



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

ATIVIDADE FOTOPROTETORA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Lippia thymoides*

Sara Leite Cerqueira da Silva¹; Angélica Maria Lucchese² e Acsa Oliveira Magalhães³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: saracerqueira513@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
3. Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos/Lapron, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: acsomagalhaes@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Flavonoides; fotoproteção; fracionamento.

INTRODUÇÃO

A camada de ozônio funciona como um filtro para impedir a radiação ultravioleta (UV), mas a redução dos níveis de ozônio atmosférico, detectada a partir da década de 1980, devido aos impactos ambientais, culminou no conseqüente aumento da incidência de radiação UV (MALANCA; CANZIANI; ARGUELLO, 2005). Os raios UV são responsáveis pelo surgimento de câncer de pele, oxidação de lipídios e produção de radicais livres, interrompem a comunicação celular, reduzem a resposta imune da pele e causam danos ao DNA (ácido desoxirribonucléico) e ao material genético (MOSCA; SANCHES; COMUNE, 2017).

A proteção efetiva contra a radiação ultravioleta se dá pelo uso de protetores solares, que reduzem a quantidade a ser absorvida pela pele humana. Está disponível em preparações cosméticas para uso tópico, contendo filtros solares químicos e/ou físicos, conhecidos como fotoprotetores (BRASIL, 2012; MOSCA; SANCHES; COMUNE, 2017). Santos (2010) relata o crescente interesse para o desenvolvimento de filtros solares de origem natural. O uso destes produtos naturais que apresentam atividade fotoprotetora ou capacidade de potencializar o Fator de Proteção Solar (FPS) destes filtros, são alvos interessantes para pesquisas, uma vez que comprovada sua eficiência, podem intensificar a proteção do produto (NASCIMENTO et al., 2009).

Dentre as plantas encontradas no Brasil, o gênero *Lippia* (Verbenaceae) destaca-se pela sua composição química rica em compostos fenólicos como os flavonoides, os quais possuem atividade antioxidante que elimina os radicais livres induzidos por UV, protegendo contra a radiação ultravioleta (MAMBRO; FONSECA, 2005; FURANI, 2010; SUDHA; SRINIVASA, 2014). A espécie *Lippia thymoides*, conhecida popularmente como “alecrim-do-mato”, possui atividade antioxidante *in vitro* determinada para folhas e galhos pelo método de co-oxidação do sistema β -Caroteno/ácido linoléico e de sequestro do radical DPPH (SILVA et al. 2015). Este trabalho tem como objetivo investigar a ação fotoprotetora e composição química de *Lippia thymoides* e selecionar a fração mais promissora para isolamento das possíveis substâncias bioativas.

METODOLOGIA

Fracionamento do extrato bruto

O extrato metanólico das folhas de *L. thymoides* foi ressuspensão em metanol e extraído sucessivamente por partição líquido-líquido, pelos solventes hexano, diclorometano e acetato de etila) para obtenção das frações. As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45°C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão.

Determinação do teor de fenólicos e flavonoides

A determinação do teor de compostos fenólicos totais do extrato metanólico bruto (LTB) e das frações em hexano (LTH), diclorometano (LTD) e acetato de etila (LTA) das folhas de *L. thymoides*, foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, por meio de espectrometria no UV-Vis (750 nm), descrito por Peres *et al.* (2009). As amostras foram diluídas em metanol para obtenção de soluções em triplicata a 1.000 µg/mL. Os valores médios do teor de compostos fenólicos, expressos como mgEAG (equivalentes a ácido gálico) por g de amostra, foram obtidos a partir da absorbância das amostras comparada a curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. A equação da curva de calibração ($y = 0,0028x - 0,0087$) foi obtida através de regressão linear, onde y é a absorbância medida e x é a concentração do ácido gálico.

A determinação dos flavonoides totais foi realizada por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio, pelo método de Banov *et al.* (2006) e utilizando quercetina como padrão. O extrato metanólico e as frações LTH, LTD e LTA foram dissolvidos em metanol para obtenção de soluções a 1.000 µg/mL. Os valores médios do teor de flavonoides foram determinados através da equação da curva de calibração a partir da quercetina como padrão e expressos como mgEQ (equivalentes a quercetina) por g de amostra. A equação da curva de calibração foi $y = 0,0218x - 0,0345$, obtida através de regressão linear, onde y é a absorbância medida e x é a concentração de quercetina (EQ).

