. dracunculifolia</i> por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	69
5.7 Avaliação do extrato por CLAE-DAD e ESI-QTOF-LC-MS.....	70
5.8 Atividade fotoprotetora <i>in silico</i>	81
5.8.1 Avaliação da absorção ultravioleta de substâncias de <i>B. dracunculifolia in silico</i>	86
5.9 Avaliação da atividade antioxidante <i>in silico</i>	92
5.9.1 Cálculo dos parâmetros antioxidantes <i>in silico</i>	92
5.10 Avaliação do potencial fotoprotetor e mutagênico do extrato de <i>B. dracunculifolia</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95

5.10.1 <i>Avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade do extrato etanólico de B. dracunculifolia na ausência de irradiação com LSS</i>	96
5.10.2 <i>Avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico do extrato etanólico de B. dracunculifolia na presença de irradiação com LSS</i>	96
6. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXOS.....	114

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, o câncer de pele representa 33% de todos os diagnósticos de câncer realizados no País. A cada ano, são registrados 185 mil novos casos de câncer de pele, podendo ter como causas os fatores genéticos hereditários ou ainda exposição cumulativa à radiação solar. A forma de prevenção deste tipo de câncer inclui, majoritariamente, a utilização de filtros solares (SBD, 2020).

Os protetores solares se apresentam, em sua maioria, como uma combinação de: filtros inorgânicos, que refletem ou dispersam os fótons ultravioletas; e orgânicos, que por sua vez promovem absorção da radiação, evitando a reação diretamente com células da epiderme. Para ser considerado um fotoprotetor eficaz, este deve apresentar amplo espectro de absorção, segurança, eficácia e concentração de filtros otimizada (HASSAM *et al.*, 2013; KRUTMANN *et al.*, 2020).

Com o objetivo de reduzir a quantidade de filtros orgânicos utilizados em formulações fotoprotetoras devido à possibilidade de estímulo de mediadores irritantes e alergias, tem-se estudado novas opções de filtros ou ingredientes ativos, que possam ser adicionados como alternativas para garantir segurança e eficácia dos fotoprotetores. A exemplo disto, pode-se citar os extratos vegetais e suas biomoléculas que, além de absorver a radiação solar, podem ser fonte de benefícios biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (VELASCO *et al.*, 2008).

A utilização de matéria-prima vegetal como potencial para uso em formulações fotoprotetoras é bem descrita na literatura como, por exemplo, extrato hidroalcoólico de *Sanionia uncinata* 70% v/v (FERNANDES *et al.*, 2015), extrato etanólico de *Nephelium lappaceum*, obtido por maceração (MOTA *et al.*, 2020), extrato hidroalcoólico de *Corylus avellana*, obtido por ultrassom (IVANOVIC *et al.*, 2020) e extrato hidroalcoólico de *Calea fruticosa*, obtido por maceração (SEREGHETI *et al.*, 2020).

Dentre as classes de metabólitos vegetais que demonstram características de interesse para produção de formulações farmacêuticas tópicas, estão os fenólicos. Como exemplo, aqueles com esqueletos carbônicos do tipo C6C1 e C6C3 que se assemelham eletronicamente aos filtros orgânicos, que são conhecidamente

substâncias aromáticas conjugadas com grupos carboxílicos e possuem um grupo doador de elétrons, que pode se apresentar como uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático (VELASCO *et al.*, 2008; MUNHOZ *et al.*, 2013).

As espécies do gênero *Baccharis*, dentre as quais se encontra a *Baccharis dracunculifolia*, compreendem arbustos que são utilizados na medicina popular de países da América Latina na forma de chás para desordens do estômago, fígado e inflamações (BUDEL *et al.*, 2005). Algumas dessas atividades já foram confirmadas e amplamente descritas, como a ação anti-inflamatória e a ação antioxidante (FERRONATO *et al.*, 2006).

Os principais constituintes químicos encontrados no gênero são as substâncias fenólicas, incluindo os flavonoides, sendo observado o acúmulo de flavonas, flavonóis e os arilpropanoides, além de diterpenos e triterpenos. Os flavonoides são substâncias formadas por um núcleo benzopirano ou cromano somados a um anel aromático (VELASCO *et al.*, 2008). Os polifenóis, como os arilpropanoides e os bioflavonoides, são biossintetizados pelas plantas como forma de se proteger da radiação solar e são capazes de absorver radiação UV-A e UV-B, com mais segurança que os filtros orgânicos tradicionais, além de apresentar melhor estabilidade da formulação (KOSTYUK *et al.*, 2018). Quando dispersos em etanol, apresentam dois picos de absorção sendo um em comprimento de onda entre 240-280 nm e o outro em 300-550 nm, sinalizando um potencial para a absorção da radiação ultravioleta (UV), cujo comprimento de onda está compreendido entre 290-400 nm (VIOLANTE *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os flavonoides possuem a capacidade de inibir enzimas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de forma a atuar como agentes quelantes ou no sequestro de radicais livres, reduzindo a geração e a quantidade de EROs, prevenindo a oxidação durante a exposição UV-A. O efeito antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatório de algumas espécies, como a *Camellia sinensis*, foi associado aos polifenóis (SOUZA *et al.*, 2013; CHOWDHURY *et al.*, 2021; KOUHIHABIBIDEHKORDI *et al.*, 2021). Além da potencial ação antioxidante, os flavonoides, como a rutina, apresentam benefícios de interesse tópico por não tender a apresentar absorção cutânea. Portanto, a atividade biológica

seria exercida nas camadas superficiais da pele, ação desejada para os filtros solares (VELASCO *et al.*, 2008; CHOQUENET *et al.*, 2008).

Apesar de não haver nenhum dado robusto na literatura sobre o potencial de composições fotoprotetoras ou antioxidantes enriquecidas com o extrato de *B. dracunculifolia*, estudos preliminares evidenciaram sua ação antioxidante, como visto em Guimarães *et al.* (2012), que descreveram a atividade antioxidante do extrato glicólico da espécie, por meio da avaliação pelo método de eliminação do radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), quelação de ferro e diminuição basal dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além da prevenção da peroxidação lipídica da membrana da mitocôndria.

Dessa forma, considerando que a exposição solar excessiva promove o estímulo de vias oxidativas e inflamatórias, aparecimento de eritema e aumento da chance de desenvolvimento de lesões malignas de câncer de pele, o estudo da química do extrato de *B. dracunculifolia* e de sua atividade fotoprotetora e antioxidante mostra-se relevante.

Por conseguinte, espera-se, com este trabalho, contribuir com a pesquisa de plantas medicinais utilizadas topicamente para a prevenção de danos causados pela radiação solar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O câncer de pele

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comumente encontrado em indivíduos de pele clara no mundo, podendo-se apresentar como câncer de pele do tipo melanoma ou câncer de pele do tipo não melanoma, de forma geral. Dados recentes apontam que mais de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos, sendo um problema de saúde pública. No Brasil, o câncer de pele é a segunda causa mais frequente de morte. Estima-se, ainda, que os casos notificados sejam considerados como quantidade de casos mínima devido à subnotificação, subregistro e subdiagnóstico (FONTANILLAS *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2012; NARAYANAN *et al.*, 2010).

O melanoma pode acometer todas as faixas etárias, apresentando metástase em 20% dos pacientes. Apesar da patogênese dessa doença ainda não estar totalmente elucidada, sabe-se que a exposição solar excessiva é um dos principais fatores para o desenvolvimento de câncer de pele. Devido a isso, as medidas preventivas, como a não exposição em horários entre 10 e 16 horas e utilização de fotoprotetores, são adotadas pelos órgãos de saúde. Há recomendação, ainda, sobre observação das características da lesão de forma constante, uma vez que o diagnóstico precoce melhora o prognóstico de ambos os tipos de câncer de pele (SAES DA SILVA *et al.*, 2018; DIEPGEN *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2021).

2.2 Fotoproteção

Segundo o Consenso Brasileiro de Fotoproteção (2014), a população brasileira apresenta um dos maiores índices de exposição solar anual devido à extensa faixa territorial localizada entre a linha do Equador e o Trópico de Capricórnio. Dados epidemiológicos apontam que a incidência tanto do câncer de pele não melanoma quanto o do tipo melanoma crescem no País, fazendo com que a fotoproteção se torne fundamental para prevenção do desenvolvimento de danos agudos e crônicos na população.

A exposição solar inadequada pode causar queimaduras solares, imunossupressão, fotoenvelhecimento, eritema, insolação, desordens pigmentares, fotodermatoses e carcinogênese. As medidas de proteção solar incluem o uso de

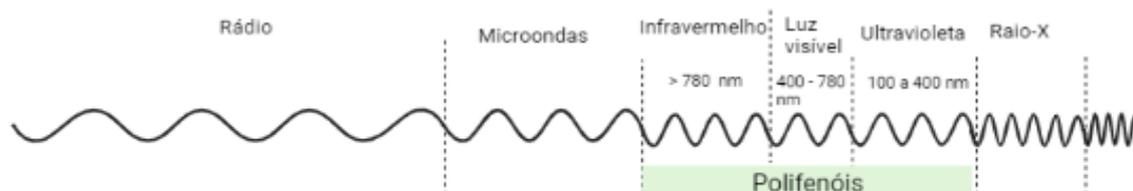
protetores solares tópicos, fotoeducação, fotoproteção oral e proteção mecânica, como o uso de vestimentas e acessórios de proteção (KRUTMANN *et al.*, 2018; SCHALKA *et al.*, 2014).

O uso de formulações fotoprotetoras tópicas com intenção de prevenir queimaduras solares foi primeiramente descrito em 1891, por Friedrich Hammer. Somente em 1928 surgiu o primeiro produto comercial, que possuía uso restrito nos Estados Unidos. Novas substâncias foram estudadas a fim de proteger a pele dos espectros solares, principalmente a radiação UV-A e UV-B, culminando em substâncias que são utilizadas até hoje, como o dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO), componentes dos filtros inorgânicos (SCHALKA *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação dos filtros inorgânicos envolve a formação de uma camada opaca sobre a pele, refletindo ou dissipando a luz. Já os filtros orgânicos atuam absorvendo a radiação e transformando-a numa de menor energia (SEVERINO *et al.*, 2019).

A radiação solar pode ser dividida e classificada de acordo com os comprimentos de onda. Para a finalidade de proteção solar, as radiações com maior importância são: radiação na região do UV, com comprimento de onda de 100 a 400 nm, sendo de 100 a 280 nm a UV-C, 280 a 315 nm UV-B e 315 a 400 nm a radiação UV-A; Luz visível (LV), com comprimento de onda entre 400 e 780 nm e a radiação na região do infravermelho (IV), com comprimento de onda maior que 780 nm (SCHALKA *et al.*, 2014). Pode-se observar o espectro da radiação solar na **Figura 1**.

Figura 1 - Espectro da radiação solar, com demonstrativo da ação de polifenóis nas faixas correspondentes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Uma vez que a radiação UV-C tem o menor comprimento de onda, ela não atinge a superfície terrestre, sendo completamente absorvida pela camada atmosférica da terra. Já a radiação UV-A representa mais de 90% da radiação solar que atinge a terra e penetra profundamente na epiderme e na derme da pele por apresentar comprimento de onda mais longo, podendo causar fotoenvelhecimento prematuro, estímulo da produção de radicais livres, e necrose das células endoteliais. A radiação UV-B tem um comprimento de onda médio, porém, uma capacidade 1000 vezes maior de causar queimaduras solares do que a faixa UV-A. Atua principalmente na camada epidérmica de células basais da pele, interrompendo o ciclo celular, acarretando fotoenvelhecimento e aumento na produção de danos oxidativos. Além disso, esta faixa de radiação UV é considerada a responsável por induzir lesões malignas de câncer de pele, tanto em populações jovens quando idosas, como o carcinoma espinocelular e o carcinoma basocelular (PAULETO *et al.*, 2017; CIAŻYŃSKA *et al.*, 2021; BROWN *et al.*, 2021).

A radiação no infravermelho (IV) representa 30% da energia solar. Os danos causados por essa radiação comprometem a homeostase da matriz extracelular, com degradação dos tecidos conectivos e aumento da temperatura da pele. Sabe-se que mais de 500 genes dos fibroblastos dérmicos são responsivos à radiação no IV, apresentando como danos a degradação de metaloproteinases, apoptose e estresse oxidativo. Logo, a proteção efetiva contra esta radiação se dá com o uso de antioxidantes, como os polifenóis, até mesmo antes da exposição a IV-A, conforme avaliado em trabalhos na área (KRUTMANN *et al.*, 2018; SCHROEDER *et al.*, 2008; LIM *et al.*, 2017). A luz visível (LV) possui efeitos biológicos mais graves que as produzidas pela radiação UV-A, como a formação de desordens pigmentares e eritema, além da produção de EROs. Nesse caso, os filtros orgânicos não possuem capacidade de ação. É descrito que os filtros opacos opticamente conseguem realizar o bloqueio da LV ou deve-se priorizar a utilização de antioxidantes para diminuição do estresse oxidativo excessivamente gerado (LIM *et al.*, 2017).

De acordo com a agência reguladora norte americana US FDA (1978), o Fator de Proteção Solar (FPS) é definido como a razão entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da pele com uso do fotoprotetor testado, aplicada na quantidade de 2

mg/cm², e a Dose Eritematosa Mínima da pele não protegida por fotoprotetor, conforme fórmula a seguir:

$$FPS = \frac{DEM \text{ (pele protegida)}}{DEM \text{ (pele não protegida)}}$$

Segundo Schalka e Reis (2011), o FPS é o método mais utilizado para avaliação da eficácia fotoprotetora dos filtros solares. De acordo com a RDC nº 237/2002 (BRASIL, 2002), a determinação do FPS no Brasil é realizada por meio de metodologia *in vivo*, com voluntários sadios e diferentes tipos de pele. Já para o método *in vitro*, a metodologia desenvolvida por Mansur *et al.* (1986) é considerada rápida e eficaz apresentando correlação com a metodologia *in vivo* (RIBEIRO, 2004; MANSUR *et al.*, 1986) como é percebido no estudo de DUTRA *et al.* (2004) que avaliou o FPS de protetores solares comerciais e verificou que estes apresentavam FPS dentro do valor declarado pelos fabricantes.

De acordo com a RDC nº 30/2012 (BRASIL, 2012), o valor mínimo do FPS é de 6 para fototipos mais altos, que possuem pouca sensibilidade a queimaduras solares, sendo a proteção contra os raios UV-A no mínimo 1/3 do valor do FPS declarado. Deve ser comprovada a ação contra os raios UV-B (método de avaliação do FPS) e também UV-A (método de fotoproteção UVA, FP-UVA, ou de pigmentação persistente, PPD). Para a rotulagem, deverá constar, de forma obrigatória, a informação sobre a necessidade de reaplicação do produto.

Segundo Sondenheimer e Krutmann (2018), as formulações fotoprotetoras antigas tinham como principal objetivo a proteção contra a radiação UV, porém os últimos estudos mostram também a relevância da radiação no infravermelho (IV), e principalmente a IV-A, que é capaz de gerar danos que são similares à radiação no UV. O mesmo acontece com o espectro visível, encontrado tanto na luz solar quanto em aparelhos celulares e computadores, que ganhou alta relevância nesta área, sugerindo a adição de pigmentos inorgânicos e opacos nas formulações a fim de refletir a luz visível de forma eficaz.

A composição dos filtros solares pode apresentar alguns inconvenientes, como afetar a conversão da vitamina D endógena caso o protetor tenha FPS muito alto, apresentar potencial alergênico, como no caso dos filtros orgânicos: cinamatos,

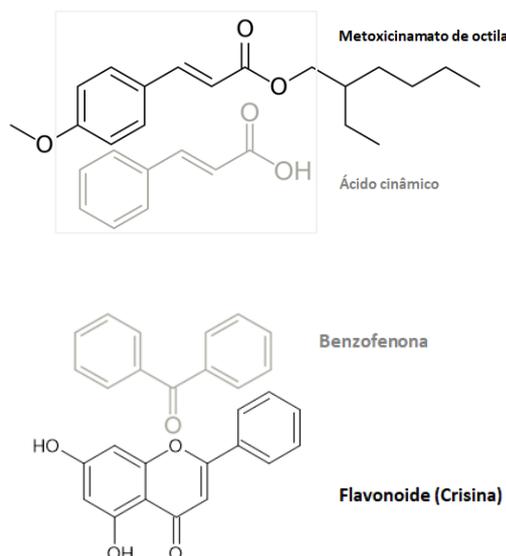
derivados do PABA, benzofenonas e octocrileno. Mesmo os filtros inorgânicos, quando em partículas muito pequenas podem ser absorvidos pela pele, apresentando impactos endócrinos, ou ainda desconforto sensorial causado pelo resíduo esbranquiçado. Além disso, as formulações destinadas à proteção solar somente podem ser aplicadas em peles íntegras (DONGLIKAR *et al.*, 2016).

2.3 Potencial dos produtos naturais utilizados com finalidade fotoprotetora

Segundo Cefali *et al.* (2016), fitocosméticos são óleos ou extratos de plantas com propriedades cosméticas. Nos últimos anos, substâncias naturais têm sido estudadas com o objetivo de se formular “protetores solares verdes”. A composição química e a capacidade de absorção no espectro UV são os principais fatores que determinam a eficácia de um fotoprotetor natural. A capacidade de absorção de energia dos grupos cromóforos é proporcional ao intervalo de absorção, comprimento de absorção máxima e concentração dos constituintes (CEFALI *et al.*, 2016; VIOLANTE *et al.*, 2009).

Os produtos naturais podem atuar em múltiplas vias biológicas quando comparados às substâncias sintetizadas. Os metabólitos secundários apresentam absorção na região ultravioleta (λ 200 a 400 nm) devido às duplas ligações conjugadas em cadeias lineares ou cíclicas e a ressonância proveniente dos anéis aromáticos, em que os elétrons sofrem excitação possibilitando a absorção dos raios ultravioletas. Os arilpropanoides são produzidos nas plantas imediatamente após a exposição UV, podendo absorver tanto a radiação UV-A quanto a UV-B devido à cadeia com 5 ou 6 carbonos com múltiplos grupos hidroxila (OH), semelhantes aos filtros químicos, porém com a vantagem não causar reações fotoquímicas (KOSTYUK *et al.*, 2018; DONGLIKAR *et al.*, 2016). As semelhanças estruturais entre os fenólicos e filtros orgânicos podem ser vistas na **Figura 2**.

Figura 2 - Semelhança estrutural entre filtros orgânicos tradicionalmente utilizados em cosméticos e os fenólicos. Os arilpropanoides estão representados pelo ácido cinâmico e os flavonoides estão representados pela crisina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A glicosilação presente em alguns fenólicos não está suscetível a destruição causada pela radiação UV-A, portanto mostra-se também como uma vantagem para a utilização de produtos naturais em fotoprotetores. Somado a isso, essas substâncias atuam contra os danos que levam a formação do ânion radical superóxido, peróxido e oxigênio singlete (KOSTYUK *et al.*, 2018; DONGLIKAR *et al.*, 2016), mediante reações importantes a exposição UV. Por exemplo, a crisina inibe a indução de EROs mediada pela radiação UV (STOMPOR-GORAÇY *et al.*, 2021) e modula positivamente a proteína Bax, estimulando a apoptose em células de melanoma (CHIU *et al.*, 2020). A naringenina demonstrou ação antioxidante e anti-UV em sistemas de nanocarreadores lipídicos (BADEA *et al.*, 2017).

Os flavonoides podem ser empregados para aumentar o FPS de forma sinérgica aos filtros tradicionais, como visto na associação da rutina e quercetina com dióxido de titânio (TiO₂), que apresentou FPS de aproximadamente 30. Dados mostram que a utilização da rutina 0,1% foi capaz de aumentar o FPS de 7,34 para 9,97 quando utilizado em conjunto com *p*-metoxicinamato e benzofenona-3 nas suas

concentrações mínimas. Porém, ao aumentar para a máxima concentração de filtros orgânicos, o incremento da rutina 0,1% não apresentou diferenças estatisticamente significativas, exceto em comparação com a formulação base (VELASCO *et al.*, 2008; Cefali *et al.*, 2016). Cefali *et al.* (2019), diferentemente dos outros autores, testaram um *blend* de flavonoides para a obtenção de um fitocosmético com ação fotoprotetora. A associação de *Ginkgo biloba*, *Dimorphandra mollis*, *Ruta graveolens*, e *Vitis vinifera* na proporção 1:1:1:1 resultou numa emulsão com ação potente antioxidante, porém mostrou-se com baixo FPS ($7,72 \pm 0,4$), podendo ser utilizada com a finalidade de ser associada a outros filtros. Um estudo de Severino *et al.* (2019) concluiu que a adição do extrato glicólico de romã comercial, rico em fenólicos, foi capaz de aumentar em 15% o FPS da formulação. Os extratos de café verde e de própolis verde também demonstraram ser potencializadores FPS em formulações, atuando como coadjuvantes num aumento da fotoproteção (ALVAREZ *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em 2019, Almeida *et al.* concluíram que a adição de própolis vermelha liofilizada a uma formulação foi capaz de aumentar a ação antioxidante e fotoprotetora, com boa fotoestabilidade até o máximo de tempo medido: 80 minutos.

Um éster do ácido ferúlico foi testado por Choquenot *et al.* (2008) quanto a sua atividade fotoprotetora na concentração de 10% n uma formulação cremosa e demonstrou FPS similar ao filtro orgânico benzimidazilato, permitido na União Européia. O grupo de Leite Filho (2016) propôs a síntese de um derivado da vanilina, aldeído fenólico encontrado no extrato de baunilha, tendo como base a molécula do metoxicinamato de octila, filtro orgânico utilizado em aproximadamente 90% dos filtros no mundo, e obteve dois derivados químicos com ação fotoprotetora maior que a benzofenona, quando na mesma concentração (5%).

Boo *et al.* (2019) realizaram um trabalho de revisão sobre o ácido *p*-cumárico, em que mostram a ação anti melanogênica, devido à sua semelhança com a L-tirosina, importante na via biossintética da melanina, podendo ser utilizada com a finalidade de tratamento para hiperpigmentação provocada pela radiação UV. Além disso, a capacidade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos diminui o estresse oxidativo basal de forma mais eficaz que a vitamina E, antioxidante tradicionalmente utilizado em diversas formulações cosméticas.

Pérez-Sanchez *et al.* (2016) realizaram testes com o ácido rosmarínico, composto majoritário do extrato de *Melissa officinalis*, em queratinócitos humanos após radiação UV-B e os resultados obtidos mostraram que houve diminuição significativa da produção de radicais livres e do dano induzido pela radiação UV ao DNA e aumento da viabilidade celular, concluiu-se que o extrato poderia ser utilizado tanto de forma tópica quanto pela via oral. Ferrari *et al.* (2007) realizaram teste de FPS *in vitro* e *in vivo* do óleo de andiroba e apesar da utilização popular, constatou que não houve incremento no FPS da formulação, fato que pode ser explicado pela ausência de substâncias provenientes do metabolismo da planta com reconhecida ação fotoprotetora.

Além das ações descritas anteriormente, algumas plantas apresentam também propriedades hidratantes e refrescantes (polissacarídeos), antimicrobiana (óleos essenciais), anti-inflamatória (polifenóis), cicatrizante (taninos), anti-idade e rejuvenescedora (antocianidinas, carotenos e vitaminas), tendo assim uma possibilidade ampla de utilização (DONGLIKAR *et al.*, 2016; PAULETO *et al.*, 2017; NGOC *et al.*, 2019; SEVERINO *et al.*, 2019; CEFALI *et al.*, 2016).

O aumento da capacidade antioxidante das células da pele por meio do uso exógeno de antioxidantes é uma das estratégias para prevenir os danos induzidos pela radiação UV (PETRUK *et al.*, 2018). A adição de antioxidantes às formulações fotoprotetoras com FPS 15 e 50 diminui a formação de EROs em 2,5 vezes (LIM *et al.*, 2017), sendo assim uma alternativa para prevenir os danos gerados a nível tópico.

O extrato do caule de uva (*Vitis vinífera*) foi aplicado em camundongos antes do tratamento com radiação UV-B e mostrou-se capaz de prevenir eritema, aumento da espessura da pele, pigmentação, degradação do colágeno e a expressão dos genes COX-2, Nrf-2 e HO-1 (CHE *et al.*, 2017). A ação do resveratrol, proveniente também de *Vitis vinífera*, foi estudada em queratinócitos e mostrou modular citocinas (IL-6, IL-8 e TNF- α) além de estimular fatores de reparação e citoproteção celulares (DAVINELLI *et al.*, 2018).

De Souza *et al.* (2013) realizaram testes de determinação de proteção solar *in vitro*, ação antioxidante através do método DPPH e avaliação microbiológica com 10% de extrato seco do fruto de acerola (*Malpighia glabra*). Apesar de apresentar absorção na região UV-B, o FPS obtido não estava dentro do recomendado para

utilização de forma isolada, mas foi possível associar o extrato obtido com filtros químicos, tendo ação sinérgica e estável contra os danos da radiação UV, conferindo assim ação antioxidante ao produto.

No estudo de Violante *et al.* (2009) foram avaliados os extratos feitos por maceração em etanol 90°GL (5:1 em H₂O), pelo período de 15 dias, espécies de plantas das famílias: Apocynaceae (entrecasca de *Hancornia speciosa*; folhas de *Himatanthus obovatus*; planta inteira *Macrosiphonia petraea* e planta inteira *Macrosiphonia velame*), Lythraceae (entrecasca de *Lafoensia pacari*), Oxalidaceae (planta inteira de *Oxalis hirsutissima*), porém nenhum extrato obteve FPS > 2, apesar da absorbância máxima acima de 300 nm.

Em seu artigo de revisão, Reuter *et al.* (2010) reuniram informações a respeito de plantas ricas em polifenóis que podem proteger a pele de queimaduras solares e fotoenvelhecimento, de forma tópica ou oral. Dentre as espécies citadas estão: *Hammamelis virginiana*, com ação anti-inflamatória e ação na diminuição do eritema causado pela radiação UV; *Camellia sinensis*, capaz de reduzir citocinas inflamatórias e os danos oxidativos causados pela radiação UV; *Salvia officinalis*, capaz de reduzir o eritema comparável a hidrocortisona e *Theobroma cacao*, que também apresentou redução do eritema causado pela radiação UV-B.

Katiyar e Elmets (2001) realizaram testes com 3-galato de epigallocatequina, substância presente no chá verde com atividade antioxidante e mostrou prevenir a imunossupressão induzida pela radiação UV-B e o estresse oxidativo. Além disso, o tratamento com polifenóis do chá verde antes da exposição de 72 mJ/cm² indicou diminuição da atividade da mieloperoxidase, o número de leucócitos inflamatórios infiltrados e a imunossupressão após exposição UV.

O extrato de folhas da samambaia *Polypodium leucotomos* é o suplemento com ação fotoprotetora mais estudado. Estudos *in vitro* mostraram que o extrato protege os queratinócitos dos efeitos deletérios da radiação UV, diminuindo a produção do óxido nítrico e a ativação do fator NFκB. O extrato é capaz, ainda, de reduzir a formação de dímeros de pirimidina, aumentar a apoptose de células tumorais e reparar danos no DNA (RABINOVICH *et al.*, 2018).

Orlanda e Vale (2014) avaliaram a atividade fotoprotetora do extrato de *Euphorbia tirucalli*, espécie conhecida popularmente como Avelós, rica em compostos

fenólicos como flavonoides e taninos. Os dados da ação antioxidante, medida por meio do método DPPH mostram-se superiores aos dados da quercetina (16,98 e 0,64 µg/mL respectivamente) e FPS 19 na maior concentração testada, além de absorção na faixa UV-B.

Couteau *et al.* (2008) verificaram o FPS do extrato etanólico de própolis a 20%, em comparação com o FPS obtido com homosalato. O extrato de própolis obteve maior FPS, sugerindo que possui potencial fotoprotetor, porém, os autores não revelam qual o tipo de própolis foi utilizado. O potencial fotoprotetor de tinturas de própolis contendo 1% de flavonoides foi avaliado pelo grupo de MORI *et al.* (1997), encontrando-se FPS de até oito. Somado a sua ação fotoprotetora tópica, foi demonstrado que o própolis possui ação quimiopreventiva e pode inibir a proliferação tumoral.

Apesar de, em alguns casos, não oferecer um alto valor de FPS, os efeitos biológicos dos fenólicos devem ser considerados devido à ação diretamente exercida nos danos causados pela exposição UV (BELO *et al.*, 2011). Para isso é necessário, uma padronização ou guia quando se trata dos testes de eficácia *in vivo* e em humanos do potencial fotoprotetor de extratos botânicos (RABINOVICH *et al.*, 2018).

2.4 A família Asteraceae e a espécie *B. dracunculifolia*

Alocada no grupo das Angiospermas, a família Asteraceae é a detentora do maior número de espécies descritas. Estas são encontradas em 98% dos casos na forma de arbustos, subarbustos ou ervas perenes em quase toda extensão do globo, exceto Antártica, devido ao seu alto poder de adaptação ambiental. Na América do Sul, chega a representar 20% da flora de regiões andinas e da patagônia (CANCELLI *et al.*, 2007; CECCELLI *et al.*, 2010; VERDI *et al.*, 2005).

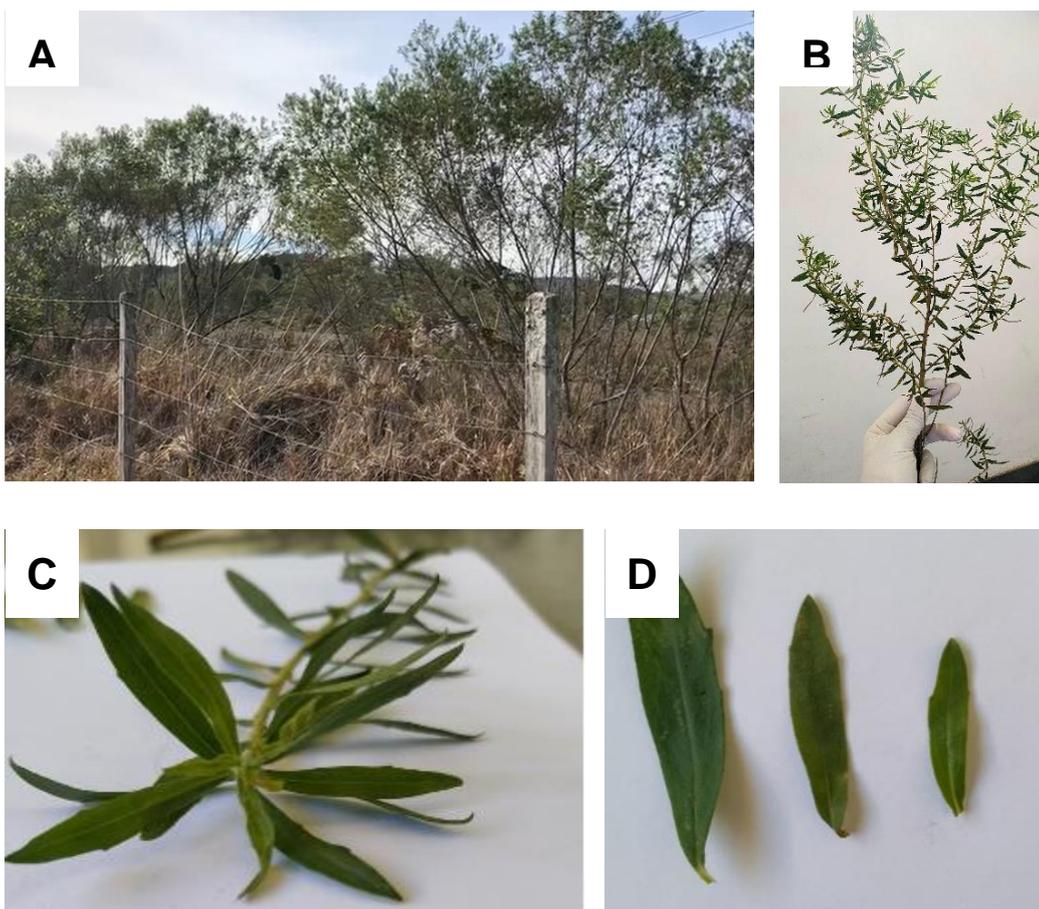
No Brasil, compreende 180 gêneros e 1.900 espécies, que são encontradas, majoritariamente, nas regiões Sudeste e Sul, em campos gerais ou em áreas de cerrado. Cerca de 25% das espécies estudadas do gênero *Baccharis* apresentam estudos de atividade biológica, o que reforça o seu alto valor para estudo e utilização na medicina (ROQUE *et al.*, 2008; VERDI *et al.*, 2005).