Determinação da atividade fotoprotetora

O extrato metanólico bruto e as frações LTH, LTD e LTA foram submetidos a uma análise espectrométrica para determinar o comprimento de onda em que ocorre a absorbância máxima ($A_{max.}$), a fim de avaliar a atividade fotoprotetora das amostras. Uma alíquota de cada amostra foi previamente seca em estufa a 45 °C, por uma hora. Em seguida, foram preparadas diluições em etanol absoluto no tubo de vidro, ao abrigo da luz, nas concentrações 5, 25, 50 e 100 mg/L. Realizou-se uma varredura entre os comprimentos de onda 260 a 400 nm (intervalos de 5 nm) em espectrofotômetro UV-VIS (QUIMS), para verificar a máxima absorção nas regiões ultravioleta A, B e C (UVA, UVB e UVC). Para o branco foi utilizado apenas etanol durante as análises e o ensaio foi realizado em triplicata. O Fator de Proteção Solar (FPS) das amostras foi determinado através da equação, baseada no método espectrofotométrico *in vitro* desenvolvido por Mansur *et al.* (1986). Para avaliar a capacidade de proteção das amostras na região UVA do espectro solar, aplicou-se o método *in vitro* da razão UVA/UVB, que envolve a medida de absorção das amostras no intervalo de 290 a 400 nm, segundo Velasco *et al.* (2011).

Purificação da fração em acetato de etila

A fração em acetato de etila (20,12 g) foi submetida a fracionamento em Cromatografia por exclusão (Sephadex), resultando na obtenção de 149 subfrações. Em função da massa e da resolução observada na cromatografia em camada delgada, a subfração 60-78 (0,89 g) obtida da purificação da fração em acetato de etila foi selecionada. Esta foi submetida a cromatografia em coluna para isolamento de metabólitos secundários, utilizando sílica

gel 60 como fase estacionária e misturas de eluentes (fase móvel) de polaridade crescente (hexano/acetona), além de metanol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a LTA apresentou o maior teor de fenóis ($415,26 \pm 28,92$ mg EAG/g) e a LTB demonstrou maior teor de flavonoides ($108,39 \pm 5,67$ mg EQ/g) quando comparada às demais frações. Observou-se que a fração detentora do maior teor de fenólicos não possui correlação com a fração com maior teor de flavonoides. Esta variação possui provável relação com o método empregado para a determinação do teor de flavonoides, visto que pode fornecer valores diferentes (geralmente inferiores) em relação à quantidade real de flavonoides totais presente nas amostras analisadas. É possível realizar a leitura da banda de absorção do complexo quercetina-alumínio, nos comprimentos de onda próximo a 425 nm. A quercetina é um flavonol comum entre os flavonoides encontrados nas plantas. Entretanto, complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, que pode resultar uma subestimação para o teor de flavonoides totais em determinações de misturas ricas em flavonas (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

O fator de proteção solar (FPS) foi determinado pelo cálculo proposto por Mansur *et al.* (1986), que relaciona a absorbância do extrato com o efeito eritematogênico da radiação e a intensidade da luz em comprimentos de ondas entre 290 a 320 nm. Observou-se que o extrato bruto e a fração em acetato de etila apresentaram os maiores valor de FPS (10,90 e 10,72, respectivamente) quando comparado as frações em Diclorometano (FPS 8,19) e hexano (FPS 3,62), na concentração de 100 mg/L.

A legislação brasileira, RDC N° 30 de 1° de junho de 2012 (BRASIL, 2012), estabelece critérios para considerar produtos cosméticos aptos à proteção contra radiação UVB e UVA. Deve apresentar Fator mínimo de Proteção UVA (FPUVA) cujo valor deve corresponder a 1/3 do valor do FPS indicado na rotulagem, comprimento de onda crítico mínimo de 370 nm, além de apresentar FPS maior ou igual a 6, assim com exceção da fração em hexano, todas as demais amostras atenderam este critério.