O sucesso do seu alto poder de adaptação pode ser explicado pelo seu sistema químico de defesa rico em compostos do metabolismo secundário, desde

poliacetilenos até lactonas sesquiterpênicas (ROQUE *et al.*, 2008). Muitos trabalhos científicos foram realizados com espécies da família Asteracea para isolamento de metabólitos ou desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, cosméticos e fragrâncias (VERDI *et al.*, 2005; ROQUE *et al.*, 2008).

Baccharis dracunculifolia é uma espécie nativa do Brasil, encontrada em áreas de cerrado. É conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha (SFORCIN *et al.*, 2009). Seu aspecto em ambiente natural pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - *Baccharis dracunculifolia*. A. Arbusto em ambiente natural em Caxias do Sul - RS (29°02'27.9"S 50°59'39.1"W), B. Galho de coleta realizada na Estação Ecológica da UFMG-Belo Horizonte, C e D. Detalhes das folhas.

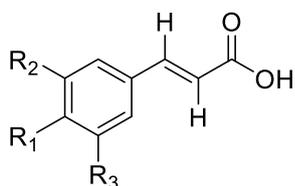


Fontes: Arquivo pessoal (B, C e D) e (A) cedida por Marina Scopel.

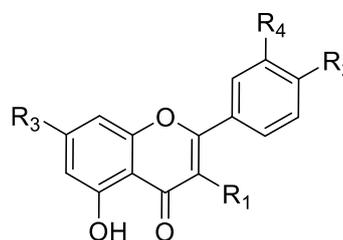
A espécie apresenta-se dióica, com inflorescências masculinas e femininas. O dimorfismo sexual é observado pela cor das flores. Enquanto as plantas masculinas apresentam flores amarelo-claro, as plantas femininas apresentam flores brancas (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2004; RIGOTTI *et al.*, 2016).

Morfológicamente, as folhas de *B. dracunculifolia* são caracterizadas pela presença de tricomas glandulares, que podem conter flavonoides e derivados do tipo arilpropanoides, responsáveis pela função protetora contra parasitas e agentes predadores (SOUSA *et al.*, 2007). Pegorini *et al.* (2008) afirmam que os tricomas também possuem como função aumentar a reflectância de radiação luminosa e atuar na manutenção da temperatura foliar. O complexo estomático do tipo anomocítico e a presença de marcantes estriações na cutícula também são características empregadas na avaliação da qualidade da amostra (PEGORINI *et al.*, 2008). Em relação às características da folha (**Figura 1-D**), apresentam epiderme uniestratificada com cutícula estriada, mesofilo isolateral e canais secretores associados aos feixes colaterais (BUDEL *et al.*, 2004; BUDEL *et al.*, 2005).

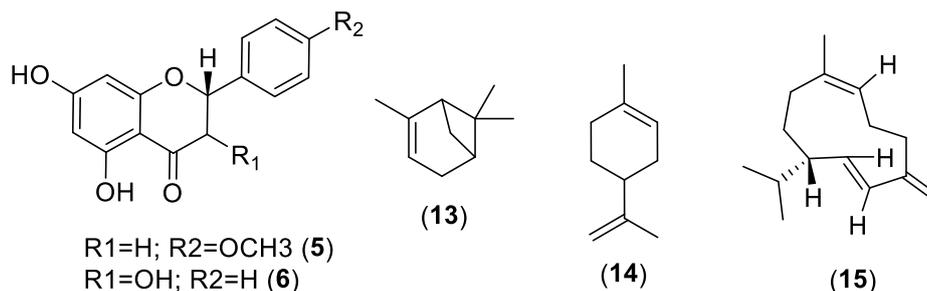
Os compostos fenólicos identificados em *B. dracunculifolia* podem apresentar variação da concentração de acordo com a sazonalidade e se dividem principalmente em arilpropanoides: ácido caféico (**1**), ácido p-cumárico (**2**), ácido ferúlico (**3**), artepilina C (**4**); flavonoides: isosacuretina (**5**), pinobancsina (**6**), canferol (**7**), apigenina (**8**), canferídeo (**9**), quercetina (**10**), rutina (**11**), crisina (**12**) e terpenos: α -pineno (**13**), limoneno (**14**) e germacreno D (**15**) (FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2013; BONIN *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2004; MARÓSTICA JUNIOR *et al.*, 2008).



- R1=R2=OH; R3=H (**1**)
 R1=OH; R2=R3=H (**2**)
 R1=OH; R2=OCH3; R3=H (**3**)
 R1=OH; R2=R3=CH₂CH(CH₃)₂ (**4**)



- R1=R2=R3=OH; R4=H (**7**)
 R1=R4=H; R2=R3=OH (**8**)
 R1=R3=OH; R2=OCH₃; R4=H (**9**)
 R1=R2=R3=R4=OH (**10**)
 R1=rutosídeo; R2=R3=R4=OH (**11**)
 R1=R2=R3=H; R4=OH (**12**)



De acordo com a literatura, são relatadas algumas propriedades para a espécie, tais como ação antibacteriana, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória e para o tratamento para distúrbios hepáticos (PAROUL *et al.*, 2016; BACHIEGA *et al.*, 2013; FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2017). O grupo de Bachiega *et al.* (2013), mostrou que o extrato etanólico 90% de *B. dracunculifolia* é capaz de estimular a produção de IL-1 β e inibir IL-10 e IL-6, como mecanismo de ação anti-inflamatória. Além disso, o extrato de *B. dracunculifolia* está associado a ação analgésica e antiedematogênica em modelo animal, com inibição da atividade da ciclooxigenase-2 e o fator NF κ B. Sua propriedade anti-inflamatória pode ser evidenciada com a utilização de lipossomas biocompatíveis (DE FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Baccharis dracunculifolia é a principal fonte botânica do própolis verde e autores correlacionam as substâncias encontradas no própolis verde com aquelas encontradas nas folhas desta espécie (PARK *et al.*, 2004; MARÓSTICA JUNIOR *et al.*, 2008). Pode-se justificar essa semelhança de composição química devido à visita das abelhas que ocorre na fase de crescimento da espécie, época em que há maior disponibilidade de metabólitos secundários, e não no período de floração. Assim sendo, existe forte correlação entre os compostos químicos da fonte botânica do própolis e da resina de própolis (SFORCIN *et al.*, 2009).

Alencar *et al.* (2005), mostram que o espectro ultravioleta visível de absorção do extrato etanólico de própolis e do extrato metanólico *B. dracunculifolia* são muito próximos, com pico de absorção máxima próximo a 300 nm, tendo assim um potencial efeito fotoprotetor conferido pela ação dos extratos. O extrato etanólico não possui atividade mutagênica nem apresenta genotoxicidade, sendo adequado para uso em formulações (ROBERTO *et al.*, 2016).

Os extratos ricos em frações polares e apolares de *B. dracunculifolia* apresentaram atividade antimicrobiana, podendo ser utilizado juntamente com antimicrobianos clássicos e como enxaguatório bucal para prevenção da cárie (CANTON *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2009). Já o extrato hexânico mostrou ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* resistentes e sensíveis à meticilina, essa ação estaria relacionada com a ação da artepilina C (VEIGA *et al.*, 2016).

O extrato hidroetanólico 90% (v/v) mostrou ativar macrófagos *in vitro*, com liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) enquanto que o extrato hidroetanólico 70% (v/v) mostrou-se capaz de reduzir úlceras gástricas e promover cicatrização do tecido, com participação biológica relacionada à ação do ácido *p*-cumárico (MISSIMA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2019). O extrato etanólico da espécie estudada foi capaz de minimizar o processo inflamatório de colite em modelo animal (LIMA *et al.*, 2019).

A redução dos níveis glicêmicos foi reportada com a administração do extrato metanólico de *B. dracunculifolia* em modelo animal (PATEL *et al.*, 2018). O extrato aquoso mostrou-se mutagênico e genotóxico apenas em doses altas (2 g/kg em modelo animal) (RODRIGUES *et al.*, 2009) sendo adequado para uso. Além disso, mostrou possuir 100 vezes mais ação antioxidante que o óleo essencial. A ação bactericida não foi relatada no estudo realizado (PAROUL *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2019).

Além dos extratos obtidos com as folhas, o óleo essencial da espécie estudada também apresenta atividade antioxidante. Em estudo de Marchesan *et al.* (2008), o óleo essencial mostrou-se capaz de neutralizar em 77,86% a ação da hialuronidase celular, enzima que degrada o ácido hialurônico, componente da matriz extracelular importante para a manutenção da hidratação da pele, que pode aparecer em baixos níveis em condições patológicas.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi aplicado topicamente em modelo de inflamação de pele aguda e crônica de camundongos e o resultado do estudo mostrou que além da redução da inflamação, os compostos terpênicos da espécie são capazes de reduzir o edema, a hiperproliferação de queratinócitos e o influxo de leucócitos para a região inflamada. O estudo sugeriu uma ação anti-inflamatória também para o óleo essencial sem apresentação de efeitos adversos locais ou sistêmicos. Ainda, o óleo essencial mostrou-se promissor antimicrobiano frente a

cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e apresentou efeito sinérgico com antibióticos utilizados tradicionalmente na clínica (BRANDENBURG *et al.*, 2020; SALAZAR *et al.*, 2018; FERRONATO *et al.*, 2006; FERRONATO *et al.*, 2007).

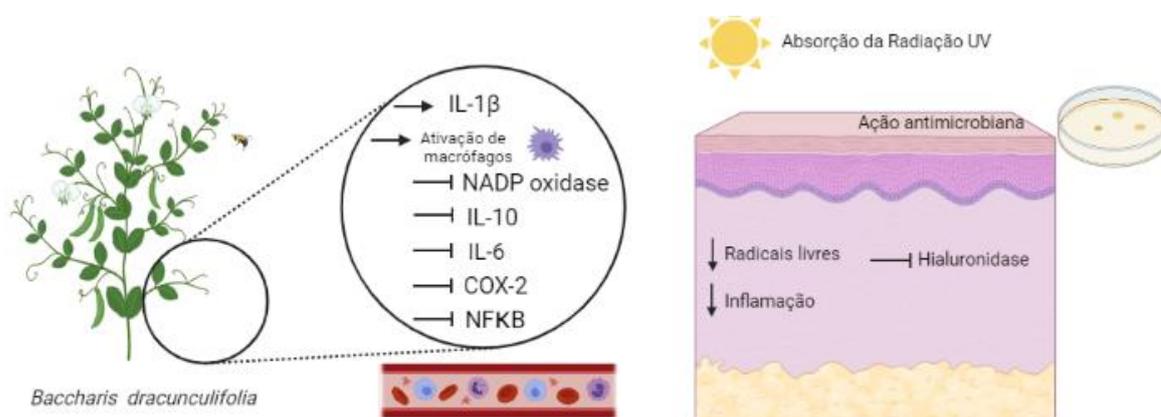
Um resumo das ações biológicas descritas para a espécie em estudo encontra-se na **Tabela 1** e na **Figura 4**.

Tabela 1 - Atividades biológicas descritas para a espécie *B. dracunculifolia*.

TIPO DE EXTRATO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
Extrato metanólico	Atividade redutora da glicemia em modelo animal de diabetes tipo I	PATEL <i>et al.</i> , 2018
Extrato aquoso	Ação genotóxica e mutagênica <i>in vivo</i>	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2009
Extrato hidroalcoólico	Ação moduladora do metabolismo oxidativo de neutrófilos	FIGUEIREDO-RINHEL <i>et al.</i> , 2017
Extrato hexânico	Ação antioxidante e antimicrobiana (contra <i>Staphylococcus aureus</i>) <i>in vitro</i>	VEIGA <i>et al.</i> , 2016
Extrato etanólico 90% em temperatura ambiente	Ação imunomodulatória. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio <i>in vivo</i> .	MISSIMA <i>et al.</i> , 2007
Extrato etanólico 90% a temperatura ambiente	Ação anti-inflamatória <i>in vitro</i>	BACHIEGA <i>et al.</i> , 2013
Extrato etanólico	Ação anti-inflamatória em modelo animal com colite	LIMA <i>et al.</i> , 2019
Extrato etanólico	Atividade antimicrobiana contra <i>Streptococcus mutans</i>	LEITE <i>et al.</i> , 2009
Extrato etanólico 70%	Atividade anti-inflamatória e antinoceptiva em modelo <i>in vivo</i>	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2010
Extrato etanólico 70%	Ação antimutagênica e antigenotóxica <i>in vitro</i>	ROBERTO <i>et al.</i> , 2016

Extrato etanólico 70%	Ação cicatrizante	COSTA <i>et al.</i> , 2019
Extrato etanólico 70%	Ação moduladora de antibióticos utilizados na clínica	CANTON <i>et al.</i> , 2010
Extrato etanólico 70%	Proteção contra os danos causados no DNA em linhagem celular HTC	ROBERTO <i>et al.</i> , 2016
Extrato etanólico 70%	Atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	BONIN <i>et al.</i> , 2020

Figura 4 - Mecanismos de ação descritos para *B. dracunculifolia*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

2.5 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas de *S. cerevisiae* tem se mostrado promissores biomodelos, *in vitro*, para aplicação em estudos fotobiológicos (PAIVA *et al.*, 2020). Além de ser um microorganismo de fácil manipulação e baixo custo, cujo genoma é completamente sequenciado e conhecido, *S. cerevisiae* é um eucarioto inferior que apresenta genes de reparo de lesões ortólogos aos das células de mamíferos. Essa similaridade possibilita que estudos fotobiológicos sejam conduzidos sob um *background* genético mais aproximado ao humano, aumentando a correlação desse biomodelo. Adicionalmente, as cepas de *S. cerevisiae* suportam protocolos de irradiação com tempos de exposição e taxas de dose UV-A e UV-B equivalentes às ambientais (PAIVA *et al.*, 2020).

De fato, diferentes cepas de *S. cerevisiae* já foram utilizadas como modelo *in vitro* para a avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico de filtros UV e ativos antioxidantes (PINTO *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2014; HOSSY *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019; DINIZ *et al.*, 2019). A cepa AWP001 (*yno1*) de *S. cerevisiae* é deficiente no gene YNO1 que codifica a enzima *Yeast NADPH-oxidase* (Yno1), ortóloga às NADPH-oxidases (NOXs) humanas, responsável, entre outros fatores, pela sinalização geral de reparo e defesa celular contra o estresse oxidativo (RINNERTHALER *et al.*, 2012). Em virtude de seu potencial bioindicador de lesões fotoinduzidas de caráter oxidativo, a cepa AWP001 (*yno1*) se apresenta como um promissor biomodelo para avaliação de ativos fotoprotetores, não somente em termos de eficácia fotoprotetora e segurança foto/antifotomutagênica, mas também para a avaliação de ativos antioxidantes com o mesmo propósito.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, a atividade fotoprotetora e antioxidante de extratos de *B. dracunculifolia* *in vitro* e *in silico*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos das folhas de *B. dracunculifolia*;
- Avaliar o Fator de Proteção Solar (FPS) e o potencial antioxidante *in vitro* de extrato de *B. dracunculifolia*;
- Selecionar o extrato com melhor Fator de Proteção Solar e atividade antioxidante por meio de análise de componente principal (PCA);
- Avaliar quantitativamente o conteúdo de fenólicos totais do extrato selecionado;
- Obter e avaliar o perfil cromatográfico por CLAE e ESI-QTOF-LC-MS do extrato de *B. dracunculifolia* selecionado;
- Avaliar os parâmetros de fotoproteção dos marcadores de *B. dracunculifolia* presentes *in silico*;
- Avaliar o potencial foto/antimutagênico do extrato na cepa AWP001 (*yno1*) de *S. cerevisiae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e instrumentos

- Banho ultrassom com aquecimento Unique, modelo USC 1400.
- Sistema de cromatografia à líquido de alta eficiência CLAE Waters Alliance®2695 (Massachusetts, Estados Unidos), coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm, d.i.), detector ultravioleta por arranjo de diodos Waters® 2998
- Cromatógrafo Shimadzu CBM-20A (Tokyo, Japão), coluna Supelco Ascentis C18 (5 µm, 250 x 4 mm, d.i.), detector ultravioleta Shimadzu SPD-20A acoplado a analisador de massa q-ToF MaXis 3G Bruker Daltonics (Massachusetts, Estados Unidos), com fonte de ionização por electrospray (ESI) em modo negativo de leitura.
- Sistema de osmose reversa RO0410- 127V
- Espectrofotômetro leitor de microplacas TECAN Infinite 200 PRO
- Micropipeta Transferpette, volume ajustável de 10-100 µL
- Micropipeta Kasvi basic, volume ajustável de 100-1000 µL
- Equipamento liofilizador Liotop, modelo L101.
- Geladeira Eletrolux frostfree, modelo DF47
- Balança analítica Metler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica, Shimadzu, modelo CT-5000R
- Espectrofotômetro HITACHI 2900
- Fonte de irradiação solar ORIEL/ NEUROT modelo 91192 (Newport. Corp., USA)
- Lâmpada de Xenônio

4.2 Materiais de consumo

4.2.1 Solventes e reagentes

- Etanol Absoluto PA, Êxodo científica
- Acetato de etila, PA, Êxodo científica
- Diclorometano PA, Dinâmica
- Metanol grau CLAE, Tedia e Merck.
- Metenamina, Êxodo científica
- Água Ultra Pura, sistema MiliQ
- Tolueno PA, Dinâmica
- Ácido fórmico P.A. 88%
- Ácido fosfórico, Êxodo científica

- Acetonitrila Grau CLAE, Dinâmica

4.2.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR)

- Ácido p-cumárico cristalino 98%, Sigma-Aldrich
- Ácido caféico 98%, Sigma-Aldrich
- Ácido trans-cinâmico 99%, Sigma-Aldrich
- Vanilina USP, Racine
- Ácido clorogênico 95%, Aldrich
- Canferol 97%, Sigma-Aldrich
- Rutina 94%, Sigma-Aldrich
- Quercetina 95%, Sigma-Aldrich
- Apigenina 95%, Sigma-Aldrich
- Ácido gálico, Neon

4.2.3 Materiais para cultivo celular

- Meio Yeast Peptone Dextrose
- Extrato de levedura (Bacto™)
- Bacto de peptona (Bacto™)
- Glicose, Merck
- Ágar (Bacto™)
- Meio Yeast nitrogen base dextrose
- Meio Yeast nitrogen base sem aminoácidos (Difeo™)
- Canavanina, Sigma Aldrich
- Cepa *Saccharomyces cerevisiae* AWP001

4.3 Coleta, identificação botânica e perda por dessecação.

A coleta da espécie *B. dracunculifolia* foi realizada em Junho de 2019, na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais, na cidade de Belo Horizonte-MG. A exsicata foi depositada no herbário BHCB, no Centro de Coleções taxonômicas da UFMG, sob o número 198158. As disposições do SisGen para acesso ao material biológico encontram-se sob o número A2E405F. Após a coleta, as folhas foram separadas dos galhos, selecionadas e secas em estufa ventilada ($T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas.

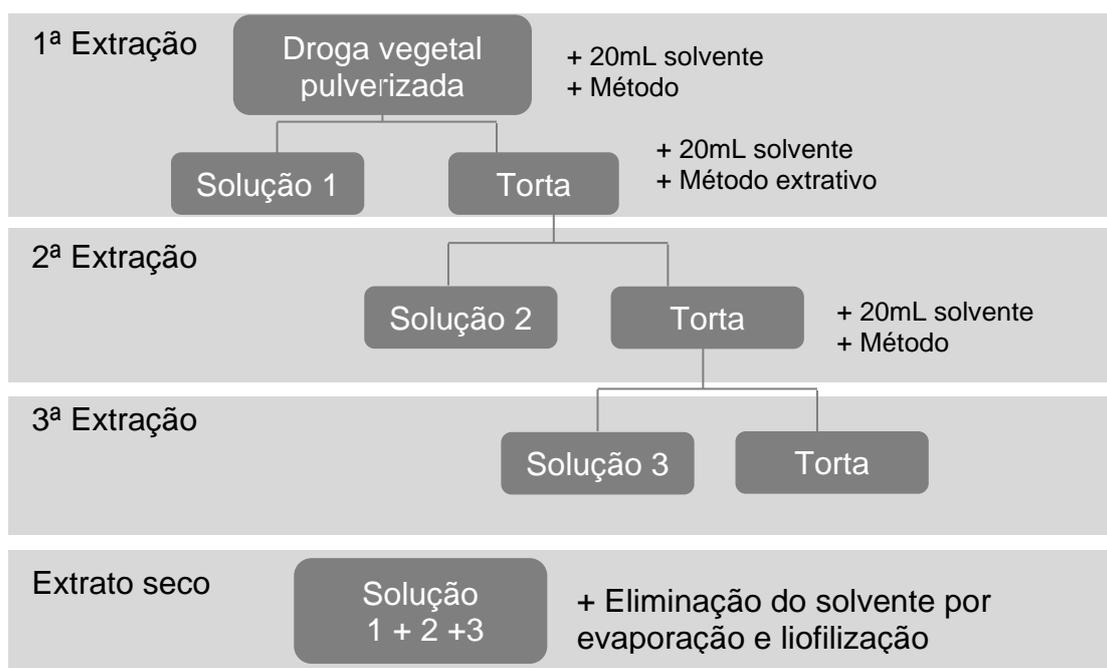
O teor de umidade da amostra foi verificado por meio da avaliação da perda por dessecação pelo método gravimétrico. Foram pesados cerca de 1 g das amostras em pesa-filtro previamente dessecados por 30 minutos. As amostras foram submetidas ao processo de dessecação em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelo período suficiente até que duas pesagens consecutivas não diferissem em mais de 0,50 mg por grama de substância pesada (FARMACOPEIA, 2019a). O experimento foi realizado em triplicata e o desvio padrão relativo foi calculado.

4.4 Seleção do método extrativo

4.4.1 Planejamento experimental 2^3 para obtenção dos extratos

Para otimização do método extrativo utilizou-se o planejamento experimental 2^3 , com 3 fatores e 3 níveis. As condições experimentais foram: (1) Temperatura de extração: 60 °C, 70 °C e 80 °C, (2) Solventes: etanol absoluto e água, nas proporções de 50:50, 75:25 (v/v), e 100% etanol, e (3) Métodos de extração: refluxo e banho ultrassônico (sonicação). Para obtenção dos extratos, foram utilizados 1 g do material vegetal e 20 mL dos solventes, em três repetições de extração (**Esquema 1**). O procedimento foi realizado com ponto central, demonstrado na **Tabela 2**. As análises quimiométricas foram realizadas com utilização do *software* Design Expert 12.

Esquema 1 - Procedimento de extração da droga vegetal



O solvente dos extratos resultantes foi eliminado em capela de exaustão a temperatura ambiente, ou com a utilização de evaporador rotatório, protegidos da luz e, quando necessário, foram liofilizados. Os extratos obtidos foram mantidos em dessecador até a completa secagem do solvente e, posteriormente, foram armazenados em freezer. Os extratos secos foram submetidos aos ensaios de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), avaliação da atividade fotoprotetora pelo método de FPS por Mansur *et al.* (1986), avaliação de atividade antioxidante pelo método DPPH (PAROUL *et al.*, 2016), quantificação de fenólicos totais (HENRIQUES *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Níveis estudados no planejamento experimental 2³ para a seleção de condições do método extrativo para *Baccharis dracunculifolia*, com realização de 2 replicatas.

Amostras	Método	Temperatura	Solvente (EtOH: H ₂ O)
A, B e (ponto central)	Refluxo	70 °C	75%
C	Refluxo	60 °C	50%
D	Refluxo	80 °C	50%
F	Refluxo	80 °C	Etanol puro
G	Refluxo	60 °C	Etanol puro
H	Ultrassom	80 °C	50%
I	Ultrassom	60 °C	Etanol puro
J, K e N (ponto central)	Ultrassom	70 °C	75%
L	Ultrassom	80 °C	Etanol puro
M	Ultrassom	60 °C	50%

4.5 Avaliação da atividade fotoprotetora (FPS)

4.5.1 Avaliação de fator de proteção solar (FPS) por método espectrofotométrico

A avaliação da atividade fotoprotetora *in vitro* foi realizada por meio do método espectrofotométrico de Mansur (MANSUR, 1986), em que a absorvância das

amostras foi medida no intervalo de comprimento de onda de 290 a 320 nm, de 5 em 5 nm. As amostras foram suspensas em etanol 80% (v/v) e foram mensuradas em triplicata na concentração de 130 µg/mL. O FPS foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

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

Sendo:

FC = fator de correção (=10), determinado de acordo com a metodologia de MANSUR; **EE(λ)** = Efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ); **I(λ)** = Intensidade do sol no comprimento de onda (λ); **Abs(λ)** = Leitura espectrofométrica da absorvância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ).

4.6 Avaliação da atividade antioxidante

4.6.1 Método por sequestro de radicais livres (DPPH)

A solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi preparada na concentração de 0,12 mg/mL em etanol puro. As soluções dos extratos de *B. dracunculifolia* foram preparadas nas concentrações de 10, 40, 60, 80, 100, 120 e 160 µg/mL utilizando etanol 80% como solvente, tendo como controle positivo a quercetina (1 mg/mL em etanol 80%). A absorvância foi medida no comprimento de onda de 515 nm e a capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (\%) = \left(\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \right) * 100$$

Em que:

A controle = absorvância da solução de DPPH sem a amostra, já descontado o branco; **A amostra** = absorvância da amostra com o DPPH, já descontado o branco.

Os percentuais de atividade antioxidante (AA%) das amostras foram calculados e o gráfico resultante da concentração *versus* AA% foram construídos para

se obter a concentração efetiva em 50% de atividade (CE_{50}) por meio da regressão linear (FARIAS *et al.*, 2013; GUSMAN *et al.*, 2015).

4.6.2 Método de auto-oxidação com ácido linoléico

A capacidade antioxidante do extrato foi observada por meio do método de inibição de oxidação em 2 horas (WETTASINGHE *et al.*, 1999; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Preparou-se uma solução de β -caroteno na concentração de 0,2 mg/mL, em clorofórmio, que foi mantida ao abrigo de luz. O clorofórmio foi eliminado com auxílio de evaporador rotatório, e o β -caroteno foi ressolubilizado em 100 mL de água destilada saturada de oxigênio. A solução obtida foi agitada vigorosamente até tornar-se límpida. Em tubos de ensaio, colocou-se alíquotas de 4,8 mL da solução obtida. A amostra G (**Tabela 2**) (0,01 mg/ μ L) foi solubilizada em etanol e posteriormente adicionada aos tubos de ensaio contendo o β -caroteno. Como controle negativo foram utilizados 0,2 mL de etanol puro e como controle positivo, BHT foi utilizado (01 mg/ μ L em etanol). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 470 nm e em intervalos de 20 minutos. As amostras foram mantidas em banho maria a 50 °C entre as leituras. A atividade antioxidante foi expressa como:

$$AA\% = \frac{(1 - (A_o - A_t))}{(A_{oo} - A_{ot})} * 100$$

Sendo:

A_o = Absorbância no início do experimento com a amostra a se testar; A_t = Absorbância no tempo t com a amostra a se testar; A_{oo} = Absorbância no começo do experimento sem a amostra a se testar; A_{ot} = Absorbância no tempo t sem a amostra a se testar

O resultado foi expresso como Índice de Atividade Antioxidante (IA= (conteúdo de β -caroteno depois de 1 ou 2 h/ conteúdo inicial de β -caroteno t=0) x 100

4.7 Análise Quimiométrica

Utilizou-se o método multivariado de Análise de Componente Principal (PCA), que possui como objetivo identificar a relação entre os parâmetros analisados

de forma exploratória (FERREIRA *et al.*, 2015). Foram incluídos na análise os dados preliminares de FPS, ação antioxidante e a área dos picos com espectro UV correspondentes aos compostos arilpropanoídeos e flavonoides para análise mais ampla. Os gráficos gerados apresentam o *score plot*, que representa os dados originais visualizados nas coordenadas e *loading plot*, que significa o peso de cada variável original no cálculo do componente principal. As análises quimiométricas desta etapa foram realizadas com utilização do *software* Chemoface 1.6. O conjunto destas análises foi utilizado como critério para escolha do extrato final e então proceder aos testes *in vitro*.

4.8 Doseamento de fenóis totais

Para realização da dosagem de fenóis totais, foi utilizada adaptação da monografia do Barbatimão da Farmacopéia Brasileira 6ªed (FARMACOPEIA BRASILEIRA 6 ED, 2019b). O doseamento do conteúdo total de polifenóis foi realizado a partir de uma solução aquosa de concentração de 2,0 mg/mL do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G). Uma alíquota de 5 mL foi diluída em um balão volumétrico de 100 mL com água. Por fim, uma alíquota de 2 mL de uma solução amostra foi adicionada à 10 mL de água destilada, 1 mL de reagente de Folin-Denis em um balão volumétrico de 25 mL com solução saturada de Na₂CO₃. A solução de pirogalol foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL, em água destilada. O branco refere-se à mesma solução sem o reagente de Folin-Denis. Os testes foram realizados em triplicata. Após 30 min, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 760 nm. O teor total de polifenóis foi calculado a partir da curva de calibração das soluções padrão de pirogalol (0,002mg/mL) e os resultados foram expressos em g de pirogalol por 100 g de amostra (% p/p), calculado de acordo com a equação abaixo:

$$Fenóis\ totais\ (\%) = \frac{AA * CP * 100}{AP * m\ (g)}$$

Em que: AA: Absorbância da amostra; CP: Concentração do padrão; AP: Absorbância do padrão; M(g): Massa em gramas.

4.9 Determinação do perfil fitoquímico por análises cromatográficas

4.9.1 Perfil fitoquímico dos extratos de *B. dracunculifolia* por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os perfis fitoquímicos foram analisados em CCD utilizando os extratos de *B. dracunculifolia*. Para avaliação do perfil fitoquímico das amostras, foram preparadas placas de CCD manualmente, utilizando-se 8 g de gel de sílica 60 GF254 (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh) dispersos em 20 mL de água ultrapura, com posterior secagem das placas em estufa a 100 °C. Foram preparadas soluções com os extratos e padrões das amostras a 1% (m/v), utilizando como solvente etanol 80% (v/v). Para a completa solubilização utilizou-se banho ultrassônico por 20 min. O eluente empregado para avaliação dos constituintes mais apolares da amostra foi uma mistura de acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água (20: 60: 10: 10; v/v/v/v). Para os componentes mais polares, a solução eluente foi composta por acetato de etila: metanol: água (7,7: 1,3: 1, v/v/v). Após a eluição das amostras, a placa foi revelada com difenilborato de aminoetanol (Reagente Natural), seguida de macrogol 4000 e luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm.

4.9.2. Identificação de flavonoides

Foram solubilizados 0,0101 g do extrato de *B. dracunculifolia* (amostra G) em 1 mL de etanol 80%, com auxílio de banho ultrassônico por 20 minutos. Foi utilizado como eluente uma mistura de acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água (60:20:20:15, v/v/v/v). Após a eluição das amostras, a placa foi revelada com difenilborato de aminoetanol (Reagente Natural), seguida de macrogol 4000 em luz ultravioleta em λ 365 nm. O flavonoide de referência utilizado foi quercetina.

4.9.3 Identificação de fenóis

A mesma solução do extrato preparado para a identificação de flavonoides foi utilizada para a identificação de fenóis. Foi utilizado como eluente uma mistura de clorofórmio: acetona: ácido fórmico (50: 40: 10, v/v/v), com solução de cloreto férrico a 2% (m/v) como agente revelador e como substância de referência o ácido gálico na concentração de 1 mg/mL em etanol.

4.9.4 Perfil fitoquímico dos extratos de *B. dracunculifolia* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparo das amostras

As amostras de *B. dracunculifolia* foram preparadas de acordo com o item 4.3. Para avaliação do perfil fitoquímico, foram preparadas soluções na concentração de 5 mg/mL utilizando como solvente metanol grau CLAE. Em seguida, as amostras foram filtradas com membrana de 0,22 µm. Foram utilizadas as substâncias de referência: ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, canferol, rutina e apigenina para comparação com os extratos (tempo de retenção, perfil espectral e coinjeção). As soluções com as substâncias referência foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL, sendo solubilizadas com uma solução de metanol grau CLAE. Para os experimentos de coinjeção, foram adicionados 100 µL de solução de 1 mg/mL de cada padrão. Para aquisição dos cromatogramas, foram injetados 10 µl de forma automática no equipamento de CLAE.

Condições cromatográficas para CLAE-DAD

As condições cromatográficas estabelecidas para as análises qualitativas dos extratos de *B. dracunculifolia* e substâncias referência foram: cromatógrafo Waters Alliance®2695 (Massachusetts, Estados Unidos), coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm, d.i.), detector ultravioleta por arranjo de diodos Waters® DAD 2998, observando o comprimento de onda de 270 nm, fluxo de 1 mL/min e temperatura do forno de 30 °C. Utilizou-se a eluição em sistema de gradiente linear de acetonitrila grau CLAE e água ultrapurificada, acidificados com 0,1% de ácido fosfórico (**Tabela 3**). Foi aguardado um intervalo de 15 minutos entre cada injeção, para reequilibrar a coluna. Os cromatogramas foram monitorados e os dados foram adquiridos com auxílio do *Software Empower Waters*.

Tabela 3 - Sistema em gradiente de eluição linear empregado para obtenção dos perfis cromatográficos.

Tempo (min.)	H₃PO₄ 0,1% em água (%)	H₃PO₄ 0,1% em acetonitrila (%)
0,0	95	5
37,0	5	95
39,0	5	95
40,0	95	5
45,0	95	5

Condições cromatográficas para ESI-QTOF-LC-MS

Para avaliação da composição química do extrato de *B. dracunculifolia* (amostra G), utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa. O experimento foi realizado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As condições de análise foram: cromatógrafo Shimadzu CBM-20A (Tokyo, Japão), coluna Supelco Ascentis C18 (5 µm, 250 x 4 mm, d.i.), detector ultravioleta Shimadzu SPD-20A, observando os comprimentos de onda de 270 nm e 350 nm, fluxo de 1 mL/min e temperatura do forno de 30 °C. Utilizou-se o mesmo esquema de eluição em gradiente linear e a mesma composição de solventes (grau MS) para a fase móvel (substituindo o ácido fosfórico por ácido fórmico) contido na **Tabela 3**. O volume de injeção foi de 15 µL e a amostra foi filtrada em membrana com porosidade de 0,22 µm. O analisador de massa acoplado ao cromatógrafo foi o equipamento MaXis 3G Bruker Daltonics (Massachusetts, Estados Unidos). A ionização por *electrospray* (ESI) foi realizada operando no modo negativo de leitura. As condições de ionização foram: voltagem do capilar 4.5kV, temperatura do gás de secagem 250 °C, fluxo do gás de secagem 8 L/min, end plate 500V, pressão do nebulizador 2 Bar, energia de colisão no intervalo entre 25-75eV. O intervalo de massa foi avaliado no modo AutoMD na relação massa/carga (*m/z*) de 100 a 1000 kDa. O conjunto de dados foi adquirido, processado e analisado utilizando o *software Bruker Compass DataAnalysis* (versão 4.3).

Após extração dos dados da massa (MS) e fragmentação (MS/MS) dos constituintes químicos da amostra, estes foram tabulados. Para identificação das substâncias, os espectros de MS e MS/MS foram comparados com dados retirados da literatura (KUMAZAWA *et al.*, 2003; TOMAZZOLI *et al.*, 2020) e dados presentes em base de dados como MASST do *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>; Wang *et al.*, 2020) MoNA (HORAI *et al.*, 2010), *ReSpect for phytochemicals* (SAWADA *et al.*, 2012) e PubChem (Kim *et al.*, 2019).

4.10 Avaliação *in silico*

Com a finalidade de avaliar as propriedades estereoeletrônicas relacionadas ao mecanismo de ação das substâncias bioativas do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*, foi realizada a análise *in silico*. Esta análise foi realizada em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Bianca Aloise Corrêa Santos, com a aluna de pós-graduação Caroline de Almeida Freitas Accioli e Anne C. P. da Silva, do Laboratório de Planejamento Farmacêutico e Simulação Computacional (LaPFarSC), Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.10.1 Análise conformacional e otimização geométrica

Para determinar a geometria inicial com energia mínima, foi realizada uma análise conformacional utilizando o programa SPARTAN 10. As estruturas tridimensionais dos marcadores químicos descritos na literatura de *B. dracunculifolia*: Quercetina, rutina, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, canferol, 3-prenilcinamato de alila, ácido cinâmico, artepilina C e ácido caféico, foram submetidas ao método de busca conformacional sistemática SPARSE e *Merck Molecular Force Field* (MMFF). Posteriormente, uma otimização geométrica adicional foi realizada usando a abordagem semi-empírica Método Paramétrico 6 (PM6). Os cálculos quânticos foram realizados no programa GAMESS US, aplicando a Teoria Funcional da Densidade (DFT), com B3LYP funcional com cálculos de conjunto de base 6-31G (d). Os efeitos do solvente foram considerados usando um *Polarized Continuum Model* (PCM) no nível B3LYP / 6-31G (d). Cálculos de solvatação foram realizados para água ($\epsilon = 78,39$) e benzeno ($\epsilon = 2,27$) para simular o ambiente de água e óleo em comparação com a fase gasosa.

4.10.2 Estudos de absorção ultravioleta teórico

Os marcadores químicos de *B. dracunculifolia* selecionados para o estudo e citados no item 4.7.2.1 foram utilizadas para estudos teóricos do espectro de absorção por meio da Teoria Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) no mesmo nível teórico dos cálculos DFT, utilizando o programa GAMESS US. As 10 excitações de singleto-singlete mais baixas foram calculadas com seus respectivos comprimentos de onda, energias de transição, configurações de transição principais e intensidades de oscilador. Os orbitais de fronteira envolvidos na absorção de UV foram obtidos usando o programa SPARTAN 10 para determinar as relações estrutura-propriedade de absorção UV. Os efeitos do solvente também foram considerados nestes cálculos.

4.10.3 Avaliação de parâmetros antioxidante *in silico*

As propriedades eletrônicas foram obtidas a partir das estruturas otimizadas utilizando o *software* MacMolPlt 7.7 (BODE; GORDON, 1998). O Orbital Molecular Mais Alto Ocupado (HOMO) e o Orbital Molecular Mais Baixo Não Ocupado (LUMO) foram identificados e parâmetros de energia como HOMO-LUMO gap energy (E_{bg}), Potencial químico (μ) e potencial de ionização (IP) e dureza química (η) foram calculados com o objetivo de estabelecer a relação entre a estrutura e o potencial antioxidante.

4.11 Ensaio de potencial fotoprotetor e antimutagênico com *Saccharomyces cerevisiae*

Com a finalidade de avaliar o potencial fotoprotetor e antimutagênico do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* sob luz solar simulada, foi realizada a análise *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae*. Esta análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Marcedo de Pádula e a pós graduanda Msc. Raiane Diniz, do Laboratório de Microbiologia e Avaliação Genotóxica (LAMIAG), Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

4.11.1 Cepa de *S. cerevisiae*, meio de cultivo e condições de crescimento

As culturas celulares da levedura *S. cerevisiae* (**Quadro 1**) foram crescidas a partir do estoque original a 28 °C em meio YPD (*yeast peptone dextrose*) líquido

composto por 1% de extrato de levedura (Bacto™), 1% de bacto de peptona (Bacto™) e 2% de glicose (Merck). Para a avaliação da fotoproteção em termos de fotocitotoxicidade, foi utilizado o meio YPD (*yeast peptone dextrose*) sólido, com a mesma composição anteriormente descrita, acrescentando-se 2% de ágar (Bacto™). Para a avaliação da foto/antifotomutagênese foi utilizado o sistema de resistência à canavanina a partir do meio YNBD (*yeast nitrogen base - dextrose*) sólido, composto de 2% de glicose (Merck), 0,7% de YNB (*yeast nitrogen base without amino acids*) (Difco™), 2% de ágar (Bacto™), suplementado com os aminoácidos referentes à auxotrofia da cepa e com canavanina (Sigma–Aldrich) (60 mg/L). O meio YNBD^{Can} sólido descrito é um meio seletivo que permite o crescimento de colônias que sofreram mutação induzida pelo tratamento (PADULA *et al.*, 2004; DINIZ *et al.*, 2019).

Quadro 1 – Dados da Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada na avaliação do potencial fotoprotetor e antimutagênico da amostra G de *Baccharis dracunculifolia*.

Designação das cepas	Genótipo relevante	Fenótipo	Origem
AWP001	FF18733 com <i>yno1::KanMX6</i>	<i>yno1</i> ⊗	Aquino, Wilmart e Pádula (UFRJ, RJ, Brasil)

Fonte: Cedido por Raiane Rosalez Diniz (2021)

4.11.2 Protocolo de irradiação: luz solar simulada (LSS)

A fonte ultravioleta usada para a irradiação foi um simulador solar da marca Oriel/Newport®, modelo 91192 (Newport Corp., USA) com lâmpada de xenônio e potência de até 1000 W contendo o filtro (Newport) AMO atenuador atmosférico, que bloqueia a emissão de infravermelho e o filtro 87066, que bloqueia parte da luz visível. O equipamento foi ajustado de forma a emitir 21 J/m²/s de UV-A (λ 315-400 nm e 1.2 J/m²/s de UV-B (λ 280-315 nm). Ao espectro emitido deu-se o nome de Luz Solar Simulada (LSS), portanto, composta por radiação visível, UV-A e UV-B, os últimos na proporção de aproximadamente 17:1 (UV-A:UV-B), permitindo a mimetização de condições equivalentes à exposição solar ambiental, de forma controlada, sem as flutuações sazonais encontradas quando se utiliza a exposição direta ao sol em diferentes períodos do ano.

O protocolo de irradiação utilizado foi descrito por Diniz *et al.* (2019) e é equivalente a uma exposição de 30 minutos de duração ao sol do meio dia de um dia de verão na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

A **Tabela 4** apresenta as doses de UV-A e de UV-B contidos na LSS emitida e os tempos de irradiação do protocolo os quais foram retiradas as alíquotas para a análise.

Tabela 4 - Doses de UV-A e UV-B contidos na Luz Solar Simulada (LSS) e seus respectivos tempos de irradiação.

Doses de UVB na LSS (kJ/m ²)	Doses de UVA na LSS (kJ/m ²)	Tempos de irradiação
0	0	0' 00"
2.5	41.64	34' 42"
3.0	49.98	41' 39"
4.0	66.70	55' 35"
5.0	83.30	1 h 9' 25"
7.5	124.98	1 h 44' 9"
10.0	166.64	2 h 18' 52"

UVA: radiação ultravioleta A; UV-B: radiação ultravioleta B; LSS: luz solar simulada

Fonte: Adaptado de DINIZ *et al.*, 2019

4.11.3 Preparo inicial das culturas celulares para tratamento

As cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas em 10 mL de meio YPD líquido (28°C, sob agitação por 24 horas), em seguida, foram repicados 100 µL desse cultivo em novos 10 mL de meio YPD líquido (28 °C, sob agitação por 48 horas) até a fase estacionária de crescimento. Posteriormente, as culturas foram lavadas por três vezes com água estéril e centrifugadas por 10 minutos a 5,8 g em temperatura ambiente e ressuspensas em 10 mL de água estéril. A densidade ótica foi verificada em λ 600 nm, em espectrofotômetro. As células foram diluídas a 10⁷ células/mL (o que corresponde a densidade ótica igual a 1). Essa suspensão celular de 10⁷ células/mL em um volume final de 10 mL foi, então, tratada com o extrato etanólico de *B. dracunculifolia*, conforme descrito nos itens 4.3 e 4.4 a seguir.

4.11.4 Avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* na ausência de irradiação com LSS

A suspensão celular (10^7 células/mL, volume final de 10 mL) foi tratada com 100 µg/mL do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G) na temperatura de 28°C e mantida sob agitação em erlenmeyer durante 3 horas na ausência de qualquer fonte de luz. Para a determinação da sobrevivência celular, a cada 1 hora de tratamento foi retirada uma alíquota em duplicata de 100 µL da suspensão tratada, que foi posteriormente diluída em 900 µL de água estéril. Foram feitas três ou mais diluições seriadas em água estéril a fim de viabilizar a contagem das colônias sobreviventes e, em seguida, procedeu-se com o plaqueamento, em duplicata, em meio YPD sólido. A mutagênese foi analisada no início e no fim das 3 horas de tratamento, plaqueando-se as alíquotas em meio seletivo YNBD^{Can} sólido. A contagem das colônias sobreviventes e mutantes (mutantes resistentes à canavanina - Can^R) se deu após 72 horas de incubação das placas em estufa a 28 °C (DINIZ *et al.*, 2019).

Esta etapa foi realizada para avaliar se o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* apresentava potencial citotóxico e mutagênico mesmo na ausência de irradiação UV, a fim de evitar resultados falso-positivos na avaliação em presença de irradiação (DINIZ *et al.*, 2019).

4.11.5 Avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* na presença de irradiação com LSS

Para avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G) na presença de irradiação com LSS, a suspensão celular (10^7 células/mL, volume final de 10 mL) foi disposta em placas de irradiação de 5 cm de diâmetro, tratada ou não (controle) com 100 µg/mL do extrato e irradiada com LSS, conforme descrito na **Tabela 4** do item 4.8.2.

O potencial fotoprotetor do extrato foi avaliado comparando-se a sobrevivência celular da cepa irradiada com LSS e tratada com o extrato, com a sobrevivência celular da cepa irradiada com LSS não tratada (controle). Da mesma forma, o potencial foto/antifotomutagênico do extrato foi avaliado comparando-se o número de mutantes Can^R da cepa irradiada com LSS e tratada com o extrato, com o número de mutantes Can^R da cepa irradiada com LSS não tratada (controle).

Para a avaliação da sobrevivência celular, foram retiradas alíquotas a cada tempo de irradiação (**Tabela 4**) e plaqueadas em meio YPD sólido. A avaliação da mutagênese induzida se deu na dose que produz 37% de sobrevivência (DL_{37}) de cada tratamento. A avaliação da mutagênese na DL_{37} foi padronizada em estudos anteriores e permite uma comparação confiável e padronizada do número de mutantes induzidos por diferentes tratamentos (HAYNES *et al.*, 1979; ECKARDT *et al.*, 1979; ECKARDT *et al.*, 1980; HAYNES *et al.*, 1980). Para isso, foram retiradas alíquotas no tempo de irradiação correspondente a DL_{37} de cada tratamento (controle e teste) para plaqueamento em meio YNBD^{Can} sólido.

As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 72 horas para o crescimento das colônias de sobreviventes e mutantes. Após crescimento, as colônias foram contadas e a média dos resultados foram representados em gráficos de fração de sobrevivência (N/N0) *versus* tempo de irradiação, para avaliação do potencial fotoprotetor do extrato, e em gráfico de frequência no número de mutantes Can^R *versus* tratamento, para avaliação do potencial foto/antifotomutagênico (DINIZ *et al.*, 2019).

4.12 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados no programa GraphPad Prism version 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA). Foram adotados os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons) para demonstrar as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para o teste com a cepa de *S. cerevisiae*. Para a apresentação dos dados de ação antioxidante e fotoprotetora foi realizada média e desvio padrão e a análise de variância (teste ANOVA) com pós-teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

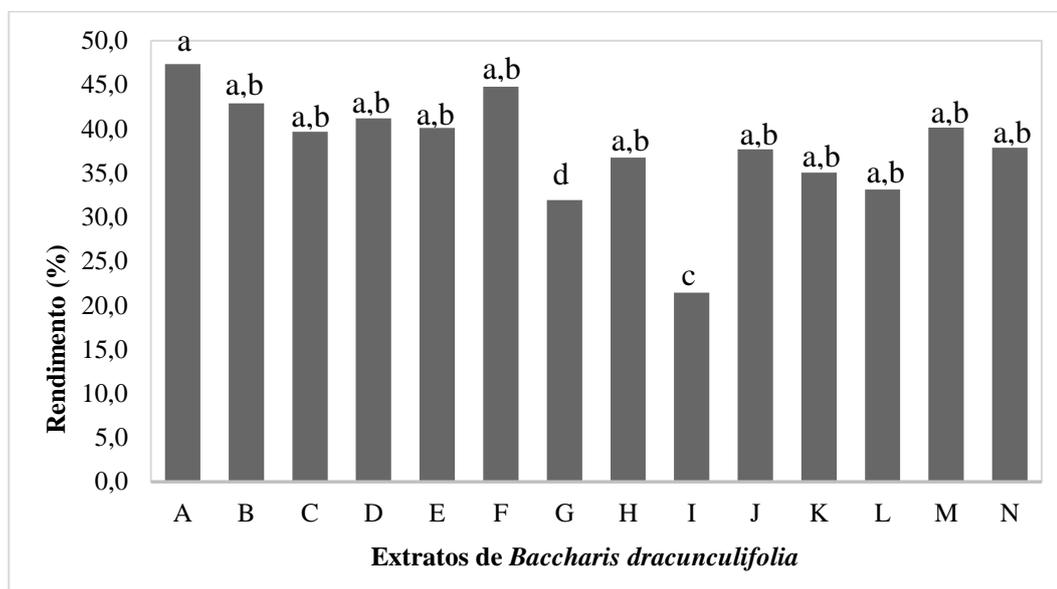
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5.1 Planejamento experimental 2³ para obtenção das amostras: otimização do método extrativo

A fim de obter um extrato otimizado de *B. dracunculifolia* para utilização como insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) em formulações com a finalidade fotoprotetora tópica multifuncional (ação fotoprotetora, antioxidante e anti-inflamatória), foi realizado um planejamento experimental com avaliação de diferentes temperaturas, métodos extrativos e solventes (**Tabela 2**). A quantidade de material vegetal pulverizado e o tempo de extração foram padronizados para ambos os métodos extrativos.

De maneira geral, os maiores rendimentos (p/p) foram observados com a utilização do método extrativo de refluxo (amostras A G). Destacaram-se com maiores rendimentos os métodos utilizados na obtenção dos extratos de A F, dos quais utilizaram o refluxo, na temperatura intermediária de 70 °C e como solvente extrator etanol:água na proporção de 75:25 e na temperatura mais alta estudada (80 °C), com etanol puro. Também se destacaram os extratos H, J, M, N. O menor rendimento extrativo foi encontrado no método utilizado no extrato I, que utilizou como método extrativo o ultrassom, temperatura de 60 °C e etanol puro. Esse resultado pode ser explicado devido à associação do método de extração por maceração com o auxílio de ultrassom e menor temperatura utilizada. A **Figura 5** mostra os resultados dos rendimentos (p/p) obtidos.

Figura 5 - Rendimentos extrativos (p/p) obtidos para os extratos de *B. dracunculifolia* no planejamento experimental 2³ e no fracionamento para a seleção de condições extrativas ótimas e composição química.



Nota: Teste: ANOVA One-way seguido do pós-teste de Tukey (n=2). a,b,c,d médias diferem entre si (p<0,0001). Fonte: Elaborada pela autora (2021)

O estudo de Casagrande *et al.* (2018) evidenciou que além da influência da sazonalidade, o método extrativo e a temperatura de extração são fatores que podem influenciar a concentração dos compostos bioativos presentes no extrato e, logo, a atividade biológica da espécie estudada.

Em observação aos resultados de rendimento extrativos para os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos descritos para esse estudo e comparando com os resultados da **Tabela 1**, 78% dos trabalhos científicos que pesquisaram atividades biológicas de *B. dracunculifolia* utilizaram como solvente extrator o etanol ou a mistura de etanol e água para obtenção dos extratos. O trabalho de IURCKEVICS *et al.* (2019) avaliou a produção de partículas encapsuladas do extrato de *B. dracunculifolia* obtido a 70 °C por 20 minutos em metanol 95%, segundo a otimização realizada previamente. A utilização do etanol como solvente pode-se justificar devido a maior extração das substâncias fenólicas, como flavonoides e arilpropanoides presentes na espécie. Além disso, o etanol é um dos solventes mais utilizados para a produção de formulações

devido à sua alta pureza, baixa toxicidade, custo acessível e disponibilidade de grupamento hidroxila para interação e extração de substâncias de menor polaridade (VISHT *et al.*, 2012).

Os solventes extrativos descritos na literatura para obtenção da melhor atividade antioxidante, avaliada pelo método de DPPH, em ordem, para extratos vegetais foram: acetona > metanol > etanol > água (CASAGRANDE *et al.*, 2018; MOKRANI *et al.*, 2016). MARTINEZ-CORREA *et al.* (2012) demonstraram que na extração de *B. dracunculifolia*, o melhor desempenho de atividade antioxidante foi obtido com a utilização do etanol como solvente, em comparação com a utilização da água.

IURCKEVICZ *et al.* (2021) avaliaram a influência dos métodos extrativos no conteúdo de fenóis, na ação antioxidante e na ação antimicrobiana utilizando o planejamento experimental 2^3 porém com utilização do solvente metanol. Os resultados apresentados confirmam que a melhor condição extrativa para obtenção de altas concentrações de fenólicos, maior capacidade antioxidante e maior poder redutor de ferro foram encontrados com a utilização de metanol 95% (v/v) a temperatura de 70 °C e extração por 20 minutos em agitador mecânico.

Apesar de haver correlação entre maiores temperaturas, tipos de solvente e maior rendimento extrativo (p/p), outros parâmetros foram avaliados e analisados para justificar a escolha da condição extrativa ótima para a seleção do melhor extrato para dar continuidade ao estudo. Os parâmetros avaliados foram a atividade antioxidante e o fator de proteção solar, ambos *in vitro*.

5.2 Atividade fotoprotetora *in vitro*

Para avaliação da atividade fotoprotetora, *in vitro*, utilizou-se método de Mansur *et al.*(1986). Este método avalia o fator de proteção solar por espectrofotometria na faixa de λ 290 a 320 nm. Por ser considerado um método clássico, ainda é utilizado rotineiramente para realizar a triagem inicial dos extratos vegetais e substâncias com potencial para utilização em formulações fotoprotetoras (SANDOVAL *et al.*, 2020; SEVERINO *et al.*, 2019; CEFALI *et al.*, 2019). Os valores obtidos por meio desta metodologia devem ser confirmados por outros métodos, incluindo testes *in vivo*, com a incorporação dos ativos nos veículos adequados e na

composição final da formulação (HE *et al.*, 2020). O exemplo de cálculo realizado está demonstrado no **ANEXO A**.

O experimento espectrofotométrico para avaliação da fotoproteção foi realizado em triplicata e na concentração de 130 µg/mL, selecionada após análise preliminar da relação entre concentração e resposta. A maioria dos extratos não demonstrou diferenças estatísticas entre as médias dos valores de FPS obtidos, exceto a amostra L, que apresentou o melhor resultado com FPS de 22,9 e as amostras com FPS mais baixos: E, I, J, K, com FPS de 14, 12,5, 14,1 e 12,5, respectivamente. Considerando que já é descrito que os fenólicos apresentam potencial de absorção na faixa do UV e pequena variação de fotoestabilidade, foi realizada a análise do FPS para as amostras obtidas no presente trabalho. Os valores obtidos estão descritos na **Tabela 5**.

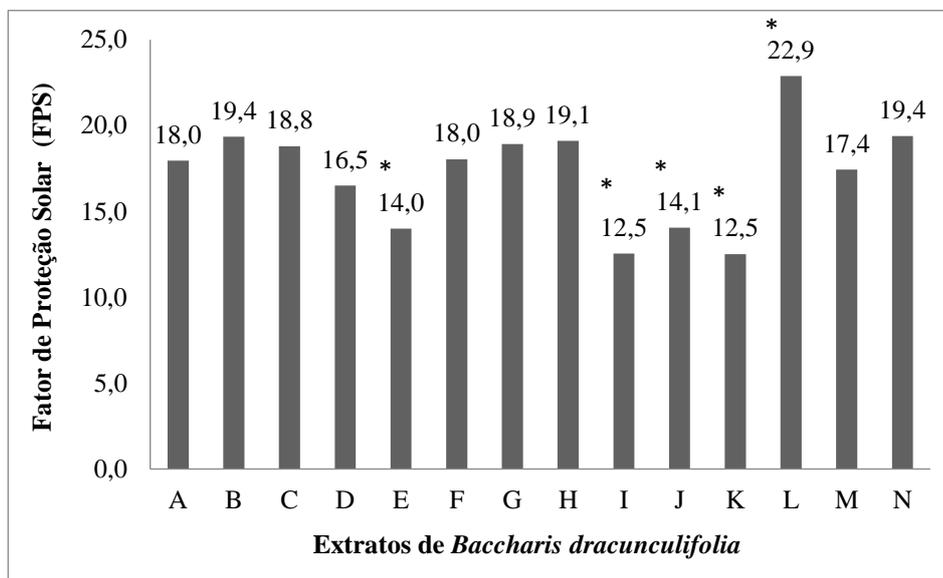
Tabela 5 - Valores do fator de proteção solar dos extratos etanólicos de *B. dracunculifolia*

AMOSTRA/ EXTRATO	FPS	DESVIO PADRÃO
A	18,0	1,3
B	19,4	1,1
C	18,8	0,5
D	16,5	2,1
E	14,0	1,2
F	18,0	0,5
G	18,9	0,7
H	19,1	1,2
I	12,5	1,6
J	14,1	2,6
K	12,5	1,2
L	22,9	0,6
M	17,4	0,5
N	19,4	0,4

No geral, os maiores valores de FPS foram encontrados nas amostras que utilizaram o refluxo como método extrativo (A G), ou ainda, o ultrassom em maior

temperatura (amostra L). Os valores de FPS podem ser observados também na Figura 6.

Figura 6 - Fator de proteção solar dos extratos etanólicos *in vitro*. Método de Mansur *et al.* (1986)



Nota: GraphPrism 6.0 Teste ANOVA One-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). As médias diferem entre si (P< 0,0001). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Em seu trabalho, Neto (2016) analisou o extrato etanólico de folhas e caules de *B. dracunculifolia* obtido por 7 dias de maceração e encontrou o FPS de 25,67. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela utilização de caules e folhas, para a obtenção do extrato bruto e também pela concentração utilizada no teste, que não foi descrita no trabalho. Este fato dificulta a comparação entre os valores obtidos no presente trabalho. Destaca-se também valores altos de absorbância nos dados descritos neste trabalho, o que raramente é descrito para extratos vegetais.

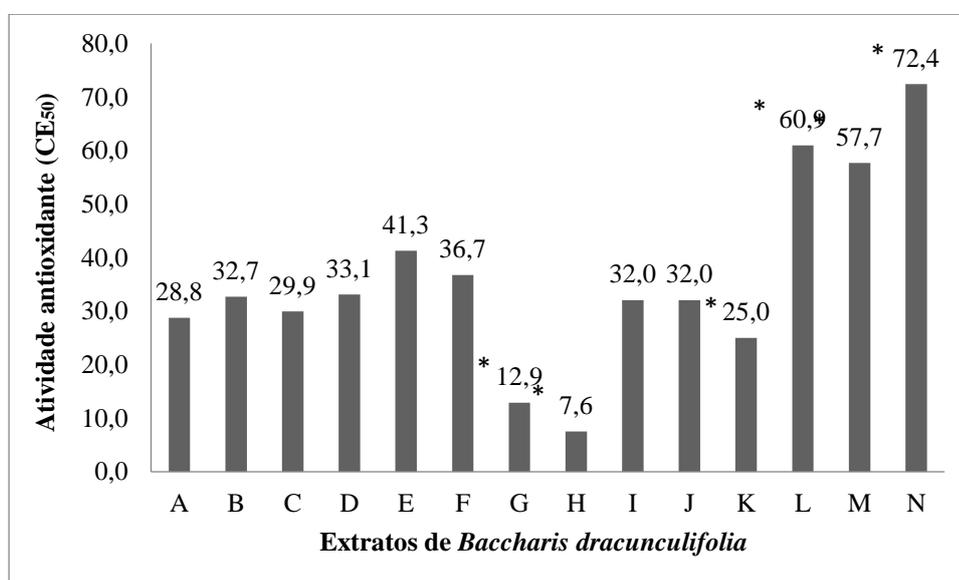
O estudo de Couteau *et al.* (2008) analisaram o fator de proteção solar de amostras de própolis *in vitro*, obtendo FPS próximo a 10. O autor não descreve os constituintes químicos da amostra e nem o tipo de própolis estudado. Ainda, Alencar *et al.* (2005) observaram um perfil de absorção no espectro UV próximo entre o extrato etanólico de própolis e o extrato metanólico de *B. dracunculifolia*, com pico de absorção máximo próximo ao comprimento de onda λ 300 nm. Estudos do grupo de

Choquenot *et al.* (2009) avaliaram o potencial fotoprotetor e a fotoestabilidade dos flavonoides e polifenóis: diosmina, miricetina, ácido caféico, puerarina, apigenina, luteonina, baicalina, naringerina, hesperitina e hesperidina. Para estudo da fotoestabilidade atendeu-se o critério de obter FPS de 10. A baicalina, naringerina, hesperitina e hesperidina não atenderam ao critério estabelecido na concentração de 10%. O ácido caféico foi considerado como a substância que possui maior potencial de efetividade fotoprotetora, dentre as 10 substâncias analisadas no trabalho.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos extratos etanólico e hidroetanólico da espécie estudada foi determinada pelo método de sequestro de radicais DPPH, que pode ser reduzido por antioxidantes pela doação de átomos de hidrogênio para formar o radical estável e no ensaio de auto-oxidação do ácido linoléico. Os valores de CE₅₀ no ensaio de atividade antioxidante do DPPH estão demonstrados na **Figura 7**.

Figura 7 - Valores de CE₅₀ obtidos pelo método de DPPH para análise da ação antioxidante *in vitro* de amostras do extrato de *B. dracunculifolia*.



Nota: GraphPrism 6.0 Teste ANOVA One-way, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). As médias diferem entre si (P < 0,05). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante evidenciaram que as amostras G e H possuem o melhor potencial antioxidante, sendo o valor de CE₅₀ 12,9 µg/mL e 7,6 µg/mL, respectivamente. O controle positivo utilizado foi a quercetina, que

apresentou valor de CE₅₀ de 5 µg/mL, resultado encontrado semelhante a outros trabalhos (COSTA *et al.*, 2017). Resultados semelhantes de atividade antioxidante de extratos alcoólicos de *B. dracunculifolia* foram encontrados por Neto (2016), Piantino *et al.* (2008), Paroul *et al.* (2016), sendo os valores de CE₅₀ de 33,76 µg/mL, 23,88 µg/mL, 18,23 µg/mL, respectivamente.

5.3.1 Auto-oxidação do ácido linoléico

Os polifenóis provenientes de espécies vegetais podem exercer a sua ação antioxidante por múltiplas vias, como agentes redutores, doadores de átomos de hidrogênio e neutralizadores de oxigênio singlete (GULCIN *et al.*, 2020).

O método de auto-oxidação do β-caroteno/ ácido linoléico consiste na inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico (DANET *et al.*, 2021). Neste sistema, os radicais livres formados promovem ataque no β-caroteno, que é uma molécula insaturada, e estabilizam por ressonância a deficiência eletrônica, provocando alteração da cor laranja, que pode ser detectada pelo espectrofotômetro. Substâncias com atividade antioxidante, como os fenólicos, podem promover a neutralização dos radicais livres que são formados na reação e conseqüentemente descoram menos o β-caroteno, o que determina a atividade de uma amostra proteger um substrato lipídico da oxidação (WETTASINGHE *et al.*, 1999; GULCIN *et al.*, 2020).

Este experimento foi realizado utilizando-se a amostra G como teste e como controle positivo o BHT. Os resultados obtidos confirmam a ação antioxidante do extrato de *B. dracunculifolia* observado nos experimentos deste trabalho, com valor de 45%. Enquanto o índice de ação antioxidante observado para o BHT na concentração de 20 mg/mL foi de 51%.

Duarte-Almeida *et al.* (2006) realizaram testes com os padrões ácido clorogênico (900 µM), quercetina (540 µM), rutina (1.600 µM) e encontraram índice antioxidante, pela mesma metodologia empregada no presente trabalho, de 25%, 42%, e 28%, sendo a quercetina a que apresentou maior porcentagem de inibição, mesmo em concentrações menores que as utilizadas para os outros padrões. Santos *et al.* (2003), encontraram valor semelhante para o BHT após 2 horas neste mesmo método, com índice antioxidante 64,1%.

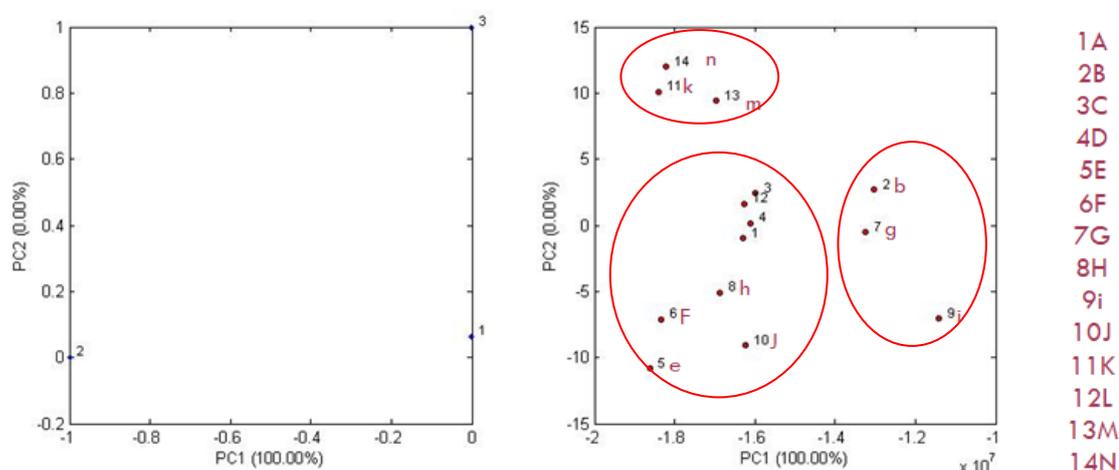
Não foram encontrados outros trabalhos em que esse método foi realizado para a espécie estudada.