Segundo Mambro e Fonseca (2005), a propriedade fotoprotetora pode estar proporcionalmente ligado a concentração de fenólicos totais presente na composição do metabolismo vegetal. Ao comparar os resultados encontrados para análise de fenólicos totais com os valores de FPS dos extratos e frações das folhas de *L. thymoides*, observou-se que a fração de acetato de etila apresentou o maior teor de fenóis $415,26 \pm 28,92$ mg EAG/g e Fator de Proteção Solar de 10,72, sem diferença significativa do extrato bruto que apresentou maior valor de FPS (10,90), apesar do conteúdo de fenólicos totais ser inferior ao da fração em acetato de etila ($387,25 \pm 27,36$ mg EAG/g). Além disso, a fração em hexano apresentou menor Fator de Proteção Solar (3,62), contudo seu teor de fenólicos $276,21 \pm 10$ mg EAG/g é maior quando comparado a fração em diclorometano $99,65 \pm 1,44$ mg EAG/g que obteve FPS igual a 8,19, sugerindo assim a participação de outras substâncias, além das fenólicas, nos resultados de fotoproteção.

Todas as amostras apresentaram razão UVA superior a 0,9, levando a uma estimativa de absorção superior na região do espectro UVA comparado a região UVB, portanto, infere-se que o extrato e frações das folhas de *L. thymoides* possuem proteção ultra anti-UVA. Assim considerando os dados obtidos neste trabalho, a fração em acetato de etila foi selecionada como a mais promissora para isolamento das possíveis substâncias com atividade fotoprotetora e submetida a purificação através de métodos cromatográficos. Da fração em acetato de etila submetida a separação por cromatografia em coluna foram obtidas 149 frações. Dentre estas, as frações 60-78 obtidas da purificação da fração em acetato de etila foram submetidas a cromatografia em coluna, em que a subfração 88-113 (0,23g) apresentou um precipitado com coloração verde. Estas frações estão em processo

de análise através de métodos cromatográficos para futura elucidação estrutural das substâncias isoladas.

CONCLUSÕES

A fração em acetato de etila demonstrou melhores resultados na busca de compostos com potencial fotoprotetor, pelo melhor valor de FPS associado ao elevado teor de fenólicos e a ação ultra anti-UVA. Estudos voltados para sua purificação estão sendo conduzidos, visando o isolamento dos compostos com atividade fotoprotetora.

REFERÊNCIAS

- BANOV, D. *et al.* Caracterização do Extrato Seco de *Ginkgo biloba* L. em Formulações de Uso Tópico. **Acta Farm. Bonaerense**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 219-224, 2006.
- BRASIL. Resolução – RDC N° 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jun. 2012.
- MALANCA, F. E.; CANZIANI, P. O.; ARGUELLO, G. A. Trends evolution of ozone between 1980 and 2000 at midlatitudes over the Southern Hemisphere: Decadal differences in trends. **Journal Of Geophysical Research**, Buenos Aires, jan. 2005. p. 1-12.
- MAMBRO, V. M. D.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **J Pharm Biomed Anal**, [s. l.], v. 37, 2005, p. 287-295.
- MANSUR, J. de S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. D'; AZULAY, R. David. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p.121-124, maio/jun. 1986.
- MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, p. 3-8, maio 1998.
- MOSCA, S. S.; SANCHES, R. A.; COMUNE, A. C. A importância dos antioxidantes na neutralização dos radicais livres: uma revisão. **Revista Saúde em Foco**, São Paulo, v. 1, n. 9, p.563-574, 2017.
- NASCIMENTO, C. S.; NUNES, L. C. C.; LIMA, Á. A. N. de; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROLIM NETO, P. J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p.334-339, 2009.
- PERES, M. T. L. P. *et al.* Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.
- SANTOS, J. S. Antioxidantes de origem vegetal em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 22, p. 46-52, mai./jun. 2010.
- SILVA, Fabrício Souza *et al.* Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.l.], v. 2015, p. 1-10, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/463248>.
- SUDHA, A.; SRINIVASA, P. Bioassay-guided isolation and antioxidant evaluation of flavonoid compound from aerial parts of *Lippia nodiflora* L. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- VELASCO, M. V. R. *et al.* Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) - revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.