5.4 Análise de componente principal (PCA)

De posse dos resultados da (i) área dos picos cromatográficos selecionados como majoritários, obtido após análise por CLAE-DAD para fenólicos e flavonoides, (ii) ação antioxidante, (iii) ação fotoprotetora, realizou-se a análise de componentes principais para tratamento dos dados multivariados com o objetivo de selecionar o melhor método extrativo. Além dos valores de atividade antioxidante e fotoprotetora, foi incluída na análise a área dos picos cromatográficos de arilpropanoides e flavonoides majoritários obtidos por CLAE-DAD dos extratos estudados (A-N). O cromatograma com os picos majoritários de arilpropanoides e flavonoides encontra-se no **ANEXO B**.

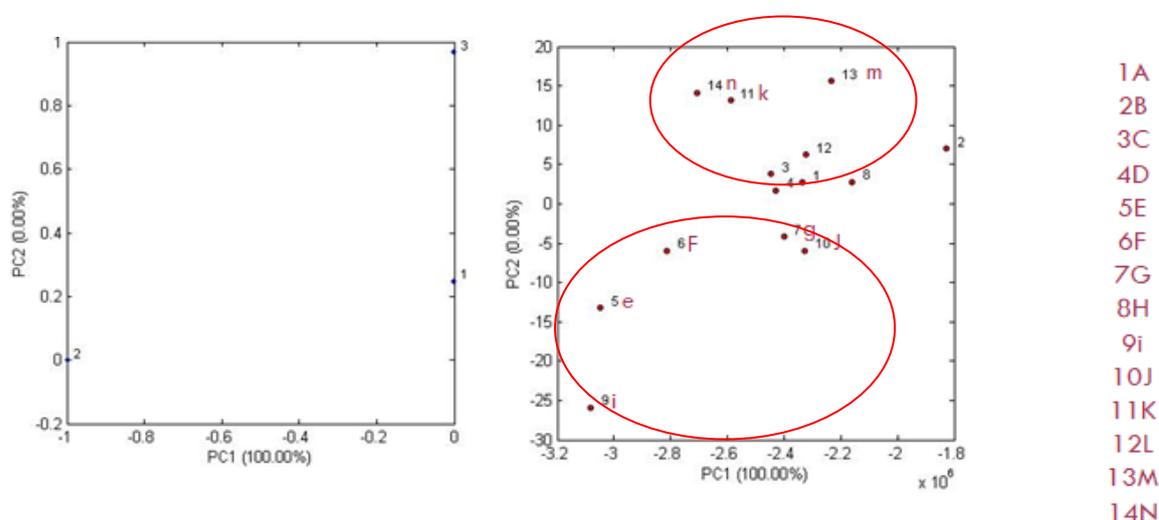
A partir do *plot* do gráfico PCA (FPS (1), área dos picos arilpropanoides (2) e atividade antioxidante (DPPH) (3)), é possível notar que os arilpropanóides (2) têm a maior contribuição para o primeiro componente principal (PCA1), sendo possível observar a separação dos extratos B, G e I. Já para todas as outras amostras a maior contribuição foi no segundo componente principal (PCA2), no qual o FPS e a atividade antioxidante têm maior contribuição (**Figura 8**).

Figura 8 - Análise de componentes principais do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*. Componentes avaliados no score plot: 1- FPS, 2- área dos picos arilpropanoides majoritários e 3- Atividade antioxidante (DPPH). À direita (*loading plot*) estão as amostras (A-N).



A partir do *plot* do gráfico PCA (FPS (1), área dos picos flavonoides (2) e atividade antioxidante (DPPH) (3)), é possível notar que os flavonoides (2) têm a maior contribuição para o primeiro componente principal (PCA1), sendo possível observar a separação dos extratos B, G e I. Já para todas as outras amostras a maior contribuição foi no segundo componente principal (PCA2), no qual o FPS e a atividade antioxidante têm maior contribuição (**Figura 9**).

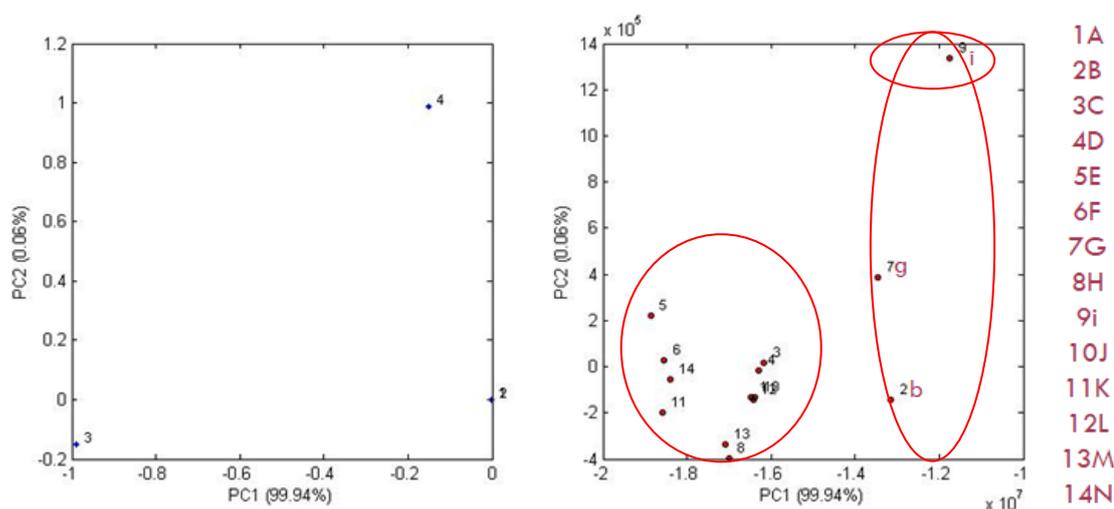
Figura 9 - Análise de componentes principais do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*. Componentes avaliados: 1- FPS, 2- área dos picos flavonoides majoritários e 3- Atividade antioxidante (DPPH).



Na análise do *plot* do gráfico de PCA (FPS (1), ação antioxidante (DPPH) (2), área dos picos arilpropanoides (3), área dos picos flavonoides (4)), é possível visualizar que os arilpropanoides (3) têm a maior contribuição para o primeiro componente principal (PCA1), sendo possível observar a separação dos extratos B, G e I, sendo que o extrato I também tem contribuição dos flavonoides no segundo componente principal (PCA2) (**Figura 10**).

Com base na análise de componente principal foi possível concluir que a concentração de arilpropanoides e flavonoides são determinantes para as atividades fotoprotetora e antioxidante, sendo selecionados, majoritariamente, em todas as análises realizadas as amostras: B, G e I (**Figuras 8 a 10**).

Figura 10 - Análise de componentes principais do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*. Componentes avaliados: 1- FPS, 2- ação antioxidante (DPPH), 3- área dos picos arilpropanoídes majoritários, 4- área dos picos flavonoides majoritários.



Nos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante foi possível concluir que os melhores resultados foram apresentados para G e H, com CE_{50} de 12,9 e 7,6 (g/ml, respectivamente e na fotoproteção B e G apresentaram uma das maiores atividades: 19,4 e 18,9, respectivamente e I uma das menores atividades, 12,5 (**Tabela 6**).

De posse desses resultados, o extrato B e G poderiam ser selecionados para a continuidade dos estudos. Entretanto, selecionamos para a continuidade dos estudos a amostra G, uma vez que a mesma utilizou como método extrativo refluxo e como solvente etanol puro, enquanto B também utilizou refluxo, mas como solvente a solução etanólica a 75%, o que torna o processo de obtenção do extrato seco mais difícil pela necessidade de retirar a água e com maiores possibilidades de contaminação microbiológica. A seleção de G ainda é reforçada por resultados de trabalhos que mostram que o etanol é um bom solvente para a extração de substâncias antioxidantes e também sua utilização na maioria dos trabalhos de atividade farmacológica de *Baccharis spp.*

Tabela 6 - Dados brutos analisados preliminarmente no planejamento experimental. Os extratos obtidos por planejamento experimental estão descritos como amostras (A-N), a média do FPS e do ensaio de atividade antioxidante e a área dos picos majoritários selecionados foram avaliados. Software Design Expert®.

Amostras	Média FPS	Média CE₅₀ (DPPH)	© Área dos picos arilpropanoides	©Área dos picos flavonoides
A	18,0	28,78	61751385	12650055
B	19,4	31,93	57191010	11518512
C	18,8	29,93	60426045	11365603
D	16,5	33,10	34750920	4498344
E	14,0	41,27	42039726	14576361
G	18,9	12,87	25561061	12209089
H	19,1	7,56	53584114	9171438
I	12,5	32,04	42942273	17423843
J	14,1	32,04	30393422	12081254
K	12,5	25,00	52078122	9437217
L	22,9	60,95	65647658	13793795
M	17,4	57,70	63755589	11937772
N	19,4	72,40	62241414	13691527

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.5 Doseamento de fenóis totais em *Baccharis dracunculifolia*

Após a seleção da condição extrativa G otimizada para obtenção de extrato com maiores concentrações de fenólicos e maiores atividades antioxidante e fotoprotetora, este extrato foi utilizado para as análises posteriores, incluindo fenóis totais.

O doseamento de fenóis totais foi realizado por espectrofotometria utilizando os reagentes fosfomolibdicotungstico. A amostra G analisada apresentou

média de resultados de $6,30\% \pm 0,1266$ de fenóis totais expresso como pirogalol. Os resultados estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Quantificação de fenóis totais segundo a monografia do Barbatimão adaptada (FARMACOPEIA, 2019b).

Fenóis	F1	F2	F3	MÉDIA (%)	DP
	6,44	6,28	6,19	6,30	0,1266

DAMBROS FILHO *et al.* (2021), publicaram resultados de avaliação de fenóis totais pelo método de Folin-Denis com valores maiores, 9,7%, em seu estudo com o extrato da mesma espécie, obtido por maceração em solvente hidroalcoólico 60% durante 15 dias, o que pode ser justificado pela influência da sazonalidade e composição do solo na produção de substâncias bioativas.

De acordo com SFORCIN (2012), as maiores concentrações dos fenólicos artepilina C e isosacuranetina são encontradas nos meses de dezembro a abril, enquanto outros compostos estão presentes durante o ano todo, como o ácido caféico e aromadendrina-4-metiléter (AME), em diferentes concentrações, sendo marcadores quimiotaxonômicos da espécie. A coleta da espécie, neste trabalho, foi realizada no mês de Janeiro, em ambiente de área verde, com características dos biomas: Mata Atlântica e Cerrado.

O extrato etanólico de própolis verde *in natura*, com composição conhecidamente próxima ao do extrato de *B. dracunculifolia*, apresentou uma média de 0,89% de fenólicos totais expressos em ácido gálico (SALGUEIRO *et al.*, 2016). O efeito da sazonalidade dos compostos fenólicos artepilina C, AME e ácido caféico, do extrato etanólico de 10 populações da espécie foi estudado pelo grupo de DE SOUSA *et al.* (2011) em três regiões diferentes: São Paulo, Minas Gerais e Paraná. De acordo com o estudo, a biossíntese das substâncias fenólicas apresentaram maiores concentrações nos meses de Dezembro a Abril, período com maior quantidade de chuva e incidência solar, apresentando valor médio de 5% de fenólicos totais. Um valor semelhante foi encontrado por Neto (2016), sendo 4,5% de fenóis totais e 0,5% de flavonoides totais, expressos em ácido gálico e quercetina, respectivamente.

5.6 Análise dos extratos de *B. dracunculifolia* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

B. dracunculifolia é uma espécie que apresenta em sua composição micromolecular flavonoides, arilpropanoides e terpenoides.

Os flavonoides constituem uma classe importante entre os metabólitos secundários de espécies vegetais. São substâncias com estrutura química polifenólica, com um ou mais grupos substituintes ricos em hidroxilas ou seus derivados, como éteres. Já os arilpropanoides são fenólicos que possuem uma cadeia lateral de 3 átomos de carbono. São encontrados amplamente nos produtos naturais (PANCHE *et al.*, 2016). Já os terpenos são substâncias voláteis solúveis em solventes orgânicos apolares, que apresentam em sua estrutura hidrocarbonetos terpênicos, de forma geral (HEINZMANN *et al.*, 2016)

Com o objetivo de avaliar qualitativamente a composição química dos extratos de *B. dracunculifolia* foram realizadas análises cromatográficas por CCD em sílica gel de todos os extratos preparados. Para a análise mais completa da constituição química utilizou-se duas fases móveis, uma para analisar os constituintes menos polares e outra para analisar os constituintes mais polares. A revelação das cromatoplasmas foi realizada com a utilização de reagentes seletivos para cada classe de substância analisada em luz UV λ 245 nm e λ 365 nm. Na identificação de flavonoides e fenóis foi possível observar o aparecimento de manchas amarelas, escuras e rosadas, demonstrando a presença de substâncias químicas dessas classes de compostos nos extratos de *B. dracunculifolia*. Essa identificação foi confirmada posteriormente por CLAE-DAD e por ESI-QTOF-LC-MS. As manchas de coloração amarela são referentes a presença de flavonoides enquanto as manchas escuras são referentes às substâncias fenólicas (**ANEXO C**). Manchas pardas e vermelhas ou róseas escuras (triterpenos pentacíclicos livres) e as manchas azuis que se alteram para a cor verde foram utilizados como indicativo da presença de esteróis livres (**ANEXO C**).

Apesar de haver separação das bandas e sugestão da classe de substância pela cor gerada com o reagente seletivo, não foi possível realizar a confirmação das substâncias contidas no extrato com a utilização de padrões de

referência por essa análise, sendo necessárias outras técnicas cromatográficas. Foram utilizadas como substâncias de referência: ácido ursólico, quercetina, ácido caféico, canferol e rutina. Essa constatação pode ser justificada pela considerável presença de derivados das substâncias de referência utilizadas, fato confirmado pela análise de ESI-QTOF-LC-MS realizada.

Funari *et al.* (2006) descreveram os eluentes dos sistemas cromatográficos que promoveram melhor separação das substâncias de *B. dracunculifolia*. São eles: tolueno: dioxano: ácido acético glacial (90: 25: 4, v/v/v/v), tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (36:12:5, v/v/v), tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (40:10:5, v/ v/ v), tolueno: metiletilcetona: ácido acético glacial (18:5:1, v/v/v). As placas foram visualizadas com o Reagente Natural seguido de macrogol 4000 em luz ultravioleta a λ 254 e 366 nm e vapor de amônia ou solução etanólica de cloreto de ferro 3%, ambos na luz visível.

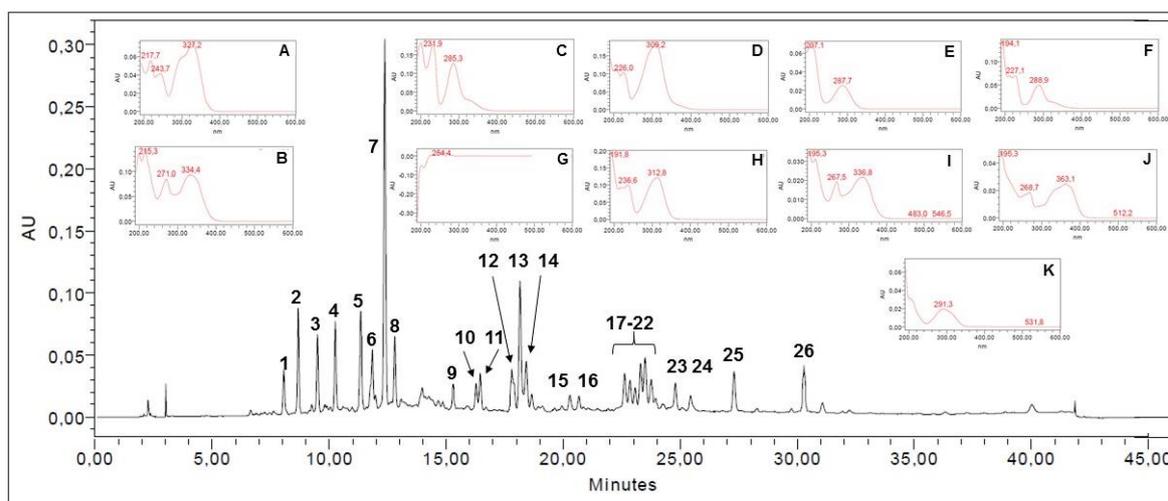
5.7 Avaliação do extrato por CLAE-DAD e ESI-QTOF-LC-MS

A análise com espectroscopia de massa é considerada versátil, ideal para a avaliação de compostos secundários das plantas medicinais, que podem apresentar variação da concentração das substâncias marcadoras de acordo com a sazonalidade e variabilidade entre as espécies, necessitando assim de métodos sensíveis para a realização de análises qualitativas e quantitativas (STEINMANN *et al.*, 2011; OKSMAN-CALDENTEY *et al.*, 2004).

A amostra G foi analisada por CLAE-DAD e foram co-injetados os padrões analíticos: ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico e apigenina. No cromatograma total, ao ser realizada a integração dos picos majoritários, foi possível observar a presença de alguns grupos de substâncias onde o perfil do espectro de ultravioleta em comum foi identificado e nomeado com as letras de **A** à **K**. A letra **A** (picos 1, 6 a 9) correspondeu aos derivados de ácido hidroxicinâmico (ácido caféico/clorogênico), com os máximos de absorção no UV de, aproximadamente, λ 240 nm e 325 nm; a letra **B** (picos 2, 3, 13, 21) indicou a presença de flavonas tri-substituídas no anel A ou B, com os máximos de absorção de λ 270 nm e 330 nm. O pico 5 – letra **D** – UV λ 226 nm e 309 nm pode ser atribuído ao ácido cumárico; a letra **H** (picos 16, 25) com UV λ 231 nm e 314 nm podem indicar a presença de artemisina C e derivados. A letra I (picos

18, 19) indicou a presença de apigenina e derivado; a letra J (picos 20, 22) sugere a presença de derivados de canferol, UV λ 266 nm e 364 nm). Os demais picos 4, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 23, 24 e 25 apresentaram espectros de UV pouco característicos e ainda não foram identificados (**Figura 11**).

Figura 11 - Cromatograma de CLAE-DAD do extrato G visualizado em 270 nm. Gráficos do espectro de ultravioleta de A-K dos principais picos do cromatograma.



A- picos 1, 6, 7, 8, 9; **B-** picos 2, 3, 13, 21; **C-** pico 4; **D-** pico 5; **E-** pico 10, 11; **F-** pico 12, 14, 17; **G-** pico 15; **H-** pico 16, 25; **I-** pico 18, 19; **J-** pico 20, 22; **K-** pico 22, 24, 26.

Em um primeiro momento afirmou-se que alguns dos picos poderiam corresponder aos padrões analíticos que foram co-injetados. Porém, é bastante difícil fazer esta afirmação, uma vez que existe possibilidade de derivados químicos destes padrões estarem presentes no extrato e apresentarem mesmo tempo de retenção. O cromatograma total de CLAE-DAD observado em λ 270 nm para a amostra G, com os principais picos e os cromatogramas com os padrões co-injetados encontram-se nas **Figuras 12 a 14**.

Figura 12 - Cromatograma de CLAE-DAD da amostra G co-injetada com ácido caféico (λ 270 nm) e espectro UV-vis do ácido caféico.

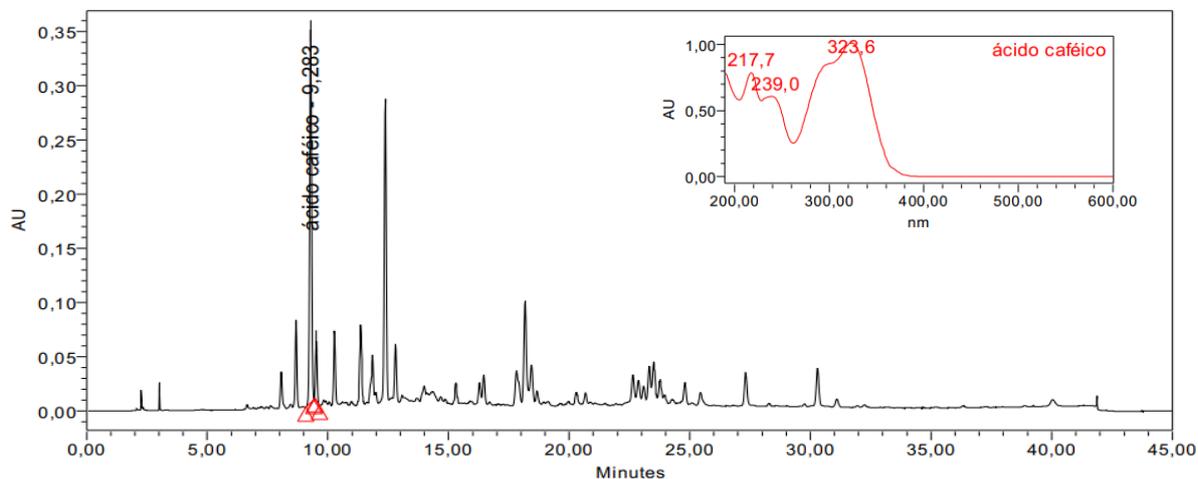


Figura 13 - Cromatograma de CLAE-DAD da amostra G co-injetado com ácido ferúlico (λ 270 nm) e espectro UV-vis do ácido ferúlico.

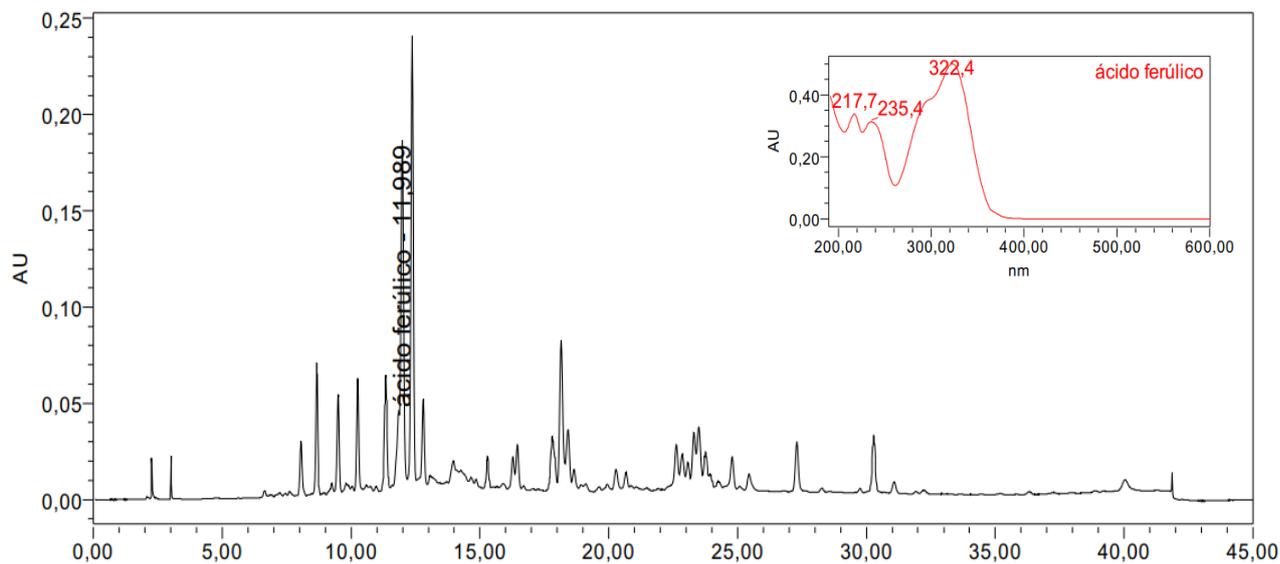
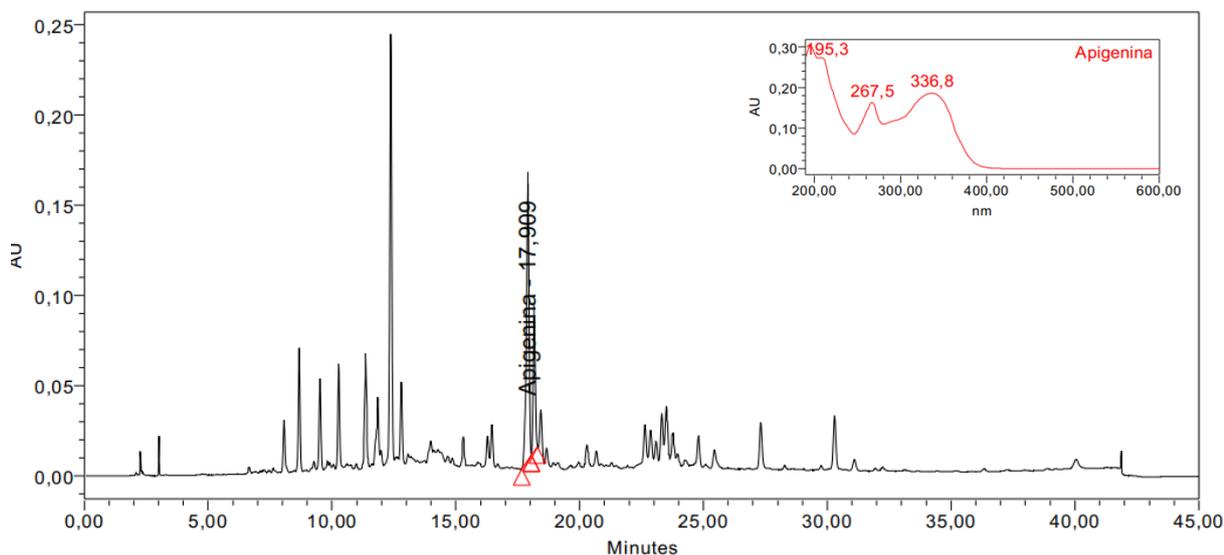
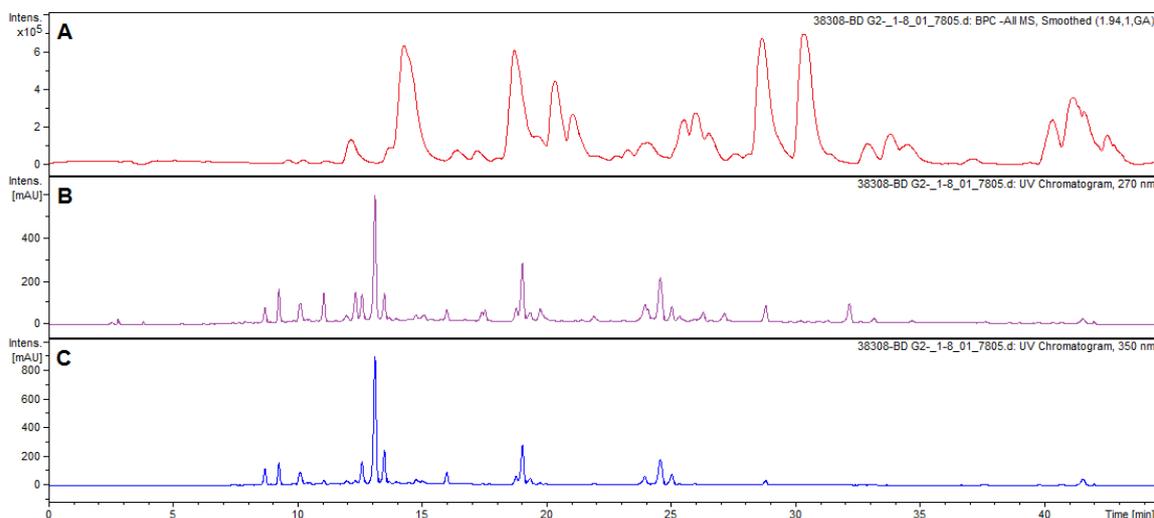


Figura 14 - Cromatograma de CLAE-DAD da amostra G co-injetado com apigenina (λ 270 nm) e espectro UV-vis da apigenina



Para confirmação da identidade dos picos, foi realizada a injeção da amostra G em cromatógrafo a líquido acoplado a detector de massa com ionização por *electrospray* (**Figura 15**). Este experimento foi realizado a fim de obter-se a massa exata dos compostos (MS) e suas fragmentações (MS/MS) para possibilitar sua identificação com auxílio de banco de dados de espectrometria de massa de livre acesso (GNPS, MoNA, PubChem, ReSpect) e dados encontrados na literatura (KUMAZAWA *et al.*, 2003; TOMAZZOLI *et al.*, 2020). Foram extraídas as informações de todos os sinais aparentes no cromatograma do pico base (BPC), além de extração de íons correspondentes à compostos previamente relatados para a espécie e para o própolis verde e que não haviam sido encontrados no BPC, num primeiro momento. Assim, os compostos desreplicados encontram-se listados na **Tabela 8**, bem como os seguintes dados: Tempo de retenção TR (min), fórmula molecular, m/z [M-H] e principais fragmentos m/z (abundância relativa).

Figura 15 - Cromatogramas do extrato G de *B. dracunculifolia* obtidos no experimento de ESI-QTOF-LC-MS/MS.



A. Cromatograma de pico base (BPC – *base peak chromatogram*) B. Cromatograma observado em 270 nm C. Cromatograma observado em 350 nm. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A análise da amostra G foi realizada no modo negativo devido à composição química do extrato, rico em ácidos carboxílicos e fenóis, que são mais facilmente desprotonados (CROTTI *et al.*, 2006). Com isso, a análise dos espectros de UV, obtidos com a análise por CLAE-DAD, em conjunto com a análise dos espectros de MS e MS/MS permitiu identificar 18 das 36 substâncias químicas que foram encontradas. Não foi possível realizar o cruzamento dos dados de DAD e MS para identificar os picos de forma inequívoca pelo fato do BPC não apresentar correspondência exata com o cromatograma de UV.

Entre os metabólitos presentes da amostra G, considerando as análises de CLAE-DAD em conjunto com os espectros de massa, foram encontradas quatro substâncias com massa e perfil de fragmentação correspondente aos ácidos cafeoilquínicos, derivados do ácido clorogênico, com os íons desprotonados $[M-H]^-$ m/z 515,1181, m/z 515,1199 (dois isômeros derivados de ácido di-cafeoilquinico), m/z 529,134 (ácido cafeoilferuloilquinico, **16**) e m/z 677,1500 (ácido 3,4,5-tricafeoilquinico, **17**). A diferenciação dos ácidos di-cafeoilquínicos utilizando espectrometria de massa pode ser encontrada nos trabalhos de Clifford *et al.* (2003) e De Maria & Moreira (2004) onde é possível realizar a atribuição das moléculas por meio da presença e abundância dos fragmentos disponíveis após a realização dos experimentos de

fragmentação sequencial MS3 e MS4. Os principais fragmentos destes isômeros foram identificados, porém, mesmo sendo a técnica de ionização por *eletrospray* eficiente na identificação de isômeros, não foi possível realizar a atribuição para os ácidos di-cafeoilquínicos (3,4; 3,5; 4,5) uma vez que o cromatograma de CLAE-DAD também apresentou 5 picos com o espectro de UV correspondente a estes derivados (λ_{\max} 325). Alguns trabalhos que descrevem a química de *B. dracunculifolia* apontam para a existência dos isômeros 3,4- e 4,5- di-cafeoilquínicos, podendo então ser sugerida a presença destes isômeros (KUMAZAWA *et al.*, 2003; TOMAZZOLI *et al.*, 2020).

A presença de derivados prenilados do ácido hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) é bastante relatada para a espécie, bem como para o própolis verde (KUMAZAWA *et al.*, 2003; TOMAZZOLI *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2008; DE SOUSA *et al.*, 2008). Entre estes derivados, foi possível a identificação, utilizando os dados de espectrometria de massa, do ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico (m/z 247,0978; **18**), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (m/z 299,1656; artepilina C, **4**), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (m/z 231,034; drupanina, **19**) e ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico (m/z 363,1601; bacarina, **20**). Levando em consideração o cromatograma de CLAE-DAD para a amostra G, foi possível identificar alguns picos com o espectro de UV (λ_{\max} 312) de derivados prenilados (picos 16 e 25). Também foi verificada a presença de um perfil de espectro de UV correspondente ao ácido cumárico (pico 5; UV λ_{\max} 309) com a correspondência do padrão co-injetado, porém, sem íon molecular identificado para tal. Isso nos leva a crer que, de fato, existem derivados de ácido *p*-cumárico presentes na amostra G com características mais polares.

O conteúdo flavonoídico da amostra G, observado após a análise dos espectros de UV adquiridos por CLAE-DAD, foi confirmado após a realização do experimento de espectrometria de massa. Constatou-se a presença de possíveis flavonas tri-substituídas (UV $_{\max}$ 330), derivados do canferol (UV $_{\max}$ 365), apigenina (UV $_{\max}$ 336) e naringenina (UV $_{\max}$ 288). Foi possível a identificação de nove íons moleculares $[M-H]^-$ dos flavononóis dihidrocanferol (m/z 287,0561, **21**) e dihidrocanferídeo ou AME- aromadendrina-4'-metil éter (m/z 301,0723, **22**); dos flavonóis canferídeo (m/z 299,0575, **9**) e velutina (m/z 313,0719, **23**); das flavonas

apigenina (m/z 269,0453, **8**); diosmetina (m/z 299,0566, **24**); 4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (m/z 329,0669, **25**) e das flavanonas naringenina (m/z 271,0618, **26**) e isosacuranetina (m/z 285,0771, **27**). Interessante mencionar que metade dos compostos supramencionados são derivados metoxilados. Além destes flavonoides também se percebeu a presença de outros derivados de flavonas e flavonóis aos quais não foi possível a atribuição da identidade final. Muitos destes flavonoides já foram reportados por Kumazawa *et al.* (2003) e Tomazzoli *et al.* (2020) e, além disso, outros autores já reportaram estes mesmos constituintes para o própolis verde, o que serve como guia no momento de atribuição da identidade dos compostos de *B. dracunculifolia* (MACHADO *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020, TOMAZZOLI *et al.*, 2020).

De acordo com SOUSA *et al.* (2011), a sazonalidade tem participação importante na produção das substâncias encontradas em *B. dracunculifolia*. Fatores com as condições de solo, temperatura e umidade, além do ataque de microorganismos podem explicar a presença de marcadores químicos em menores concentrações e também a presença de derivados desses marcadores em menor abundância, como os que foram encontrados no presente trabalho pela análise de ESI-QTOF-LC-MS. As substâncias sinalizadas na coinjeção da análise preliminar por CLAE- DAD não apresentaram correspondência com as substâncias marcadoras descritas na literatura, apesar de serem encontradas bandas de absorção no espectro UV semelhante. Isto pode ser explicado pela presença dos derivados dessas substâncias.

Todos os cromatogramas e espectros de massa dos compostos encontram-se no **ANEXO D**.

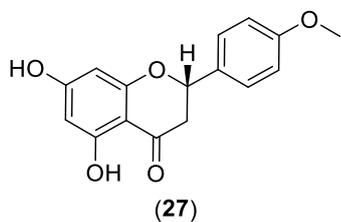
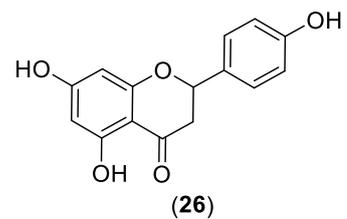
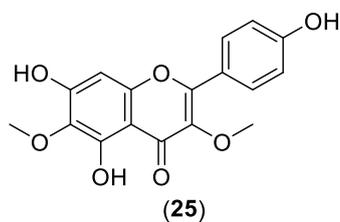
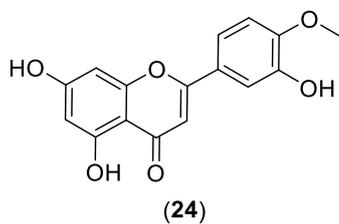
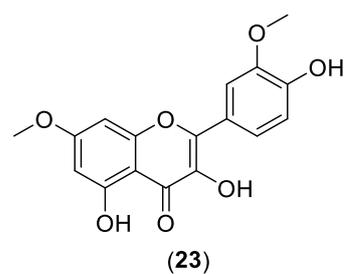
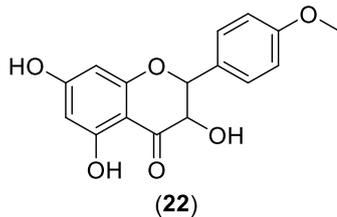
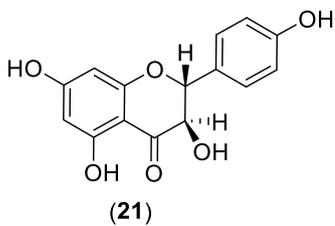
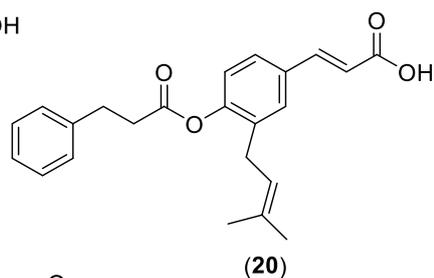
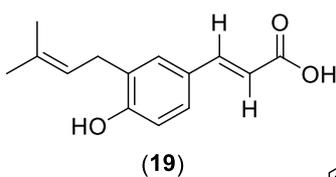
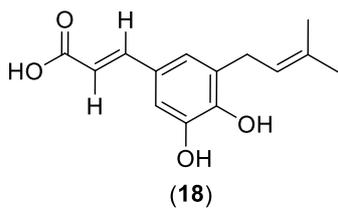
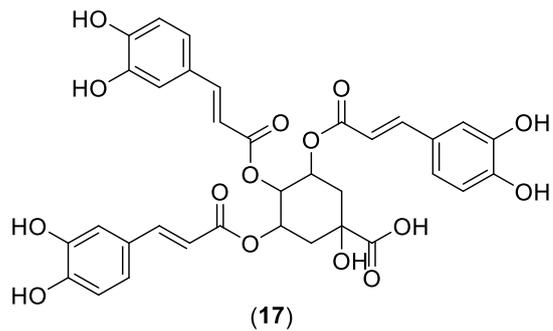
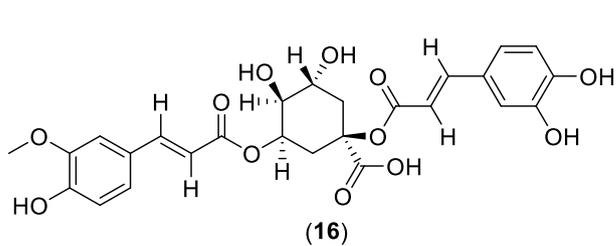
Tabela 8 - Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação da amostra G de *Baccharis dracunculifolia* utilizando ESI-QTOF-LC-MS.

Composto	TR (min)	Nomenclatura proposta (Fórmula Molecular)	m/z [M-H] ⁻	Principais fragmentos m/z (abundância relativa)
1	12.1	N.I.	519,1718	399,1309(33); 339,1067(20); 309,0997(90); 279,0870(100); 111,0442(14)
2	13.7	Derivado di-cafeoilquínico (C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂)	515,1181	353,0882(100); 335,0796(16); 191,0542(20); 179,0346(20); 173,0463(29); 135,0460(37)
3	13.7	N.I.	489,1602	369,1212(49); 309,0997(100); 279,0874(84)
4	14.2	Derivado di-cafeoilquínico (C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂)	515,1199	353,0887(100); 191,0556(26); 173,0345(15); 135,0459(9)
5	16.3	N.I.	379,1759	379,1759(100); 317,1745(84); 259,1683(45); 243,1789(52); 126,0314(66)
6	16.3	Dihidrocanferol (C ₁₅ H ₁₂ O ₆) (21)	287,0561	259,0617(100); 125,0239(83)
7	16.3	Ácido cafeoilferuloil quínico (C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂) (16)	529,1341	367,1032(90); 353,0952(100)
8	17.2	Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅) (17)	677,1500	515,1195(100); 353,0866(15); 191,0599(17); 179,0345(27); 173,0453; 135,0433(23)
9	18.7	N.I.	361,1662	317,1758(100); 287,1642(11); 243,1762(58); 126,0324(13)
10	20.1	Apigenina (C ₁₅ H ₁₀ O ₅) (8)	269,0453	269,0453(100); 151,0039(75); 119,0502(56)
11	20.3	N.I.	361,1656	317,1760(100); 287,1653(75); 243,1767(70)

12	20.3	Diosmetina (C ₁₆ H ₁₄ O ₆) (24)	299,0566	284,0334(100); 117,0346(4)
13	20.3	Naringenina (C ₁₅ H ₁₂ O ₅) (26)	271,0618	151,0033(100); 119,0502(61)
14	20.7	Derivado de isoramnetina	315,0511	300,0275; 272,0333; 165,9895
15	21.1	N.I.	345,1714	315,1625(21); 271,1729(100); 97,0288(22)
16	21.1	Dihidrocanferideo / AME (C ₁₆ H ₁₄ O ₆) (22)	301,0723	284,0309(19); 227,0703(4); 152,0121(9)
17	22.3	Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinámico (C ₁₄ H ₁₆ O ₄) (18)	247,0978	203,1087(100); 148,0508(95)
18	22.8	N.I.	499,2547	455,2672(28); 409,2612(32); 379,2486 (100)
19	23.2	Drupanina (C ₁₄ H ₁₆ O ₃) (19)	231,1034	187,1133(100); 176,0469(12); 132,0590(49)
20	23.2	Derivado de ácido propenoico	315,1605	315,1605(100); 253,1606(82)
21	23.9	N.I.	347,1861	347,1861(100); 317,1755(80)
22	25.5	Derivado de flavona	673,3368	389,1969(68); 343,3557(100); 285,0772(40); 164,0121(9); 117,0348(41)
23	25.5	Isosacuranetina (C ₁₆ H ₁₄ O ₅) (27)	285,0771	285,0771(100); 268,0381(28); 243,0667(6); 164,0112(15)
24	25.9	Velutina (C ₁₇ H ₁₄ O ₆) (23)	313,0719	298,0482(100); 283,0248(34); 117,0345(16)
25	25.9	Canferideo (C ₁₆ H ₁₂ O ₆) (9)	299,0575	299,0575(100); 284,0335(66)
26	26.5	4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (C ₁₇ H ₁₄ O ₇) (25)	329,0669	314,0438(79); 271,0249(100)
27	26.5	Derivado de flavona	299,0572	284,0323(100)
28	28.6	Derivado de tricina	329,1764	299,1658(100); 255,1748(7)

29	28.6	Derivado de ácido cumárico	267,1033	163,0395(100); 145,0261(37); 119,0484(65); 117,0357(55)
30	30.2	Artepilina C (C ₁₉ H ₂₄ O ₃) (4)	299,1656	255,1761(100); 232,1108(3); 200,1210(13)
31	32.8	N.I.	641,3478	329,1760(100)
32	32.8	N.I.	447,2181	297,1503(42); 149,0611(100)
33	33.8	Bacarina (C ₂₃ H ₂₄ O ₄) (20)	363,1601	187,132(100); 149,0609 (38)
34	34.4	N.I.	517,3540	471,3482(100)
35	40.2	N.I.	555,4423	277,2181(100)
36	41.2	N.I.	911,7124	501,3588(7); 455,3538(100)

N.I. – não identificado



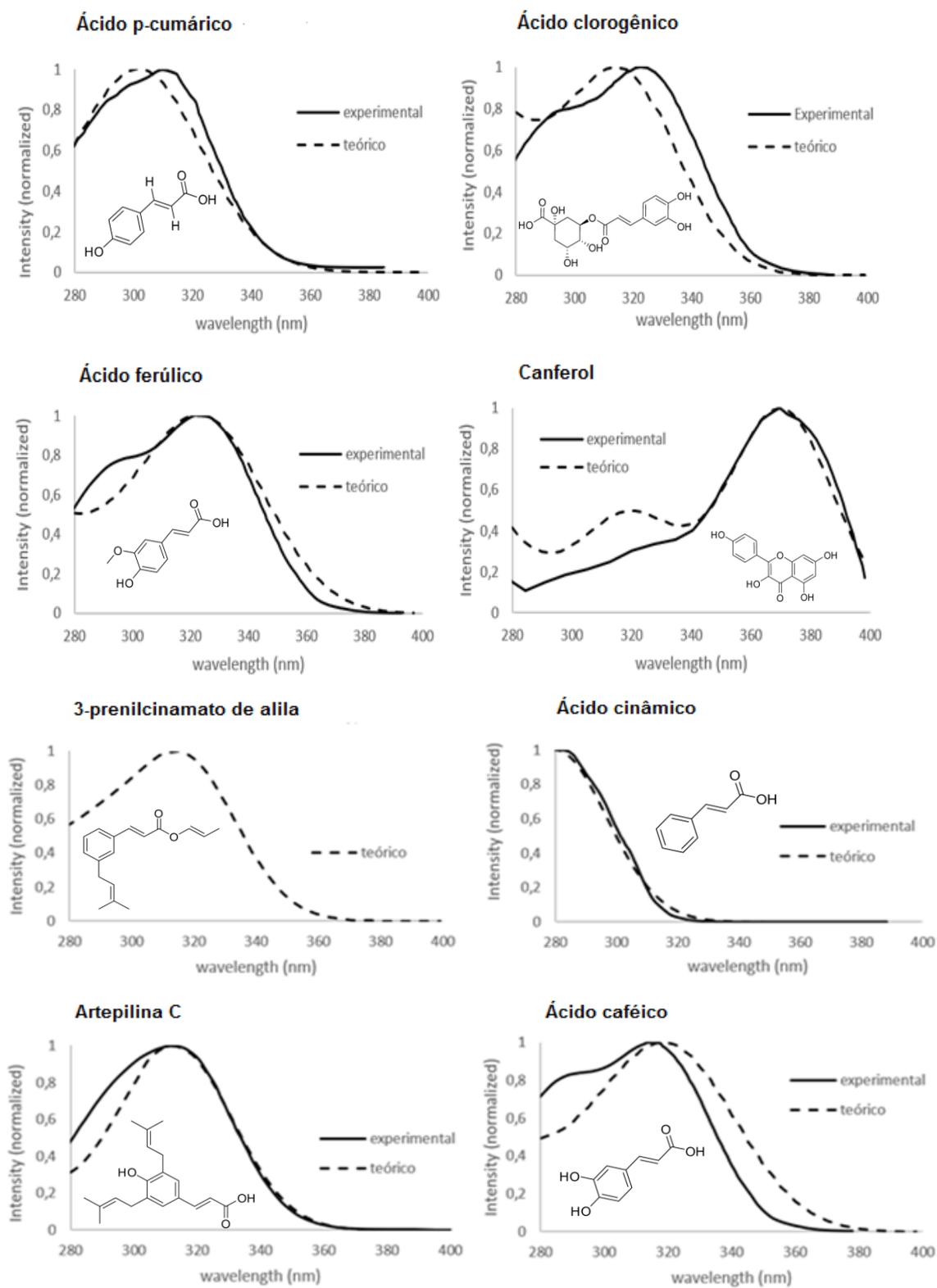
5.8 Atividade fotoprotetora *in silico*

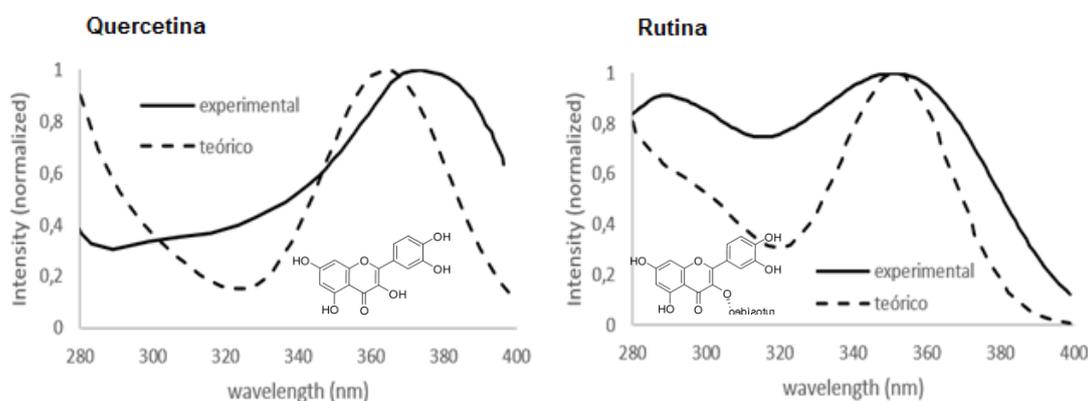
5.8.1 Avaliação da absorção ultravioleta de substâncias de *B. dracunculifolia* *in silico*

As substâncias presentes no extrato otimizado de *B. dracunculifolia* possuem ação sinérgica e também absorção no espectro UV de forma isolada. A fim de se comparar o fator de proteção solar teórico de cada substância encontrada na descrição de marcadores químicos descrita na literatura, avaliou-se a intensidade de absorção da quercetina, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, canferol, ácido cinâmico, artepilina C, ácido caféico e 3-prenilcinamato de alila, estabelecendo assim uma correlação da combinação das bandas com o valor obtido de forma experimental *in vitro*. As estruturas das substâncias descritas encontram-se disponíveis na introdução do presente trabalho (estruturas químicas 1-14).

A investigação *in silico* é capaz de realizar a previsão qualitativa das características do estado excitado das estruturas otimizadas para determinar os espectros teóricos de absorção de UV das substâncias. Para determinar a capacidade de prever os espectros de absorção de UV dos fenólicos em estudo, os cálculos foram realizados no estado excitado usando suas estruturas otimizadas. A fim de se comparar os espectros teóricos calculados na fase gasosa (sem influência do solvente) com os experimentais, foram obtidos gráficos de correlação teórica experimental para as moléculas em estudo (**Figura 16**), com exceção do 3-prenilcinamato de alila, que não apresentam valores experimentais descritos na literatura.

Figura 16 - Comparação da absorção UV experimental



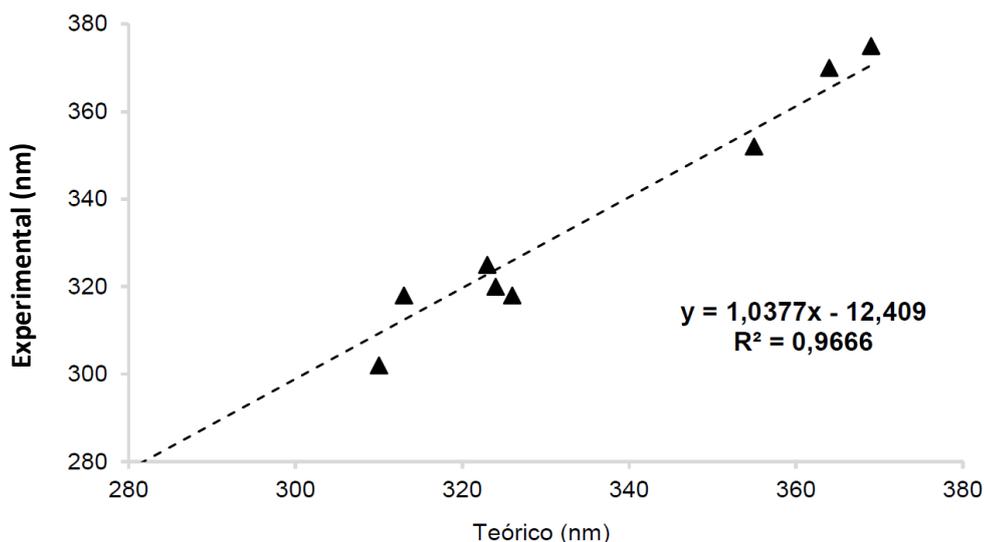


Dados exportados da **Monitoba University** <http://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/hplc/index.shtml> e teórico (vacuum, TDDFT/B3LYP/6-31G(d) method) das substâncias de ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cinâmico, 3-prenilcinamato de alila, ácido ferúlico, artepilina C, canferol, rutina e quercetina. Os dados foram normalizados de acordo com a intensidade máxima de cada espectro.

Com os resultados da análise, foi possível observar a correlação dos resultados uma vez que a banda global (combinação das bandas) é observada experimentalmente. Os resultados são relevantes considerando que os cálculos são realizados em fase gasosa, ao contrário dos ensaios experimentais que utilizam solventes. Os resultados obtidos demonstram um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9666$), conforme mostrado na **Figura 17**. Essa comparação permite identificar os desvios entre os cálculos no vácuo e a absorção experimental no solvente. O desvio obtido pode ser considerado preciso de acordo com os erros usualmente aceitos de cálculos TD-DFT em fase gasosa ($\leq 0,3$ eV) (SANTOS *et al.*, 2018).

A **Tabela 9** lista os comprimentos de onda (λ), energias de transição, força do oscilador (f), orbitais moleculares de fronteira (FMO) envolvidos e intervalo para os compostos em estudo. O gap de energia (E_{bg}) indica baixa estabilidade e alta reatividade, enquanto que alto E_{bg} está relacionado a uma molécula altamente estável e conseqüentemente baixa reativa (HASSANZADEH *et al.*, 2014, SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 17 - Comparação entre o comprimento de absorção máximo (nm) teórico e experimental de artepilina C, ácido caféico, ácido cinâmico, 3-prenilcinamato de alila, ácido ferúlico, canferol, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, rutina e quercetina.



Em relação aos arilpropanoides, o ácido cumárico e o ácido cinâmico diferem por uma hidroxila na posição *para*. A partir dos cálculos teóricos, foi possível obter suas propriedades de estado excitado e, a partir disso, pôde-se observar que ambos apresentam absorção na faixa de UV-B e valores próximos de intensidade de absorção, mas diferentes picos de absorção máximos.

O ácido cinâmico exibe uma absorção mais energética e mais próxima da faixa de UV-C, enquanto o ácido cumárico tem uma absorção menos energética e mais próxima da faixa de UV-A. Assim, é possível sugerir que a substituição em *para* do esqueleto do ácido cumárico aumenta o efeito mesomérico, estendendo a conjugação π na molécula.

Tabela 9 - Comprimento de onda (λ), energia de transição, força do oscilador (f), orbitais de fronteira molecular (FMO) envolvidos (HOMO e LUMO) e faixa obtida com TD-DFT/B3LYP/6-31G(d) para a artepilina C, ácido caféico, ácido cinâmico, 3-prenilcinamato de alila, ácido ferúlico, canferol, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, rutina e quercetina.

Substâncias	Estado	E (ev)	λ (nm)	f	MO	Λ Exp (nm) ^a
Arilpropanoides						
3-prenilcinnamato de alila	1	3,903	317	0,5765	H-L (93%)	-
Artepilina C	1	3,893	318	0,4118	H-L (90%)	313
Ácido p-cumárico	1	4,098	302	0,6607	H-L (98%)	310
Ácido cinâmico	1	4,418	280	0,5447	H-L (92%)	276
Ácido caféico	1	3,865	320	0,4528	H-L (97%)	324
Ácido ferúlico	1	3,814	325	0,4609	H-L (97%)	323
Ácido clorogênico	1	3,897	318	0,1578	H-L (94%)	326
Flavonoides						
Quercetina	1	3,301	375	0,4638	H-L (96%)	369
Rutina	1	3,519	352	0,3103	H-L (95%)	355
Canferol	1	3,345	370	0,4172	H-L (96%)	364

^aObtido da base da University of Manitoba

(<http://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/hplc/index.shtml>).

HOMO: Orbital molecular mais alto ocupado; LUMO: Orbital molecular mais baixo não ocupado

Conseqüentemente, isso induz um aumento discreto na força do oscilador da banda de absorção principal (GIERSCHNER *et al.*, 2012) e um deslocamento batocrômico (ou vermelho) (HARBORNE *et al.*, 2013; MABRY *et al.*, 2013). O aumento dos efeitos de substituição mesomérica do doador de elétrons diminuiu o E_{bg}, o que

justificou o desvio para o vermelho da absorção eletrônica (CISSE *et al.*, 2020). O ácido cumárico, logo, apresenta um Ebg menor quando comparado ao ácido cinâmico.

O ácido caféico apresenta hidroxilação em *orto* no núcleo cinâmico, nas posições *meta* e *para*. Em relação ao ácido cumárico, é possível observar uma hidroxila adicional. Portanto, pelas propriedades obtidas, é possível observar um deslocamento ainda maior próximo à região UV-A (λ 320 nm). Esse dado corrobora com a afirmação anterior de que o deslocamento de absorção em direção à região UV-A com a adição de grupos hidroxila pode ser explicado pelo aumento de elétrons π no sistema conjugado, bem como de elétrons não ligados, que são mais facilmente excitados por fótons de menor energia (GOMES *et al.*, 2019). No entanto, o ácido caféico, apesar de apresentar duas hidroxilas, não demonstrou uma intensidade de absorção maior em relação ao ácido cumárico. Isso pode ser devido à perda de aromaticidade dos benzenos dissubstituídos quando comparados aos respectivos monossubstituídos. Dessa forma, a primeira substituição perturba a distribuição de elétrons, diminuindo a simetria do sistema. Conseqüentemente, pode diminuir a deslocalização eletrônica e, portanto, a aromaticidade. As posições *meta* e *para* não têm a mesma simetria. Enquanto a substituição na posição *meta* cria um ângulo de aproximadamente 120 graus, a substituição em *para* forma um ângulo de 180 graus, dando origem a diferentes sistemas. Nesse sentido, a dissubstituição tem a capacidade de diminuir ainda mais a aromaticidade (DEY *et al.*, 2019).

O ácido clorogênico é um éster formado a partir de uma reação de esterificação entre o ácido transcinâmico (ou *p*-cumárico, ferúlico e caféico) com o ácido quínico e, portanto, difere do ácido caféico na presença do grupo quínico. É possível observar que a presença do ácido quínico não interfere significativamente na faixa de absorção do ácido clorogênico, em comparação ao ácido caféico, uma vez que apresentam picos de absorção próximos. Porém, percebeu-se uma grande diferença entre a força do oscilador, que é um pouco maior que 0,15 no ácido clorogênico e um pouco mais que 0,45 no ácido caféico. Então, com base nos resultados, é possível afirmar que a presença de ácido quínico diminui significativamente a intensidade de absorção. O ácido quínico é uma estrutura cíclica sem ligações duplas conjugadas e isso afeta o efeito mesomérico da molécula, aumentando a energia necessária para a excitação, devido ao aumento do Ebg. Isso pode ser confirmado pela análise dos valores de Ebg

entre o ácido caféico e o ácido clorogênico que são 4,137 e 4,381, respectivamente. Além disso, a partir da análise dos orbitais moleculares envolvidos na absorção do ácido clorogênico é possível perceber a ausência ou menor participação de densidade eletrônica do ácido quínico, o que indica a falta de participação desse grupo na absorção de UV. Isso explica o fato de o ácido clorogênico ser o composto com menor força do oscilador entre os ácidos fenólicos estudados.

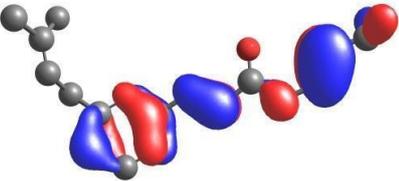
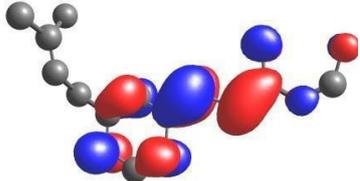
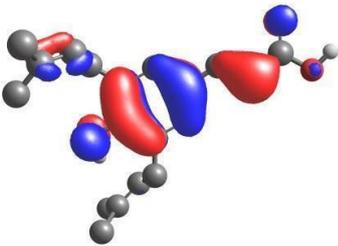
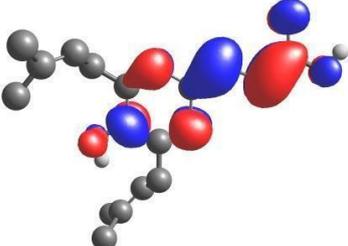
O ácido ferúlico possui um grupo metoxi (alcoxi) na posição *meta* do anel fenólico. Quando as propriedades do ácido ferúlico são comparadas às do ácido cumárico, que possui este grupo ausente, pode-se observar uma diminuição significativa na força do oscilador. Porém, há um deslocamento do pico máximo de absorção para a faixa UV-A (λ 325 nm), ou seja, a adição de um grupo doador de elétrons facilita a transição eletrônica da molécula. O ácido ferúlico apresenta o menor E_{bg} entre os ácidos fenólicos estudados, com valor de 4,109, conseqüentemente, apresenta o maior desvio para o vermelho. O grupo alcóxi exibe um efeito indutivo de retirada de elétrons (EXNER *et al.*, 2006; BOHM *et al.*, 2006) devido à eletronegatividade mais forte do oxigênio do que do carbono, bem como um efeito de doação de elétrons de ressonância (JAMES *et al.*, 2006) devido aos elétrons do par solitário de oxigênio. No entanto, o grupo alcóxi atua como um grupo doador de elétrons, uma vez que o efeito doador de elétrons é majoritário (HUANG *et al.*, 2012).

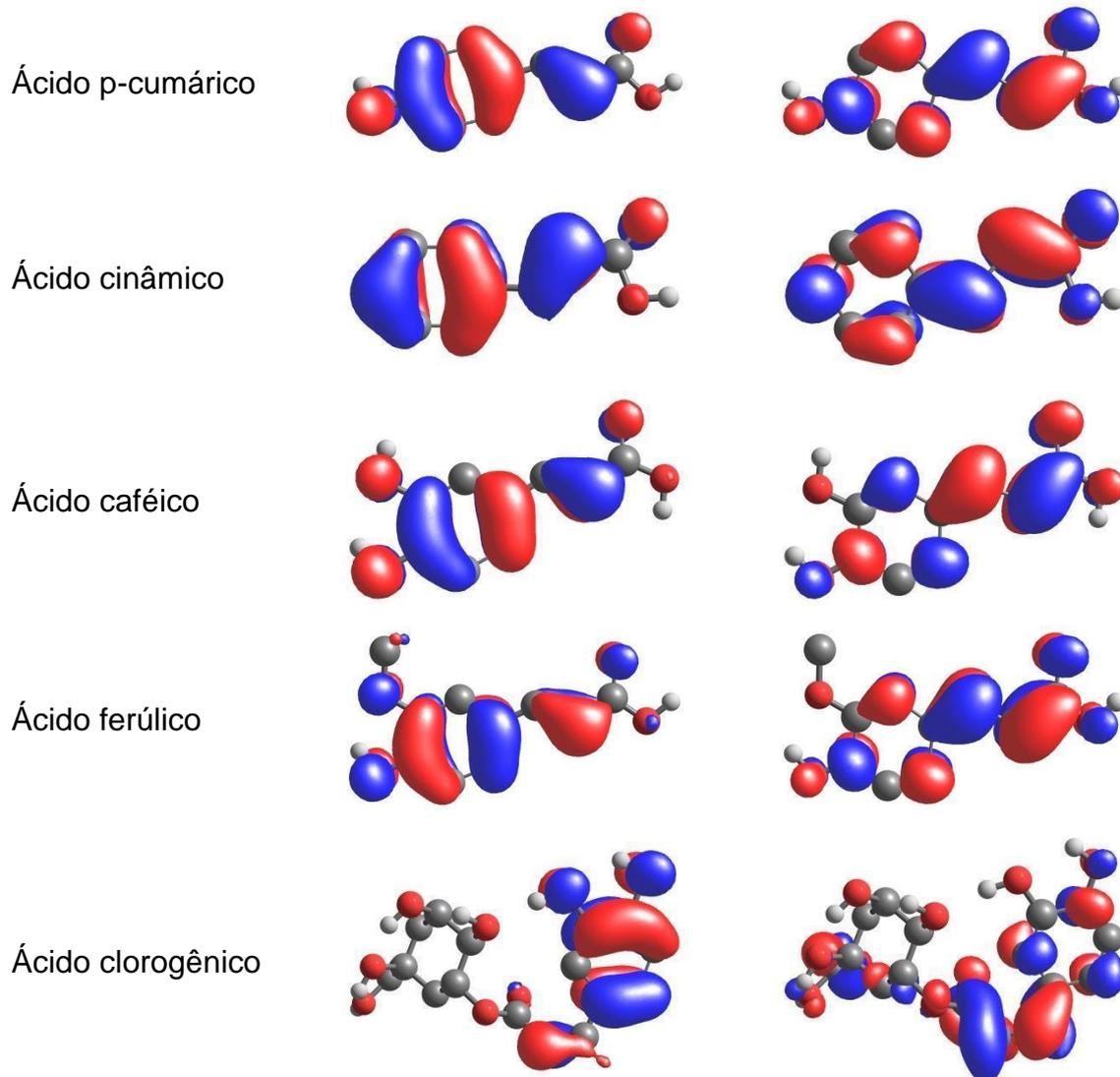
A artepilina C, considerada o marcador químico da espécie, apresenta dissstituições nas posições *meta* do anel fenólico e uma hidroxilação na posição *para*. Este composto possui dois grupos alquil, que pouco participam da absorção de UV, como pode ser visto nos orbitais moleculares envolvidos na absorção deste composto (**Tabela 10**). Isso pode acontecer porque esses grupos não contribuem significativamente para o efeito mesomérico. Existem poucas densidades eletrônicas nessas cadeias carbônicas, portanto, espera-se que a força do oscilador da artepilina C seja menor em comparação com os outros compostos, com exceção do ácido clorogênico. Essa dissstituição também resultou em deslocamento hipsocrômico e diminuição da força do oscilador, conforme observado em qualquer substituição *para*. No entanto, a metoxilação, no caso do ácido ferúlico, apresentou a maior influência no desvio para o vermelho e diminuição do E_{bg}. A monossstituição em *para* demonstrou aumentar a intensidade de absorção, como no caso do ácido cumárico.

Pela primeira vez, foram obtidas as propriedades do estado de excitação do 3-prenilcinamato de alila. Este ácido fenólico possui um grupo prenil na posição *meta* do anel e um grupo éster ligado a um radical alila. Pelos orbitais moleculares, é possível observar que o grupo alila não participa da absorção principal dessa molécula. No entanto, o restante da molécula participa e dá a ela absorção na faixa de UV-B em aproximadamente λ 317 nm. Além disso, o 3-prenilcinamato de alila tem a segunda maior força oscilante, atrás apenas do ácido cumárico. Isso pode ser devido à presença do radical alila, uma vez que o ácido clorogênico também é esterificado, mas como o ácido quínico não participa da absorção, esse composto apresentou a menor intensidade de absorção entre os ácidos estudados.

A substituição em *meta* diminui a força do oscilador e desloca a absorção principal para a região vermelha. Enquanto isso, a substituição em *para* aumenta a conjugação efetiva, levando a um grande deslocamento de elétrons e a um Ebg mais estreito. Essa posição aumenta a capacidade de doação de elétrons (LIU *et al.*, 2015; JIAO *et al.*, 2018). Não há diferenças entre a hidroxilação e a metoxilação na posição *meta*, uma vez que as propriedades dos ácidos ferúlico e caféico são semelhantes, incluindo seus valores de Ebg.

Tabela 10 - Energia de fronteira do orbital molecular e mapa de isodensidade de ácidos fenólicos: 3-prenilcinamato de alila, artepilina C, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido clorogênico.

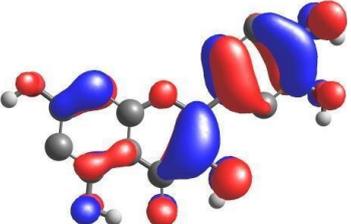
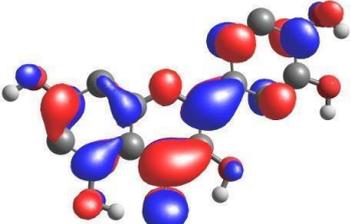
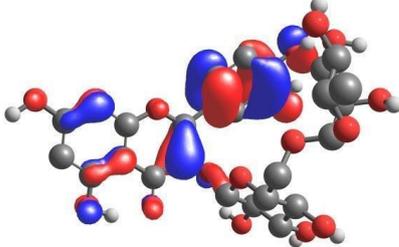
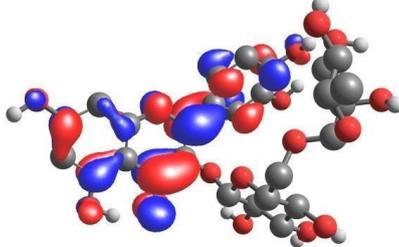
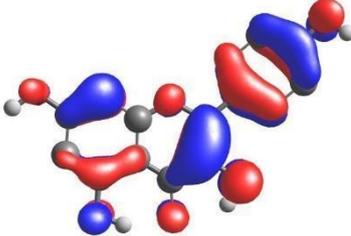
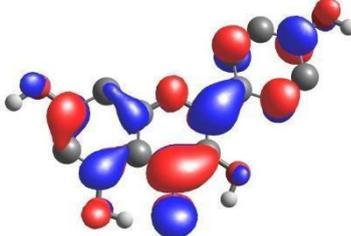
Ácidos fenólicos	HOMO	LUMO
3-prenilcinamato de alila		
Artepilina C		



Em relação aos flavonóis, a quercetina e o canferol diferem pela quantidade de grupos hidroxila no anel B. A quercetina exibe um catecol no anel B, enquanto o canferol não. Ao aumentar o número de grupos OH no anel B dos flavonóis, o pico de absorção é sistematicamente desviado para o vermelho (HARBORNE *et al.*, 1975; ANOUAR *et al.*, 2009), como também observado nos resultados, o pico máximo de absorção obtido para quercetina foi em λ 375 nm e 370 nm para canferol. É possível observar um aumento na intensidade de absorção na presença do grupo catecol. Isso sugere que o efeito mesomérico do grupo hidroxila estende a *p-conjugação* nos orbitais de fronteira e induz um deslocamento batocrômico, bem como um aumento da intensidade da banda de absorção principal e uma diminuição no E_{bg} (ANOUAR *et al.*, 2009)

A rutina tem um grupo rutinasídeo no grupo 3-OH do anel C. A glicosilação induz um deslocamento hipsocrômico do pico de absorção principal. Isso pode ser atribuído a uma diminuição do efeito mesomérico e, conseqüentemente, do Ebg, uma vez que a rutina apresenta um valor de 4.000 e a quercetina, 3.646. Os resultados evidenciam a ausência de participação do grupo glicosilado na absorção UV da rutina, o que pode ser observado por meio da análise dos orbitais moleculares desta molécula. Em comparação com o canferol, a rutina apresentou uma diminuição na força do oscilador, o que sugere que a glicosilação influenciou a absorção mais do que o grupo catecol (**Tabela 10 e 11**).

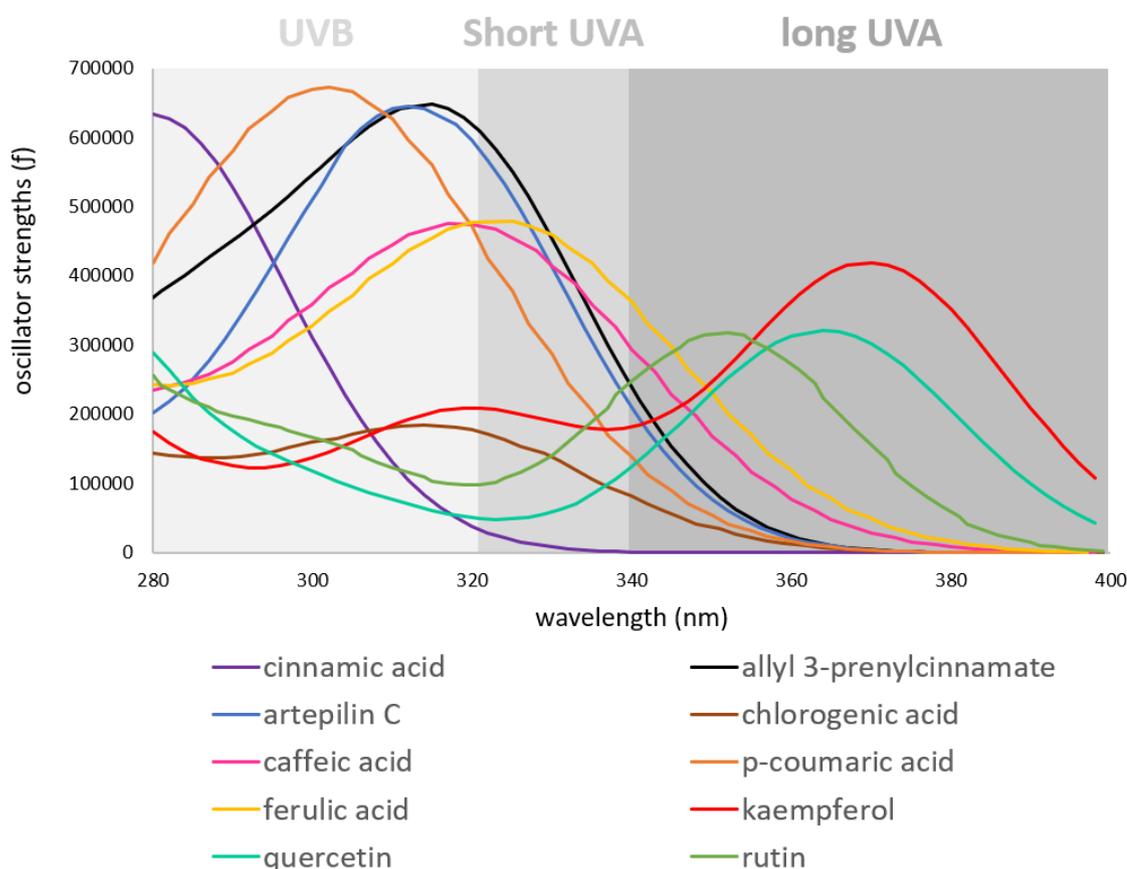
Tabela 11 - Energia do orbital de fronteira molecular e mapa de isodensidade de flavonoides quercetina, rutina, canferol.

Flavonoides	HOMO	LUMO
Quercetina		
Rutina		
Canferol		

A **Tabela 11** resume o espectro de absorção de UV teórico de alguns flavonoides presentes em *B. dracunculifolia* segundo a literatura e que foram usados

para cálculos. A partir da análise *in silico*, os compostos apresentaram absorção de UV nas faixas desejadas para fotoproteção. É possível observar que os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cinâmico, ferúlico e caféico, alila 3-prenilcinamato, artepilina C e p-cumárico) exibem uma absorção máxima na faixa de UV-B ou UV-A I, enquanto os flavonoides (canferol, quercetina e rutina) apresentam dois picos, um na banda de UV-B e outro, mais intenso, em UV-A II. A combinação de ácidos fenólicos e flavonoides fornece uma absorção de amplo espectro.

Figura 18 - Superposição do espectro de absorção UV das substâncias presentes em *B. dracunculifolia*, mostrando um amplo espectro de proteção na faixa ultravioleta (UV-B, UV-A I e UV-A II).



Fonte: Imagem cedida por Caroline Almeida Accioli.

5.9 Avaliação da atividade antioxidante *in silico*

5.9.1 Cálculo dos parâmetros antioxidantes *in silico*

Com o objetivo de confirmar a atividade antioxidante demonstrada pelos métodos *in vitro*, realizou-se a análise *in silico* de alguns constituintes relatados na literatura como marcadores químicos da *B. dracunculifolia*, para se elucidar o mecanismo de ação. As estruturas otimizadas (**Tabela 10 e 11**) dos ácidos fenólicos e flavonoides foram usadas para calcular os parâmetros antioxidantes com base na reatividade global e parâmetros orbitais moleculares de fronteira calculados no nível B3LYP / 6-31G * na fase gasosa. Os dados foram resumidos na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Parâmetros antioxidantes dos ácidos fenólicos e flavonoides de *B. dracunculifolia* obtidos por cálculos teóricos (eV).

Composto	-ε HOMO	-ε LUMO	Ebg	μ	η	S	IP
Ácidos fenólicos							
3-prenilcinamato de alila	-6,040	-1,659	4,381	-3,850	2,191	0,457	6,040
Artepilina C	-5,578	-1,360	4,218	-3,469	2,109	0,474	5,578
Ácido p- cumárico	-5,877	-1,523	4,354	-3,700	2,177	0,459	5,877
Ácido cinâmico	-6,421	-1,714	4,707	-4,068	2,354	0,425	6,421
Ácido caféico	-5,796	-1,659	4,137	-3,728	2,069	0,483	5,796
Ácido ferúlico	-5,605	-1,496	4,109	-3,551	2,055	0,487	5,605
Ácido clorogênico	-5,115	-0,734	4,381	-2,925	2,191	0,457	5,115
Flavonoides							
Canferol	-5,442	-1,714	3,728	-3,578	1,864	0,536	5,442
Quercetina	-5,387	-1,741	3,646	-3,564	1,823	0,549	5,387
Rutina	-5,578	-1,578	4,000	-3,578	2,000	0,500	5,578

O ácido ferúlico e a quercetina apresentaram os menores gaps ($E_{bg} = 4,109$ e $3,646$ eV, respectivamente), sugerindo maior atividade antioxidante, entre os compostos estudados. Por outro lado, as moléculas com os maiores valores de E_{bg} , 3-prenilcinamato de alila e ácido clorogênico ($4,381$ eV) e apigenina ($4,272$ eV), teriam a menor atividade antioxidante.

Artepillina C apresenta diss substituições nas posições *meta* do anel fenólico e uma hidroxilação na posição *para*. Este composto possui dois grupos alquil, que pouco participam da absorção de UV, como pode ser visto nos orbitais moleculares envolvidos na absorção deste composto (**Tabela 10**). Isso pode acontecer porque esses grupos não contribuem significativamente para o efeito mesomérico. Existe pouca densidade eletrônica nessas cadeias carbônicas, portanto, espera-se que a força do oscilador da artepillina C seja menor em comparação com os outros compostos, com exceção do ácido clorogênico. Essa diss substituição também resultou em deslocamento hipsocrômico e diminuição da força do oscilador, conforme observado em qualquer substituição *para*. No entanto, a metoxilação, no caso do ácido ferúlico, apresentou a maior influência no desvio para o vermelho e diminuição do E_{bg} . A monoss substituição em *para* demonstrou aumentar a intensidade de absorção, como no caso do ácido cumárico.

De acordo com o teorema de Koopman (1934), o potencial de ionização (IP) é obtido multiplicando a energia orbital molecular de mais alta energia ($-\epsilon_{HOMO}$) por -1 . O IP reflete a energia necessária para remover um elétron de um átomo, e a abstração eletrônica é um dos principais mecanismos antioxidantes. Assim, um baixo valor de IP indica uma molécula antioxidante boa (BARZEGAR *et al.*, 2012). O ácido clorogênico exibe o menor IP ($5,115$ eV) entre os arilpropanóides, enquanto a quercetina apresenta o menor entre os flavonóides ($5,387$ eV). Isso significa que essas duas moléculas têm maior capacidade doadora de elétrons entre os compostos analisados do extrato de *B. dracunculifolia*.

Em relação aos demais parâmetros eletrônicos avaliados, o potencial químico (μ) reflete a propensão de um elétron escapar de um determinado campo (PARR *et al.*, 1983; PEARSON *et al.*, 1983): a dureza (η) mede a resistência da densidade eletrônica às modificações (PARR *et al.*, 1978.; DONNELLY *et al.*, 1978; PALKE *et al.*, 1978) e suavidade (S) é uma medida da capacidade de um átomo de receber

elétrons e inversamente proporcional à dureza química (AL-MAJEDY *et al.*, 2016; PARR, 1980; RAJAN; MURALEEDHARAN, 2017). Assim, quanto maiores os valores de μ e S e quanto menor o valor de η , mais fácil é a perda de elétrons, atribuindo maior reatividade e melhor atividade antioxidante. O ácido ferúlico apresentou o menor η (-2,925 eV), o maior S (0,487 eV), enquanto o ácido clorogênico exibiu o maior μ (2,055 eV). O ácido cinâmico apresentou os valores mais desfavoráveis para esses dois parâmetros, o menor μ (-4,068 eV) e o maior η (2,354 eV). Em relação aos flavonoides, a quercetina apresentou o melhor resultado em ambos os parâmetros, apresentando o menor valor de η (1,823 eV), e também os maiores μ (-3,564 eV) e S (0,549 eV).

Em resumo, a análise desses resultados indica que o ácido ferúlico seria o antioxidante mais eficiente entre os arilpropanoides, apresentando os menores valores de Ebg, η e S. A substituição do grupo 3-hidroxila do ácido caféico por um grupo metoxi (ácido ferúlico) aumenta consideravelmente a eficácia antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Grupos doadores de elétrons, como hidroxila e metoxi, podem aumentar a densidade de nuvem de elétrons do anel de benzeno, diminuir a energia de dissociação da ligação hidroxila fenólica e, em seguida, aumentar sua capacidade de eliminação de radicais livres (CHEN *et al.*, 2020).

Em relação aos flavonoides, a quercetina apresentou os resultados mais promissores para uma maior atividade antioxidante: os menores valores de Ebg, η e IP e também os maiores valores de μ e S, sugerindo sua maior reatividade. A presença do catecol, com os dois substituintes hidroxila no anel B da quercetina, permite uma maior deslocalização dos elétrons, produzindo um radical orto-semiquinona estável, o que leva a uma melhor atividade antioxidante. Os compostos sem o grupo catecol formam espécies relativamente instáveis, sendo antioxidantes fracos (DI MAJO *et al.*, 2005). No entanto, apesar de apresentar um grupo catecol, os descritores de rutina indicaram seu menor potencial antioxidante dentro dos compostos analisados. A glicosilação dos flavonoides reduz sua atividade quando comparada às agliconas correspondentes, pois a eficácia máxima para eliminação de radicais aparentemente requer o grupo 3-OH ligado à ligação dupla 2,3 e adjacente ao 4-carbonil no anel C (SHAHIDI *et al.*, 1992). Um dos motivos para isso pode estar relacionado à planaridade do núcleo flavônico. Como pode ser visto na **Tabela 10**, os anéis benzopirona e fenil não são planos na rutina devido ao grupo açúcar no anel C.

Diferentes ângulos diédricos A-B levam à perda de graus coplanares de conformação de flavonoides, podendo enfraquecer a atividade antioxidante (CAI *et al.*, 2014).

A ação antioxidante é determinada não apenas por sua capacidade de doar um elétron para uma espécie oxidante, mas também pela acessibilidade a esta e aos mecanismos de transferência de elétrons. Assim, como os testes experimentais envolvem o uso de solventes, pode haver influência na atividade antioxidante, possivelmente divergindo dos dados teóricos, calculados no vácuo (DECKER *et al.*, 2005).

O extrato otimizado de *B. dracunculifolia* apresentou ação antioxidante *in vitro*, o que pode ser explicado pela constituição química, rica em arilpropanoides e flavonoides, que atuam em sinergia para neutralizar os radicais livres por mecanismos múltiplos. Supõe-se que devido à sazonalidade, foram relatadas na análise por ESI-QTOF-MS substâncias derivadas indicadas na **Tabela 8** dos marcadores químicos tradicionais relatados na literatura, que foram identificados na análise preliminar por CLAE. Isto pode ser explicado pela influência de fatores na produção de metabólitos secundários, como descrito pelo grupo de Gobbo-Neto *et al.* (2007). Neste trabalho, os autores relacionam a exposição à radiação UV, poluição, disponibilidade de macro e micronutrientes, altitude, além de estímulos mecânicos e a ataque de patógenos, como interferentes diretos.

5.10 Avaliação do potencial fotoprotetor e mutagênico do extrato de *B. dracunculifolia* em *Saccharomyces cerevisiae*

A absorção da radiação UV-B pode ser responsável pela formação de danos no DNA celular, com a formação de dímeros de pirimidina, gerando assim potencial mutagênico e citotóxico (HOSSY *et al.*, 2012). Assim foi avaliado o potencial mutagênico e citotóxico do extrato de *B. dracunculifolia* (extrato G) na ausência ou não de irradiação com luz solar simulada em modelo com *Saccharomyces cerevisiae*. Neste modelo é possível comparar os efeitos fotoprotetor e antimutagênico de amostras frente a exposição à radiação solar.

5.10.1 Avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* na ausência de irradiação com LSS

O extrato etanólico de *B. dracunculifolia* não apresentou citotoxicidade e mutagenicidade para a cepa AWP001 (*yno1*) na ausência de irradiação UV, ou seja, não induziu a perda de viabilidade nem o aumento do número de mutantes Can^R quando comparado com a cepa não tratada com o extrato ($p > 0,05$).

Dessa forma, os dados preliminares apontam que o extrato possui potencial para aplicação tópica visto que demonstrou não estimular reações químicas danosas ao material genético, DNA, ou ainda, morte celular.

5.10.2 Avaliação do potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* na presença de irradiação com LSS

Com a finalidade de se confirmar o potencial do extrato estudado e dos resultados obtidos pelos métodos espectrofométricos *in vitro* e computacionais *in silico* em relação ao potencial fotoprotetor e multifuncional (antifotomutagênico) do extrato otimizado de *B. dracunculifolia*, foi realizado o teste com a cepa de *S. cerevisiae* na presença de irradiação com luz solar simulada.

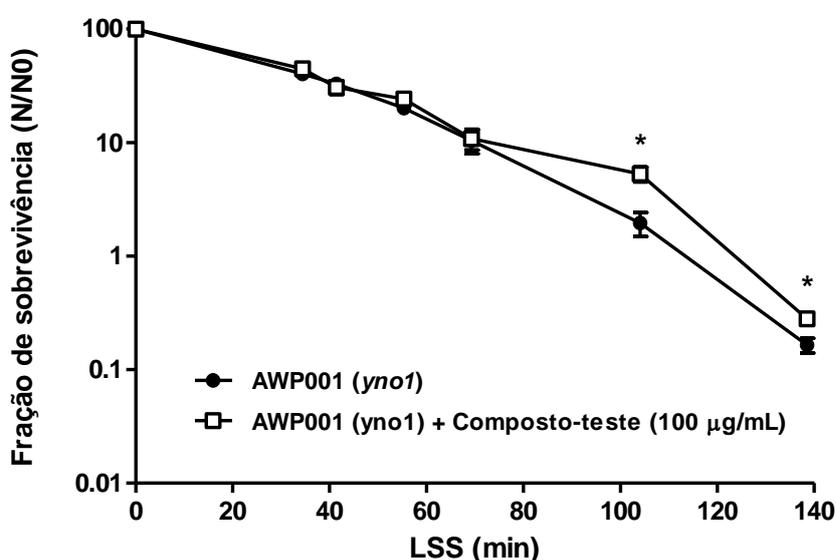
O potencial fotoprotetor do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* foi avaliado em termos do perfil de sobrevivência produzido na cepa AWP001 (*yno1*) irradiada com LSS em comparação com a cepa não tratada. Por sua vez, o potencial foto/antifotomutagênico do extrato analisado foi avaliado em termos da frequência de mutagênese Can^R produzida na cepa AWP001 (*yno1*) irradiada com LSS em comparação com a cepa não tratada.

A sobrevivência e a mutagênese Can^R da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com LSS na presença de 100 µg/mL do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* e na ausência estão representadas nas **Figuras 19 e 20**, respectivamente.

De acordo com o gráfico da **Figura 19**, é possível observar que em tempos de exposição inferiores a aproximadamente 70 minutos, o tratamento com o extrato analisado não conferiu fotoproteção à cepa AWP001 (*yno1*), uma vez que a sobrevivência da cepa não tratada e da cepa tratada não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Entretanto, em doses acumuladas de UV-A e UV-B superiores, ou seja, após 100 minutos de exposição aproximadamente, o extrato etanólico de *B.*

dracunculifolia foi capaz de proteger a cepa AWP001 (*yno1*) de lesões citotóxicas de caráter oxidativo induzidas pela LSS ($p < 0,05$), indicando seu potencial fotoprotetor em situações de exposição de longa duração, nas quais, os sistemas de reparo genéticos tendem a não serem suficientes para gerir as lesões fotoinduzidas.

Figura 19 - Sobrevivência da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) na presença e ausência de tratamento com o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G).

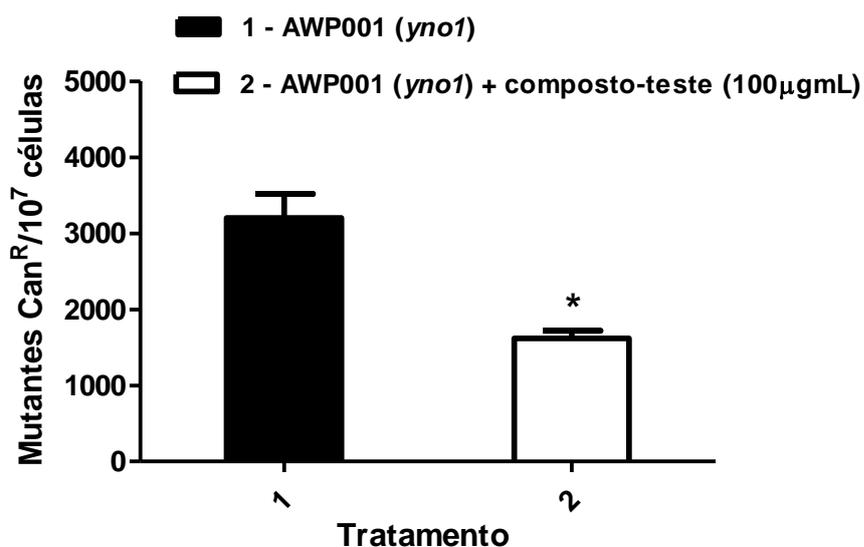


Nota: A fração de sobrevivência (N/N0) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com luz solar simulada (LSS) na presença e na ausência de 100 µg/mL do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G). Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo quatro experimentos independentes. * estatisticamente diferentes do controle (AWP001(*yno1*)) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Com relação à mutagênese induzida pela LSS na presença e na ausência do extrato de *B. dracunculifolia*, podemos observar, de acordo com o gráfico representado na **Figura 20**, que o extrato protegeu a cepa AWP001 (*yno1*) de lesões mutagênicas de caráter oxidativo induzidas pela LSS, uma vez que o número de mutantes Can^R da cepa tratada foi menor que o da cepa não tratada (controle) ($p <$

0,05). Isso indica que o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* apresentou potencial antifotomutagênico para o modelo de *S. cerevisiae*.

Figura 20- Mutagênese na DL₃₇ da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) na presença e ausência de tratamento com o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (amostra G).



Nota: Mutagênese (Can^R/10⁷ células) na dose letal 37% (DL₃₇) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com LSS na presença e na ausência de 100µg/mL do extrato de *B. dracunculifolia* analisado. Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo quatro experimentos independentes. Mutagênese espontânea da cepa AWP001 (*yno1*) foi 7 ± 1. * estatisticamente diferente do controle (AWP001 (*yno1*)) (p<0,05) – teste não-paramétrico Mann-Whitney. Fonte: Cedido por Raiane Rosalez Diniz (2021).

O grupo de Rodrigues *et al.* (2009) avaliou os efeitos mutagênicos e genotóxicos de altas concentrações do extrato aquoso de *B. dracunculifolia* em modelo animal. Os resultados confirmam que a composição química encontrada na espécie exerce ação quimioprotetora em baixas concentrações, protegendo assim os danos aos cromossomos. A dose máxima permitida, de acordo com o protocolo foi 100µg/mL, porém esta apresentou efeitos mutagênicos, resultado semelhante ao que é descrito para a própolis.

O potencial antimutagênico e antigenotóxico do extrato etanólico 70%, obtido por maceração, de *B. dracunculifolia* foi avaliado também na linhagem celular de carcinoma hepatocelular (HTC). O tratamento com o extrato foi capaz de reduzir o dano ao DNA, protegendo a célula da clastogenicidade induzida pelo controle positivo (metanossulfonato de metila) utilizado e não demonstrou potencial genotóxico ou mutagênico na concentração avaliada (0,06 µg/mL). O efeito protetor está relacionado à composição química, rica em flavonoides e arilpropanoides, que neutralizam os radicais livres antes que esses possam gerar danos ao material genético (ROBERTO *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram encontrados na linhagem celular de fibroblastos V79, corroborando a ação quimioprotetora do extrato, que preveniu a alquilação promovida (MUNARI *et al.*, 2010) e pelo extrato de *B. dracunculifolia* (TAVARES *et al.*, 2006). Perfis fotoprotetores e antifotomutagênicos semelhantes foram observados para a oleuropeína, ativo com propriedade antioxidante natural extraído de folhas de oliveira (SILVA *et al.*, 2019).

6. CONCLUSÃO

O processo de obtenção de extratos ricos em substâncias fenólicas das folhas apicais de *B. dracunculifolia* foi realizado a partir do planejamento experimental, resultando em maiores rendimentos das amostras obtidas por refluxo em etanol puro e em maiores temperaturas.

As atividades antioxidantes e fotoprotetoras, *in vitro*, foram analisadas em todos os extratos para seleção da amostra com a melhor combinação das atividades avaliadas. Para a confirmação desta seleção, a análise quimiométrica de componente principal foi empregada. A amostra G apresentou alta capacidade antioxidante, alto FPS, sendo assim selecionada como extrato otimizado. Os resultados indicaram que o extrato apresentou ação potencial para a neutralização de radicais livres e absorção no espectro UV devido à presença principal de flavonoides e arilpropanoides.

A composição química da amostra G selecionada foi avaliada por CLAE-DAD e ESI-QTOF-LC-MS para identificação das substâncias presentes: apigenina, derivados do ácido cafeoilquínico, derivados do ácido hidroxicinâmico, naringerina, diosmetina, isosacuranetina, canferídeo, dihidrocanferídeos, dihidrocanferol, artepilina C, baccarina e drupanina. A combinação dessas substâncias fenólicas possui absorção conhecida no espectro solar e pode estar correlacionada com a ação fotoprotetora, portanto, encontrada no extrato otimizado.

O estudo *in silico* teórico dos compostos de *B. dracunculifolia* mostrou que os fenólicos analisados (arilpropanoides e flavonoides) apresentam máxima absorção em diferentes faixas do espectro ultravioleta e agem em sinergia, promovendo uma fotoproteção de amplo espectro (UVA e UVB), em condições de exposição cumulativa, semelhante ao que ocorre na pele humana em condições naturais. Esses resultados corroboram os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*.

O conjunto de resultados permitiu observar que o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* apresentou ao mesmo tempo potencial fotoprotetor e antifotomutagênico frente à LSS, que pode ser explicada pela ativação de sinais pró-sobrevivência pelos ácidos fenólicos e modulação do sistema oxidativo realizada pelos flavonoides. Além disso, a utilização de uma cepa com potencial bioindicador

de eventos fotobiológicos de caráter oxidativo, como a cepa AWP001 (*yno1*) utilizada, permitiu, ainda, corroborar a propriedade antioxidante do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*, que se mostrou particularmente relevante na proteção contra lesões citotóxicas e também mutagênicas induzidas pela exposição à radiação UV, indicando seu uso promissor em formulações fotoprotetoras multifuncionais.

Dessa forma, conclui-se que o extrato otimizado de *B. dracunculifolia* possui composição química única, rica em substâncias fenólicas, e apresenta uso promissor, de acordo com os estudos *in vitro* e *in silico* apresentados, para utilização em formulações tópicas com a finalidade fotoprotetora e antioxidante. O extrato otimizado apresentou, ainda, ação antimutagênica e protetora contra lesões citotóxicas, corroborando com o presente trabalho. Mais estudos são necessários para a avaliação de condições ótimas das formulações contendo o extrato analisado.

REFERENCIAS

- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ANOUAR, E. *et al.* Free radical scavenging properties of guaiacol oligomers: A combined experimental and quantum study of the guaiacyl-moiety role. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 50, p. 13881-13891, 2009.
- BACHIEGA, T. F. *et al.* Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1646-1650, 2013.
- BADEA, G. *et al.* Naringenin improves the sunscreen performance of vegetable nanocarriers. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 480-492, 2017.
- BARZEGAR, A. The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1369-1376, 2012.
- BELO, S. *et al.* Photoprotective effects of topical formulations containing a combination of *Ginkgo biloba* and green tea extracts. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1854-1860, 2011.
- BODE, B. M.; Gordon, M. S. MacMolPlt: a graphical user interface for GAMESS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 16, n. 3, p. 133-138, 1998.
- BONIN, E. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **LWT**, v. 120, p. 108920, 2020.
- BOO, Y. C. p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 275, 2019.
- BRANDENBURG, M. M. *et al.* *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 112840, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 237/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 30/2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.
- BROWN, R. V. S. *et al.* Mortalidade por melanoma maligno da pele em idosos do Brasil: 2001 a 2016. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 1, p. 34-39, 2021.
- BUDEL, J. M. *et al.* O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I-Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 268-271, 2005.
- BUDEL, J. M. *et al.* Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.
- CAI, W. *et al.* Characterization and density functional theory study of the antioxidant activity of quercetin and its sugar-containing analogues. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 1, p. 121-128, 2014.
- CANCELLI, R. R. *et al.* Catálogo palinológico de táxons da família Asteraceae Martinov, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 65, n. 2, p. 201-280, 2010.

CANCELLI, R. R. *et al.* Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul-Parte I. **Pesquisas**, Série Botânica, v. 58, p. 347-374, 2007.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interference from extracts of *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, on the activity of antibiotics used in the clinic. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

CASAGRANDE, M. *et al.* Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 207-219, 2018.

CEFALI, L. C. *et al.* Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 4, p. 346-353, 2016.

CEFALI, L. C. *et al.* Flavonoid-enriched plant-extract-loaded emulsion: a novel phytocosmetic sunscreen formulation with antioxidant properties. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 443, 2019.

CHANG, R. *et al.* Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 549-556, 2008.

CHE, D. N. *et al.* Protective effects of grape stem extract against UVB-induced damage in C57BL mice skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 551-559, 2017.

CHEN, J. *et al.* Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

CHIU, H.-F. *et al.* Chemopreventive and Chemotherapeutic Effect of Propolis and Its Constituents: A Mini-review. **Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 2, p. 70, 2020.

CHOQUENET, B. *et al.* Flavonoids and polyphenols, molecular families with sunscreen potential: determining effectiveness with an in vitro method. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 2, p. 1934578X0900400212, 2009.

CHOQUENET, B. *et al.* Interest of ferulic acid ethyl ester in photoprotective creams: Measure of efficacy by in vitro method. **Natural Product Research**, v. 22, n. 16, p. 1467-1471, 2008.

CHOQUENET, B. *et al.* Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1117-1118, 2008.

CHOWDHURY, A. *et al.* Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; Implications to improve skin health. **Journal of Dermatological Science**, v. 102, n. 2, p. 94-100, 2021.

CIAŻYŃSKA, M. *et al.* The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

CISSE, L. *et al.* Quantitative study of the substituent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of coumarins. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 33, n. 2, p. e4014, 2020.

CLIFFORD, M. N. *et al.* Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CORRÊA, B. A. *et al.* Molecular modeling studies of the structural, electronic, and UV absorption properties of benzophenone derivatives. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 116, n. 45, p. 10927-10933, 2012.

COSTA, Elisabete Apolinário da. **Pharmacological potential of *Baccharis dracunculifolia* in the treatment of osteoarthritis**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas) – Escola de Ciências, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2017.

COSTA, P. *et al.* Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **Biofactors**, v. 45, n. 3, p. 479-489, 2019.

COUTEAU, C. *et al.* Photoprotective activity of propolis. **Natural Product Research**, v. 22, n. 3, p. 264-268, 2008.

CROTTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

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**, [S. l.], v. 193, p. 162–171, 2019.

DAMBROS FILHO, E. *et al.* Estudo comparativo da atividade antimicrobiana in vitro de extratos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC, contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 5830-5848, 2021.

DANET, Andrei Florin. Recent Advances in Antioxidant Capacity Assays. *In*: WAISUNDARA, V. **Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action**. 2021 Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/recent-advances-in-antioxidant-capacity-assays> .

DAVINELLI, S. *et al.* Cytoprotective polyphenols against chronological skin aging and cutaneous photodamage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 2, p. 99-105, 2018.

DE FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. *et al.* Incorporation of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) leaf extract into phosphatidylcholine-cholesterol liposomes improves its anti-inflammatory effect *in vivo*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2521-2525, 2019.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DE SOUSA, J. P. *et al.* A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemical Analysis**. v. 20, n. 1, p. 24-32, 2009.

DE SOUSA, J. P. B. *et al.* Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

DE SOUZA, F. P. *et al.* Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L.–Acerola. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 34, n. 1, 2013.

DE LIMA, D. R. F. *et al.* Avaliação das propriedades e potencialidades da própolis verde e sua fonte botânica *Baccharis dracunculifolia*. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 10, n. 2, p. 93-110, 2019.

DE FUNARI, C. S. *et al.* Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC.(Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 206-212, 2007.

DECKER, E. A. *et al.* Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4303-4310, 2005.

DEY, S. *et al.* Substituent effects on the aromaticity of benzene—An approach based on interaction coordinates. **The Journal of Chemical Physics**, v. 150, n. 21, p. 214108, 2019.

DI MAJO, D. *et al.* Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships. **Food Research International** v. 38, n. 10, p. 1161-1166, 2005.

DIEPGEN, T. L.; MAHLER, V. The epidemiology of skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 146, p. 1-6, 2002.

DINIZ, R. R. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strains as bioindicators for titanium dioxide sunscreen photoprotective and photomutagenic assessment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 198, p. 111584, 2019.

DONGLIKAR, M. M.; DEORE, S. L. Sunscreens: A review. **Pharmacognosy Journals**, v. 8, n. 3, 2016.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUTRA, E. A. *et al.* Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 381-385, 2004.

ECKARDT, F.; HAYNES, H. R. 1980. Quantitative measures of mutagenicity and mutability based on mutant yield data. **Mutation Research**, v. 74, p. 439-458, 1980.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. *et al.* Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. **Annals of Botany**, v. 91, n. 1, p. 13-19, 2003.

EXNER, O.; BÖHM, S. Inductive effect of uncharged groups: dependence on electronegativity. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 393-401, 2006.

FARMACOPEIA brasileira. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019. v. 1. E-book. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1>. Acesso em: 15 de julho de 2020

FARMACOPEIA brasileira. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019. v. 2. E-book. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1>. Acesso em: 15 de julho de 2020

FERNANDES, A. S. *et al.* Photoprotective and toxicological activities of extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 38-43, 2015.

FERRARI, M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factor (SPF) of emulsions with andiroba oil (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 626-630, 2007.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2015 493p.

FERRONATTO, R. *et al.* Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. *et al.* *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1829-1845, 2017.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. *et al.* Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FONTANILLAS, P. *et al.* Disease risk scores for skin cancers. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2021.

GIERSCHNER, J. L. D.; TROUILLAS, P. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. **Food Chemistry**, v. 131, p. 79-89, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, J. V. T. *et al.* Molecular modeling as a design tool for sunscreen candidates: a case study of bemotrizinol. **Journal of Molecular Modeling**, v. 25, n. 12, p. 362, 2019.

GUIMARÃES, N. S. S. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 1091-1097, 2012.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview." **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1980**. Springer US, 2013

HASSAN, I. *et al.* Sunscreens and antioxidants as photo-protective Measures: An update. **Our Dermatology Online**, v. 4, n. 3, p. 369, 2013.

HASSANZADEH, K. *et al.* The role of structural CH compared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropein and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: a DFT study. **Food Chemistry**, v. 164, p. 251-258, 2014.

HAYNES, H. R.; ECKARDT, F. Analysis of dose-response patterns in mutation research. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 21, n. 3, p. 277-302, 1979.

HE, H. *et al.* Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). **Biomedicine & Pharmacotherapy= Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 134, p. 111161-111161, 2020.

HEINZMANN, B. M. *et al.* Óleos Voláteis. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

HENRIQUES, B. O. *et al.* In vitro TNF-inhibitory activity of brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

HORAI, H. *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry: JMS**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.

HOSSY, B. H. *et al.* Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An *in vivo* and *in vitro* study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 173, p. 545-550, 2017.

HUANG, Y. *et al.* Molecular energy level modulation by changing the position of electron-donating side groups. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 5700-5705, 2012.

HYUN, Y. J. *et al.* 3, 4-Dicaffeoylquinic acid protects human keratinocytes against environmental oxidative damage. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 430-441, 2019.

IURCKEVICZ, G. *et al.* Encapsulated Microparticles of (1→6)-β-d-Glucan Containing Extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and characterization. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2099, 2019.

IURCKEVICZ, G. *et al.* Bioactive compounds in the leaves of *Baccharis dracunculifolia*: extraction process and characterization. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 43, p. e49826-e49826, 2021.

IVANOVIĆ, S. *et al.* Chemical Composition, Total Phenols and Flavonoids Contents and Antioxidant Activity as Nutritive Potential of Roasted Hazelnut Skins (*Corylus avellana* L.). **Foods**, v. 9, n. 4, p. 430, 2020.

JAMES, P. V. *et al.* Photophysical and theoretical investigations of oligo (p-phenyleneethynylene)s: Effect of alkoxy substitution and alkyne– aryl bond rotations. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 13, p. 4329-4337, 2006.

JIAO, Y. *et al.* Effects of meta or para connected organic dyes for dye-sensitized solar cell. **Dyes and Pigments**, v. 158, p. 165-174, 2018.

KATIYAR, S. K.; ELMETS, C. A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection. **International Journal of Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1307-1313, 2001.

KIM, S. *et al.* PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, D1388–D1395, 2019.

KOOPMANS, T. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. **Physica, [S. l.]**, v. 1, n. 1, p. 104–113, 1934.

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, 2018.

KOUHIHABIBIDEHKORDI, G. *et al.* Effect of White Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Skin Wound Healing Process in Rats. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 10, n. 1, p. 85, 2021.

KRUTMANN, J. *et al.* Photoprotection of the future: challenges and opportunities. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 3, p. 447-454, 2020.

KUMAZAWA, S. *et al.* Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEITE FILHO, C. A. *et al.* Synthesis of Vanillin Derivatives and Evaluation as Photoprotective Agents against the UVB Radiation. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 6, p. 2057-2071, 2016.

LEITE, Mateus Freire. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

LIM, H. *et al.* Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, p. S91-S99, 2017.

LIMA, A. M. *et al.* Efficacy of *Baccharis dracunculifolia* in the treatment of diversion colitis in rats. **Journal of Coloproctology**, v. 40, p. 61-66, 2020.

LIU, C. *et al.* Influences of fluorination on homoleptic iridium complexes with C \wedge N= N type ligand to material properties, ligand orientation and OLED performances. **Science China Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 640-649, 2015.

MANSUR, J. S. *et al.* Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 121-4, 1986.

MACHADO, C. S. *et al.* Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2016, p. 1-11, 2016,

MARCHESAN, E. D. *et al.* Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 10, n. 2, 2006.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R. *et al.* Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 178-181, 2008.

MARTINEZ-CORREA, H. A. *et al.* Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 31-39, 2012.

MISSIMA, F. *et al.* Effect of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 463-468, 2007.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology** v. 162, p. 68–76, 2016.

MORI, Ana Luiza Pereira Moreira. **Própolis - identificação de flavonoides e ácidos aromáticos em tintura. Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética**. 1997. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MOTA, M. D. *et al.* Sunscreen protection factor enhancement through supplementation with Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) ethanolic extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 205, p. 111837, 2020.

MUNHOZ, V. M. *et al.* Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, 2012.

MUNARI, C. C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 30, n. 1, p. 22-28, 2010.

NASCIMENTO, E. A. *et al.* Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 379-386, 2008.

NARAYANAN, D. L. *et al.* Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978-986, 2010.

NETO, João Francisco Câmara. **Caracterização química e avaliação das atividades antioxidante, toxicidade e de fotoproteção de extratos de plantas do nordeste brasileiro**. 2016. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Química) - Centro de Ciências e Tecnologia Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://siduece.uece.br/siduece/trabalhoacademicopublico.jsf?id=81503>> Acesso em: 20 de julho de 2021

NGOC, L. T. N. *et al.* Recent trends of sunscreen cosmetic: An update review. **Cosmetics**, v. 6, n. 4, p. 64, 2019.

ORLANDA, J. F. F.; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 730-736, 2015.

PADULA M, S. G. *et al.* The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 17, p. 5003-5010, 2004.

PAIVA, J. P. *et al.* Insights and controversies on sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 707-723, 2020.

PAIVA, J. P. *et al.* Titanium dioxide-montmorillonite nanocomposite as photoprotective agent against ultraviolet B radiation-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a potential candidate for safer sunscreens. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2539-2545, 2014.

PANCHE, A. N. *et al.* Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.

PARK, Y. K. *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PAROUL, N. *et al.* Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* PERS e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Revista Perspectiva**, v. 40, p. 55-64, 2016.

PARR, R. G.; Pearson, R. G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 26, p. 7512-7516, 1983.

PARR, R. G. *et al.* Electronegativity: the density functional viewpoint. **The Journal of Chemical Physics**, v. 68, n. 8, p. 3801-3807, 1978.

PATEL, N. F. *et al.* Efeitos da administração subcrônica de *Baccharis dracunculifolia* (BR 10 2012 020540-8 A2) em modelo animal de diabetes tipo I. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, n. 1, p. 158, 2018.

PAULETTO, G. *et al.* Novas alternativas terapêuticas para prevenção do câncer labial com produtos à base de extratos naturais com potencial fotoprotetor: uma revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 22, n. 3, 2017.

PEGORINI, F. *et al.* Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 3, p. 272-275, 2008.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. *et al.* Lemon balm extract (*Melissa officinalis* L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 2, p. 169-177, 2016.

PETRUK, G. *et al.* Antioxidants from plants protect against skin photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1454936, 2018.

PIANTINO, C. R. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 209-214, 2008.

PINTO, A. V. *et al.* Enzymatic recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for oxidatively DNA damage generation. **Mutation Research**, v. 688, n. 1-2, p. 3-11, 2010.

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

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 93-99, 2017.

REUTER, J. *et al.* Which plant for which skin disease? Part 2: Dermatophytes, chronic venous insufficiency, photoprotection, actinic keratoses, vitiligo, hair loss, cosmetic indications. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 8, n. 11, p. 866-874, 2010.

- RIBEIRO, R. P. *et al.* Avaliação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 85-88, 2004.
- RICE-EVANS, C. A. *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RIGOTTI, Marcelo. Constituintes químicos e atividade farmacológica de *Baccharis dracunculifolia* DC. **A Cura Pelas Plantas**. p. 25-28, 2007.
- RINNERHALER, M. *et al.* Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. **PNAS**, v. 109, n. 22, p. 8658-8663, 2012.
- ROBERTO, M. M. *et al.* Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 9-15, 2016.
- RODRIGUES, C. R. F. *et al.* Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (DC). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 321-324, 2009.
- ROQUE, Nádia.; BAUTISTA, Hortensia. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador: EDUFBA, 2008.
- SAES DA SILVA, E. *et al.* Use of sunscreen and risk of melanoma and non-melanoma skin cancer: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 186-201, 2018.
- SALAZAR, G. J. T. *et al.* Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 591-595, 2018.
- SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparison between chemical composition and antioxidant activity of different extracts of green propolis. **Química Nova**, v. 39, p. 1192-1199, 2016.
- SANDOVAL, T. P. *et al.* Application of phytocosmetic formulations based on Coffea arabica leaves extract. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 7, n. 1, p. 2-2, 2020.
- SANTOS, B. A. M. C. *et al.* Molecular modeling for the investigation of UV absorbers for sunscreens: triazine and benzotriazole derivatives. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 356, p. 219-229, 2018.
- SCHALKA, S. *et al.* Brazilian consensus on photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 1-74, 2014.
- SCHALKA, S. *et al.* The influence of the amount of sunscreen applied and its sun protection factor (SPF): evaluation of two sunscreens including the same ingredients at different concentrations. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 25, n. 4, p. 175-180, 2009.
- SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Sun protection factor: meaning and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 507-515, 2011.
- SCHROEDER, P. *et al.* Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2491-2497, 2008.

SEREGHETI, T. M. Q. *et al.* Antiproliferative and photoprotective activities of the extracts and compounds from *Calea fruticosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 9, p. e9375, 2020.

SEVERINO, P. Desenvolvimento tecnológico e avaliação do fator de proteção solar (FPS) do protetor solar em bastão com extrato glicólico de romã. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 5, n. 3, p. 221, 2019.

SFORCIN, José Maurício *et al.* ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SHAHIDI, F. *et al.* Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

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**, v. 193, p. 162-171, 2019.

SONDENHEIMER, K.; KRUTMANN, J. Novel means for photoprotection. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 162, 2018.

SOUSA, João Paulo Barreto de. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida**. 2007. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

STOMPOR-GORAÇY, M. *et al.* Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2038, 2021.

TAVARES, D. C. *et al.* Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 7, p. 1154-1158, 2006.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION *et al.* Sunscreen drug products for over-the-counter human drugs; proposed safety, effectiveness, and labeling conditions. Federal Register. Washington, DC: **Department of Health, Education, and Welfare**, p. 38206-38269, 1978.

VEIGA, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

VELASCO, M. V. R. *et al.* Rutin association with ethylhexyl methoxycinnamate and benzophenone-3: In vitro evaluation of the photoprotection effectiveness by reflectance spectrophotometry. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.

VERDI, L. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005

VIOLANTE, I. M. P. *et al.* Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 452-457, 2009.

VISHT, S.; CHATURVEDI, S. Isolation of natural products. **Journal of Current Pharma Research**, v. 2, n. 3, p. 584, 2012.

WANG, M. *et al.* Mass spectrometry searches using MASST. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 23–26, 2020.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 399-414, 1999.

XU, X. *et al.* The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4612, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105725, 2014.

ANEXO A – CÁLCULOS FPS MANSUR

Os cálculos de FPS foram realizados para todas as amostras, em triplicata, de acordo com a fórmula de *Mansur* (1986) e com o exemplo mostrado na tabela abaixo:

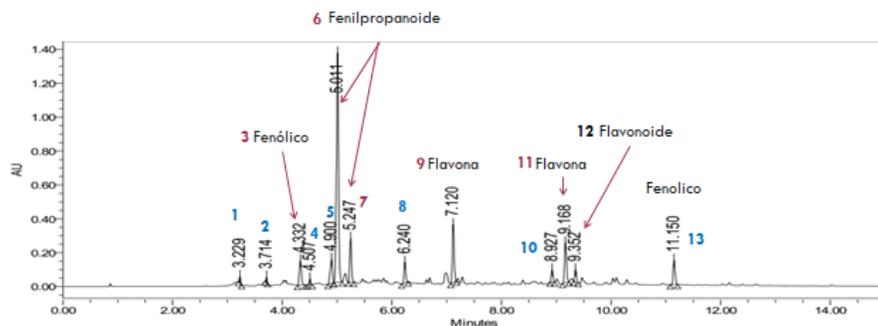
Exemplo de cálculo do fator de proteção solar pelo método de *Mansur*

EE x I	absorbância	A	EE x I x B
0,015	290	1,713	0,025695
0,0817	295	1,742	0,1423214
0,2874	300	1,738	0,4995012
0,3278	305	1,716	0,5625048
0,1864	310	1,716	0,3198624
0,0839	315	1,747	0,1465733
0,018	320	1,81	0,03258
	soma	12,182	1,7290381
	FPS		17,290381

Valores de FPS obtidos na análise de cada triplicata

	T1	T2	T3	MEDIA FPS	DESVIO
A	17,2	19,4	17,3	18,0	1,3
B	18,8	20,7	18,6	19,4	1,1
C	18,6	19,3	18,4	18,8	0,5
D	14,1	17,8	17,7	16,5	2,1
E	12,7	15,1	14,2	14,0	1,2
F	17,6	18,0	18,6	18,0	0,5
G	19,2	19,5	18,1	18,9	0,7
H	18,1	18,8	20,4	19,1	1,2
I	10,9	14,2	12,5	12,5	1,6
J	11,1	15,0	16,0	14,1	2,6
K	11,1	13,2	13,2	12,5	1,2
L	22,2	23,3	23,1	22,9	0,6
M	16,8	17,8	17,6	17,4	0,5
N	19,1	19,9	19,2	19,4	0,4

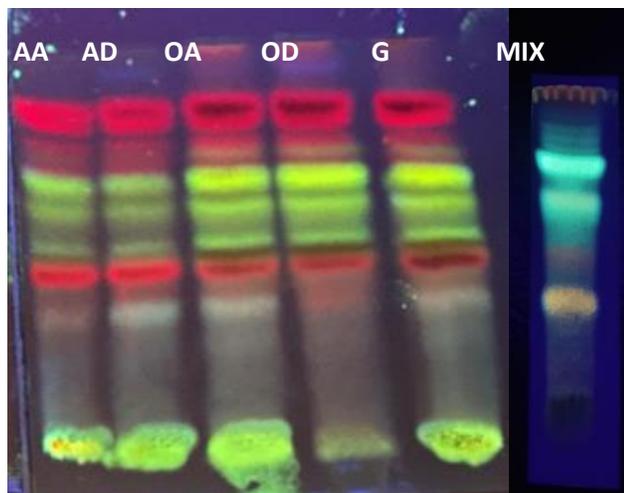
ANEXO B – CROMATOGRAMA PRELIMINAR PARA SELEÇÃO DE ÁREA DOS PICOS FENILPROPANOIDES E FLAVONOIDES DE *Baccharis dracunculifolia* PARA ANÁLISE DO COMPONENTE PRINCIPAL (PCA).



TR	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	2366352	1676182	2099719	2188011	2671403	2712365	1465882	2474602	986788	2208217	2727386	2313768	2443236	2731977
2	572508	395098	504784	530604	668473	619389	384593	550627	338071	540719	652879	479311	593189	657794
3	288782	221173	741232	319361	347010	296609	377520	537784	408948	325018	361898	252956	713036	369953
4	195335	139368	182281	181086	223714	225203	138511	203105	119524	188857	235602	182304	202524	232275
5	933503	639737	868900	879089	1077935	1051271	643469	980725	535996	874714	1079298	920066	946761	1054050
6	8039759	6953706	7873552	7977014	8893815	8718102	7158854	8243114	6258900	8102753	8701958	8067752	8165581	8626948
7	2771612	1952362	2587312	2589166	3212158	3238559	1882293	2863097	1269016	2580958	3082704	2658993	2677935	3093908
8	552688	415027	554335	542866	726200	671525	393318	574117	242717	571421	656192	434000	528879	663515
9	524556	422593	582415	566230	760414	646731	669093	510623	937988	551708	587146	576590	507551	631251
10	146394	122596	168419	162862	209390	178550	192664	114751	284729	160307	148495	148621	127195	168912
11	538346	446051	605722	599400	778103	661788	706001	423991	956008	588307	556479	563871	456931	609013
12	144249	117617	143562	158136	179364	160493	168011	100318	257659	157294	140375	148331	111498	144692
13	240542	333443	185387	464891	289281	316777	246838	185893	610841	308239	361870	317441	343943	361808

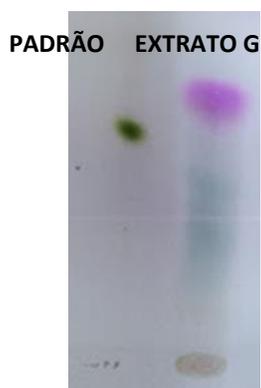
ANEXO C – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Cromatograma obtido para identificação de flavonoides e fenois.



As amostras aplicadas foram: fração aquosa obtida com acetato de etila (AA), fração aquosa obtida com diclorometano (AD), fração orgânica obtida com acetato de etila (OA), fração orgânica obtida com diclorometano (OD), *B. dracunculifolia*. Eluente: acetato de etila: tolueno : ácido fórmico : água (20: 60: 10: 10 v/v/v/v). Revelador Reagente Natural seguido de macrogol 4000.

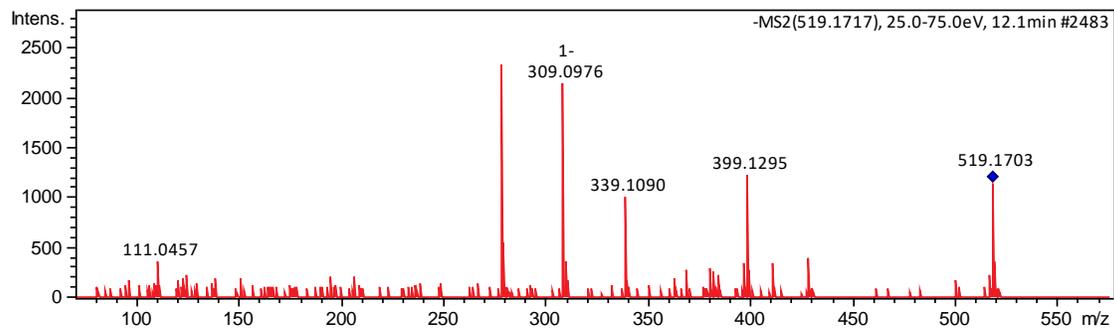
Cromatograma obtido para identificação de terpenos do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*.



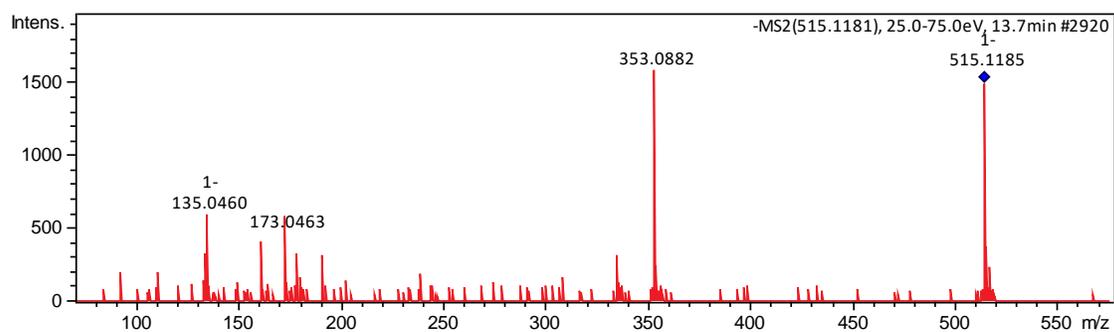
Visualização após aspersão de Revelador Libermann-Burchard. Padrão: ácido ursólico. Condições cromatográficas no item 4.6.1.

ANEXO D - CROMATOGRAMAS ESI-QTOF-LC-MS

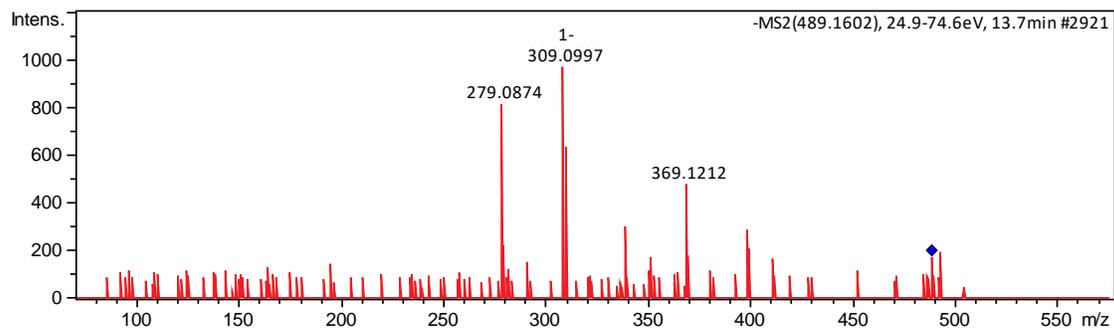
COMPOSTO 1 – N.I.



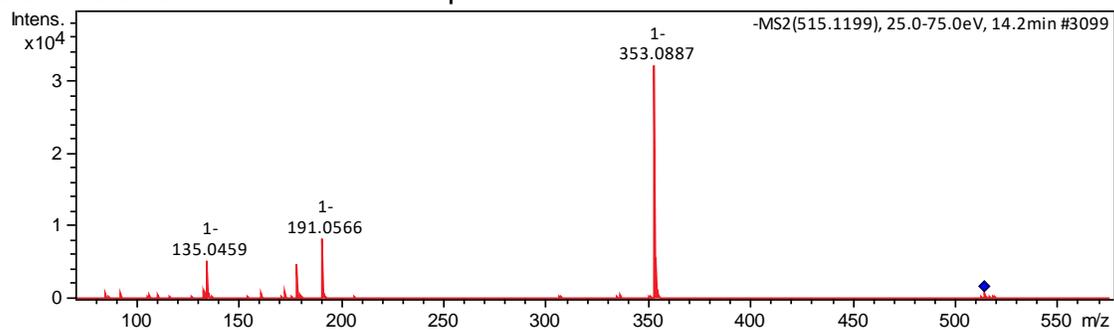
COMPOSTO 2 - Ácido dicafeoilquínico



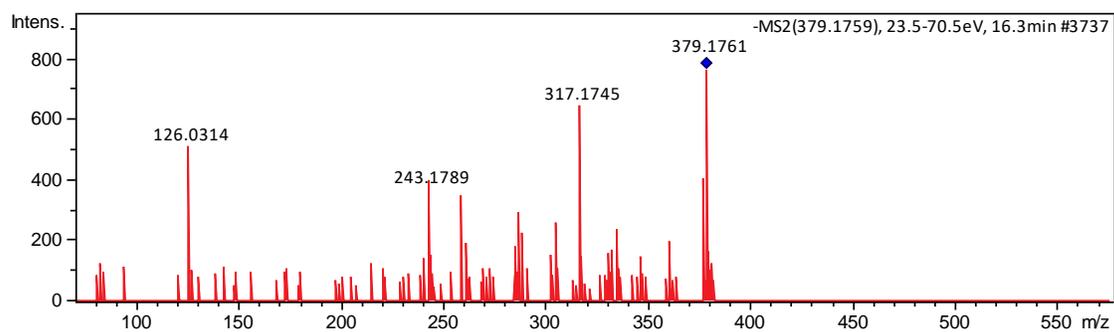
COMPOSTO 3 – N.I.



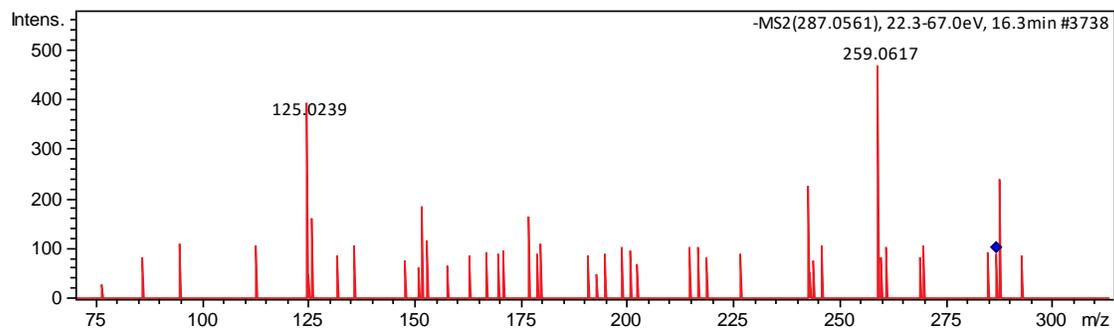
COMPOSTO 4 - Ácido dicafeoilquinico



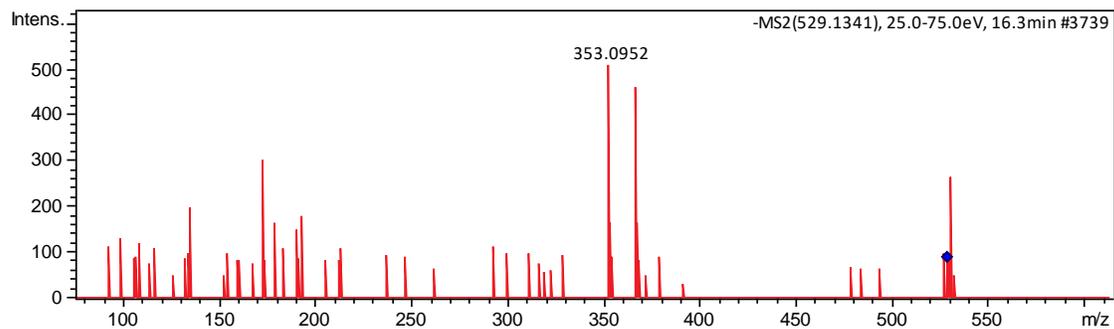
COMPOSTO 5 - N.I.



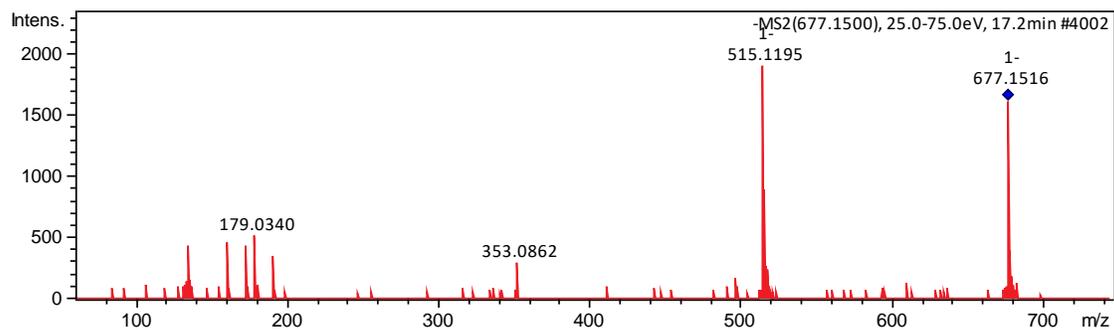
COMPOSTO 6 - Dihidrocanferol



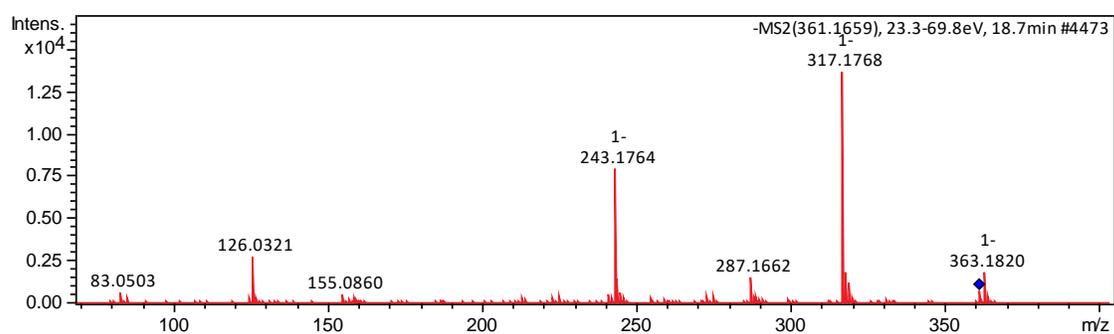
COMPOSTO 7 - Ácido cafeoilferuloil quínico



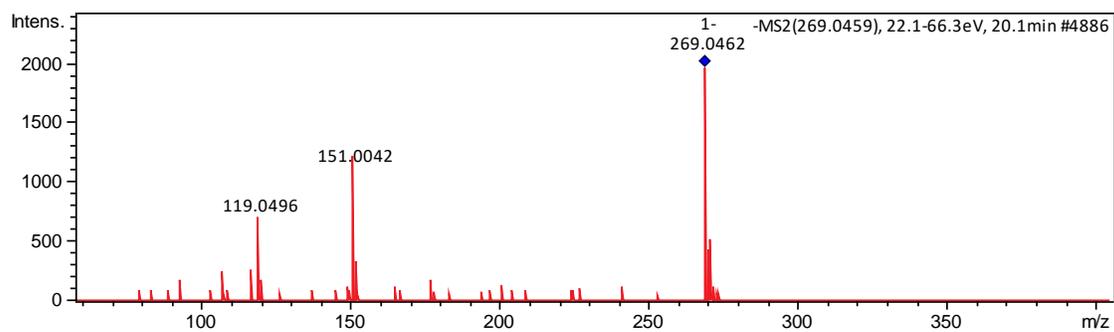
COMPOSTO 8 - Ácido 3,4,5-tricafeoilquinico



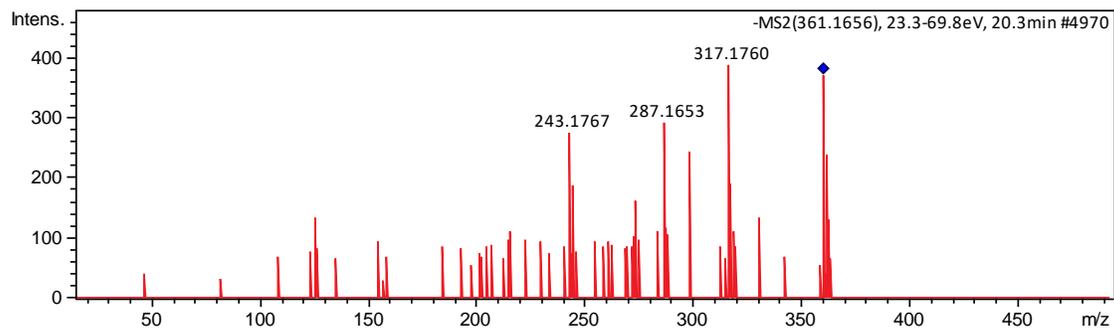
COMPOSTO 9 - N.I.



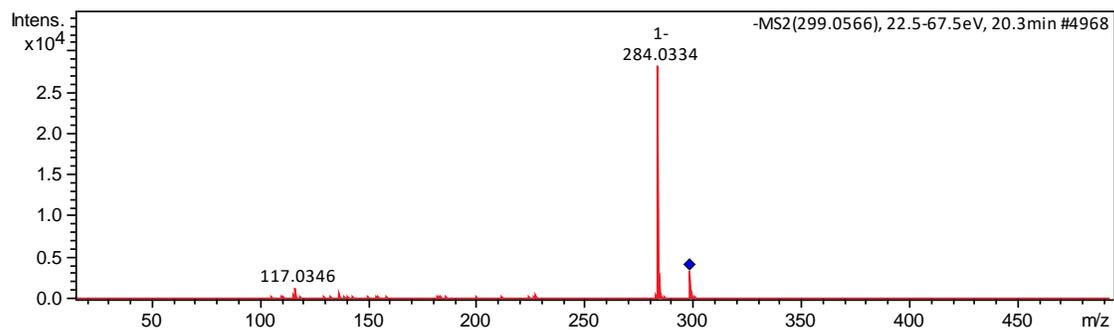
COMPOSTO 10 - Apigenina



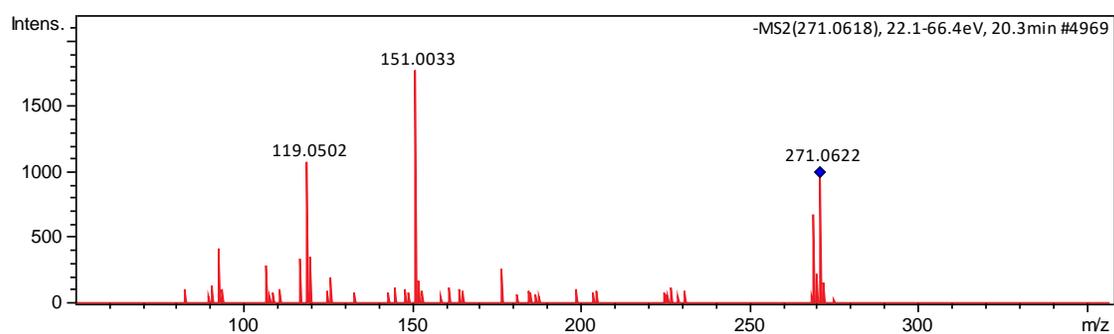
COMPOSTO 11 - N.I.



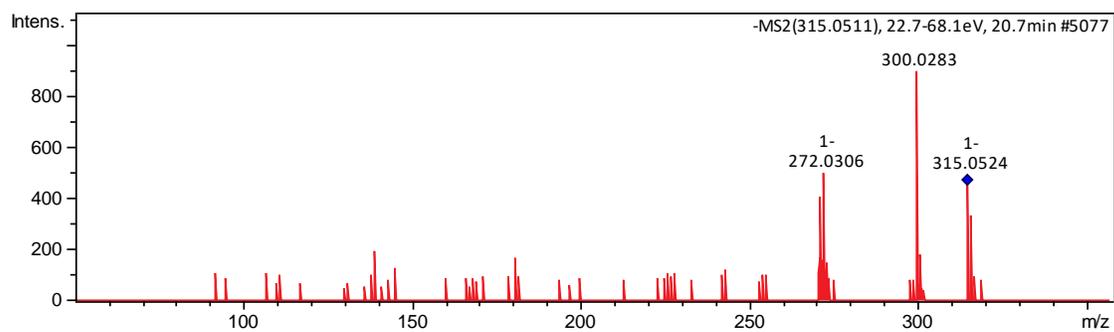
COMPOSTO 12 – Diosmetina



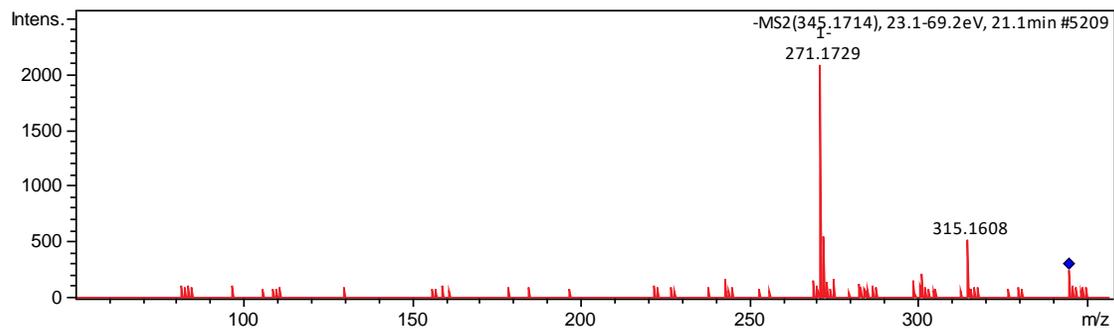
COMPOSTO 13 – Naringenina



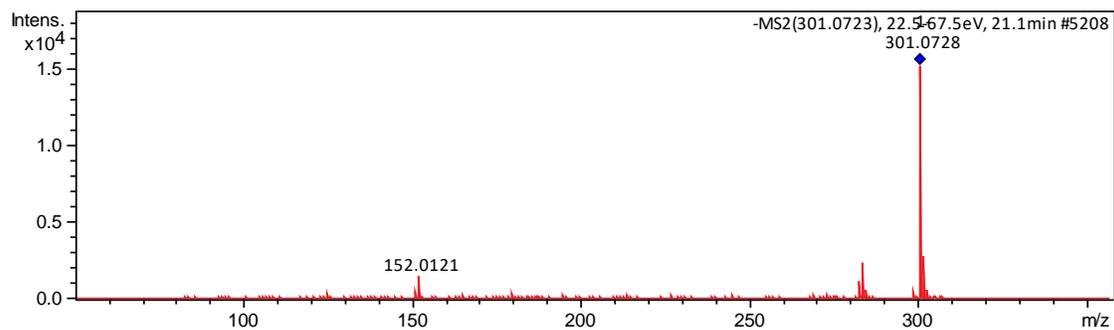
COMPOSTO 14 – Derivado de isoramnetina



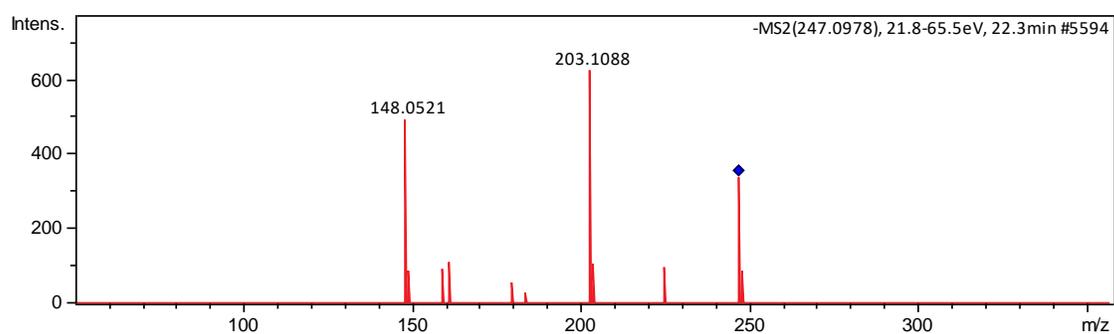
COMPOSTO 15 – N.I.



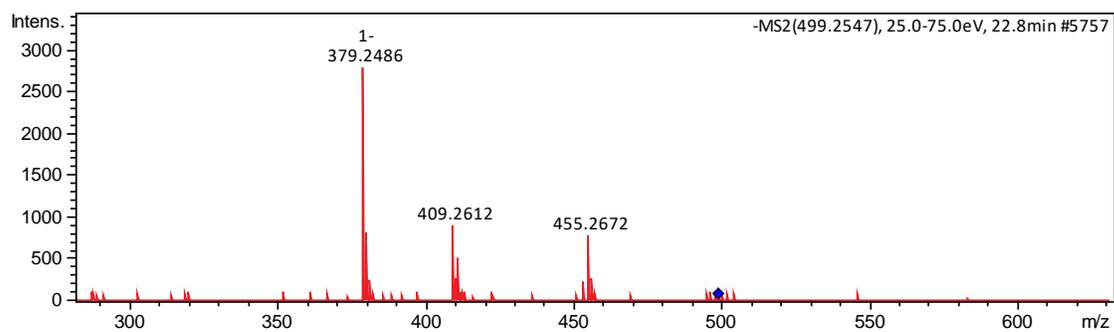
COMPOSTO 16 – Dihidrocanferideo



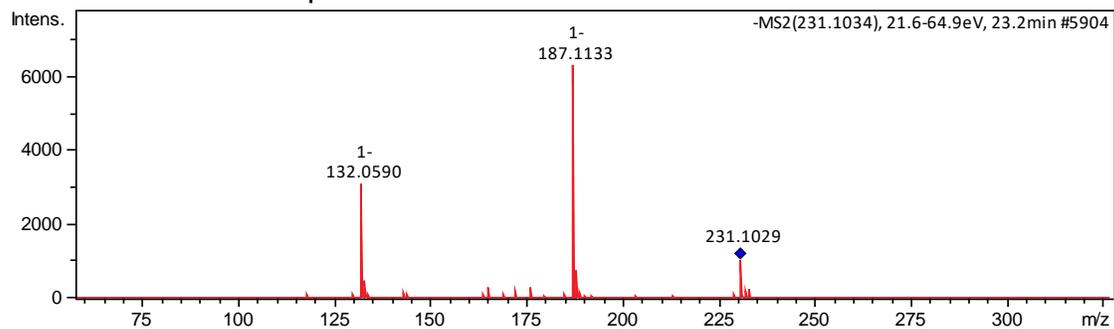
COMPOSTO 17 – Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico



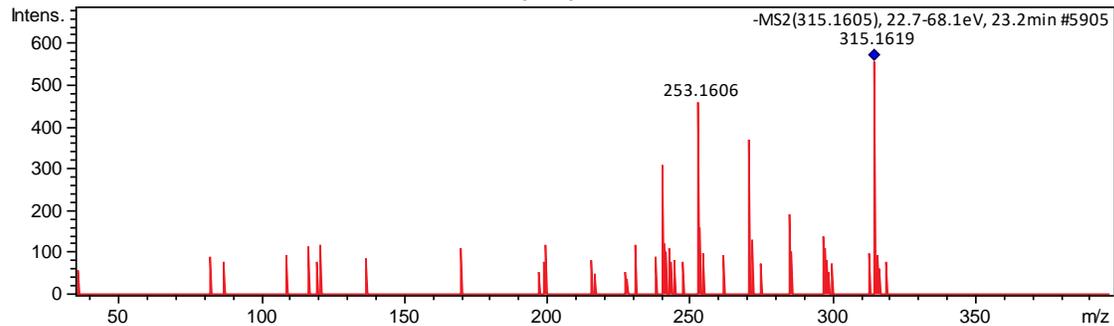
COMPOSTO 18 – N.I.



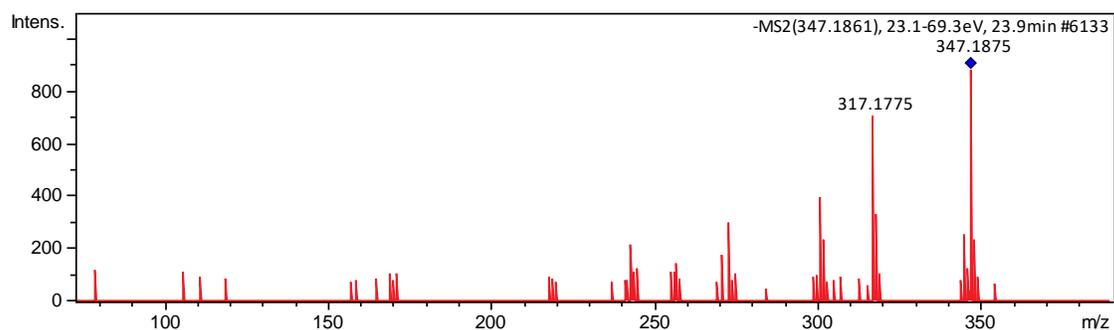
COMPOSTO 19 – Drupanina



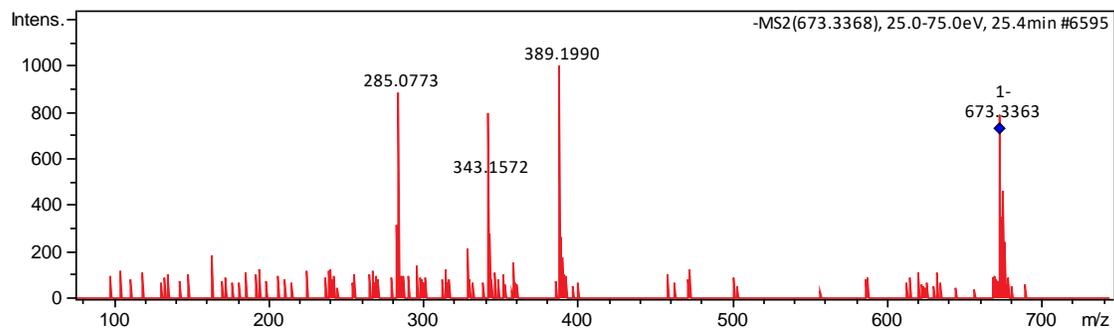
COMPOSTO 20 – Derivado de ácido propenóico



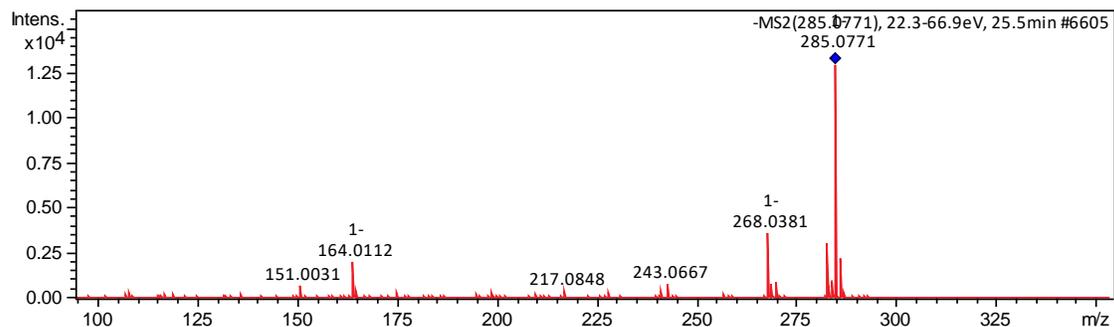
COMPOSTO 21 – N.I.



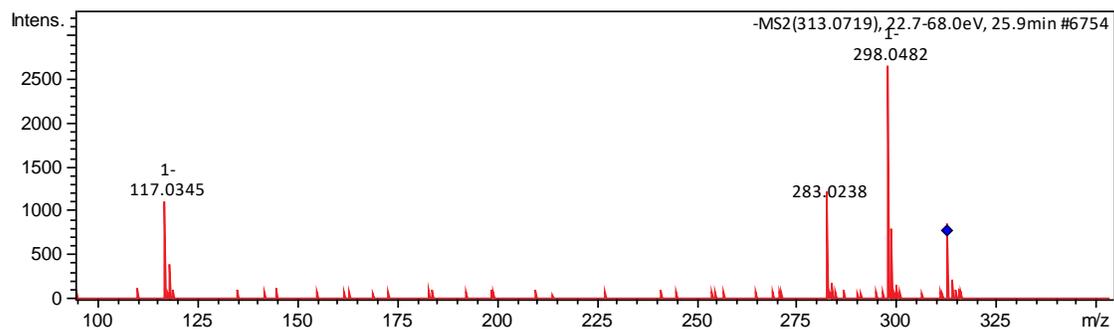
COMPOSTO 22 – Derivado de flavona



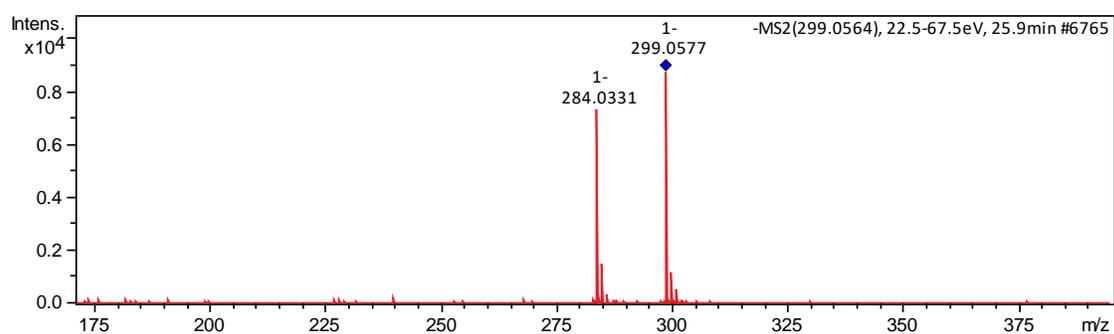
COMPOSTO 23 – Isosacuranetina



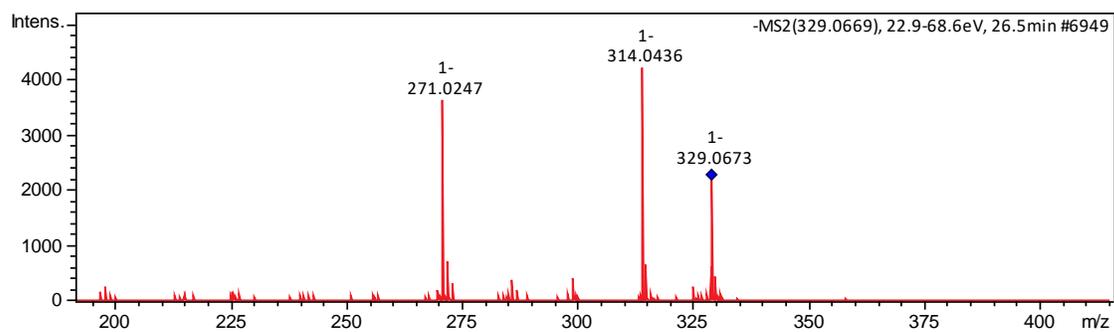
COMPOSTO 24 – Velutina



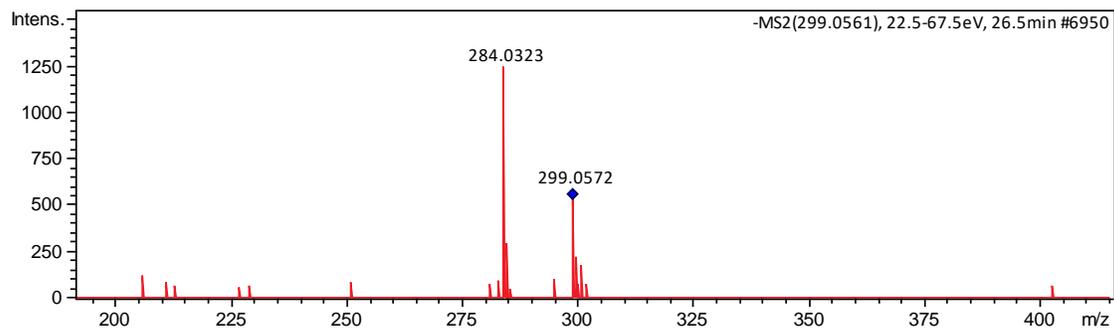
COMPOSTO 25 – Canferideo



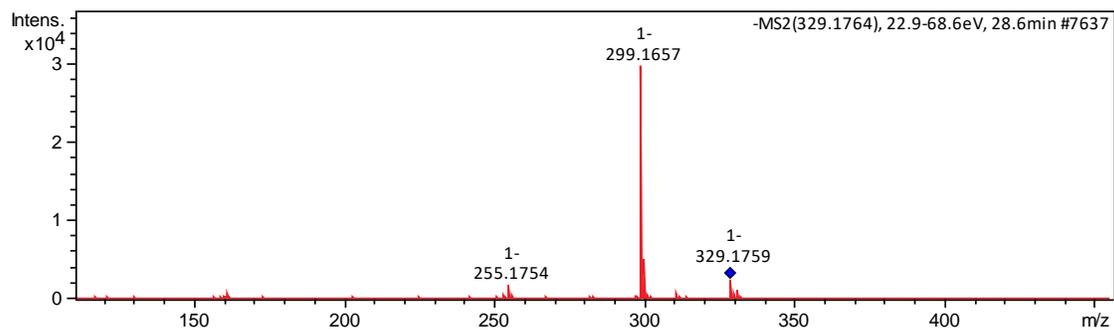
COMPOSTO 26 – 4',5,7-trihidroxy-3,6-dimetoxiflavona



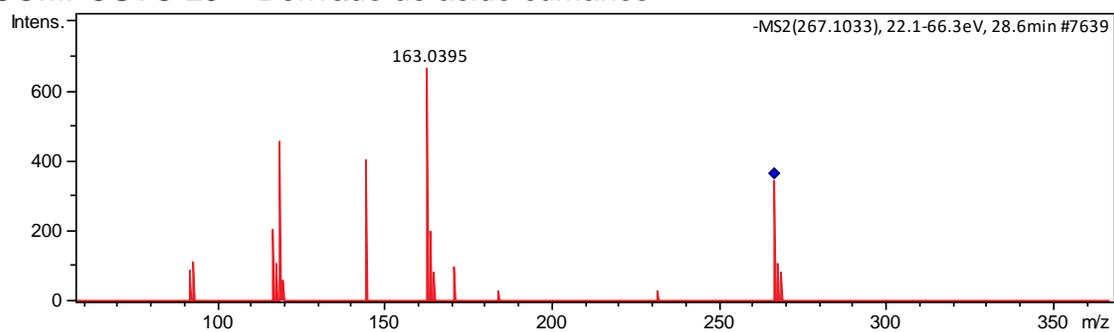
COMPOSTO 27 – Derivado de flavona



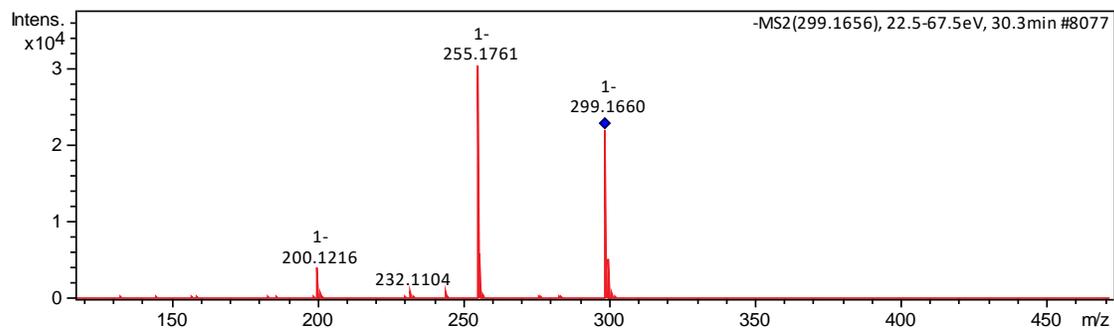
COMPOSTO 28 – Derivado de tricina



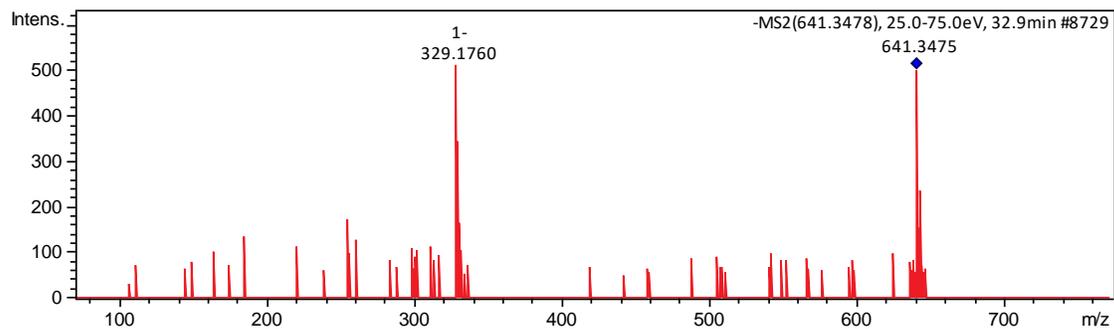
COMPOSTO 29 – Derivado de ácido cumárico



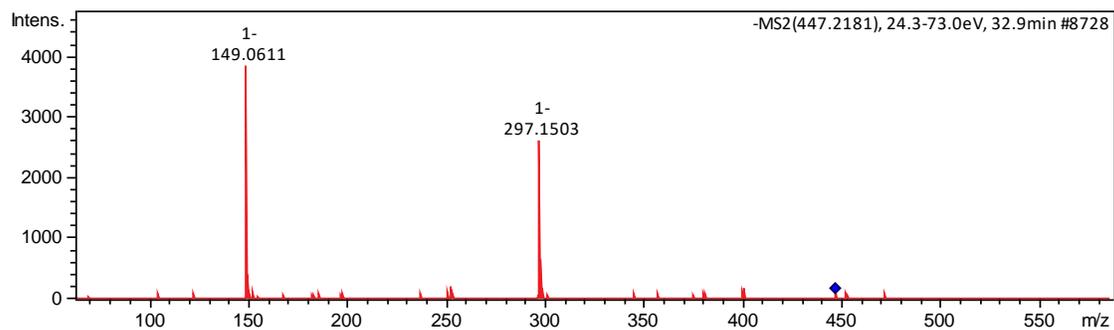
COMPOSTO 30 – Artepilina C



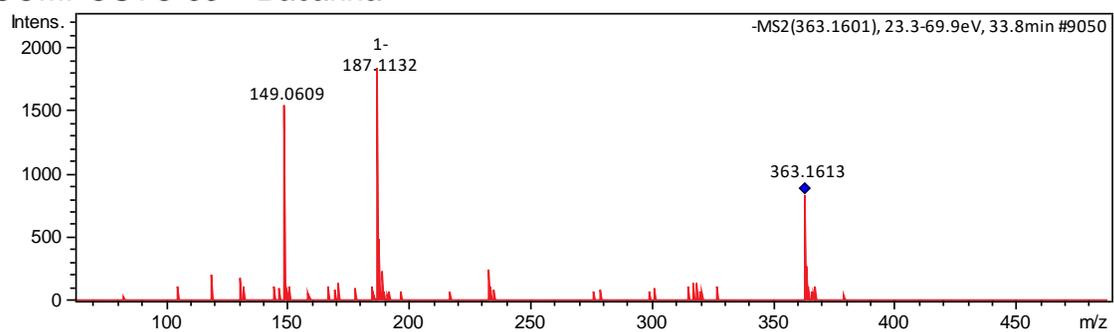
COMPOSTO 31 – N.I.



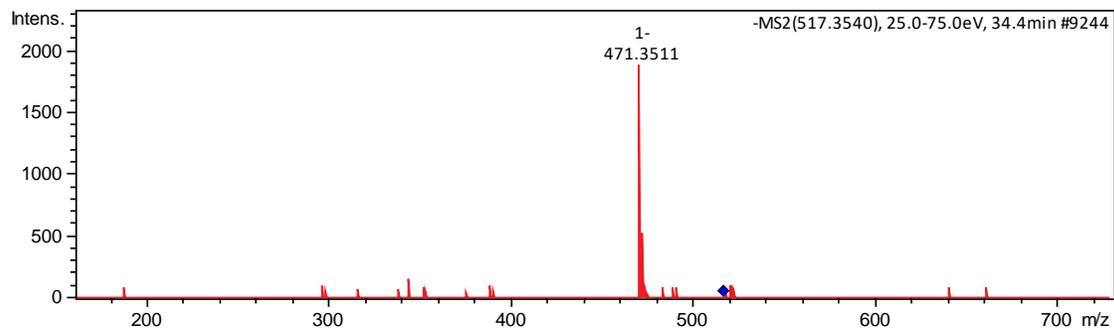
COMPOSTO 32 – N.I.



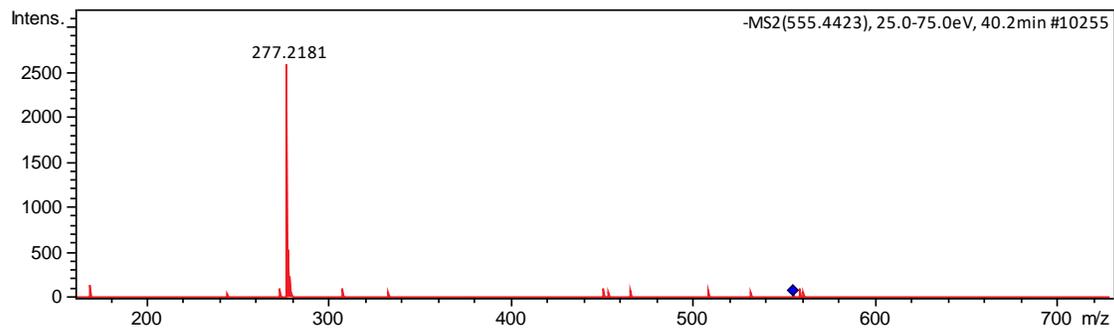
COMPOSTO 33 – Bacarina



COMPOSTO 34 – N.I.



COMPOSTO 35 – N.I.



Composto 36 – N.I.

