

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LYVIA SANCHES JURGELEVICIUS

Investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante dos extratos do fruto imaturo de  
*Eugenia umbelliflora* O. Berg.

Florianópolis  
2023

LYVIA SANCHES JURGELEVICIUS

Investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante dos extratos do fruto imaturo de  
*Eugenia umbelliflora* O. Berg.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para obtenção do título  
de bacharel em Farmácia

Ciências Farmacêuticas

Orientador: Christiane Meyre da Silva  
Bittencourt

Florianópolis  
2023

Ficha de identificação da obra, elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Jurgelevicius, Lyvia Sanches

Investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante dos extratos do fruto imaturo de *Eugenia umbelliflora* O. Berg. / Lyvia Sanches Jurgelevicius ; orientadora, Christiane Meyre da Silva Bittencourt, 2023.

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Atividade fotoprotetora. 3. Atividade antioxidante. 4. *Eugenia umbelliflora*. 5. Extração por fluido supercrítico. I. Bittencourt, Christiane Meyre da Silva. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

LYVIA SANCHES JURGELEVICIUS

Investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante dos extratos do fruto imaturo de  
*Eugenia umbelliflora* O. Berg.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para obtenção do título  
de bacharel em Farmácia e Ciências  
Farmacêuticas

Florianópolis, 2023

Banca Examinadora:

---

Christiane Meyre da Silva Bittencourt – Doutora (UFSC)

---

Giovana Carolina Bazzo – Doutora (UFSC)

---

Thiago Caon – Doutor (UFSC)

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho representa a conclusão de toda a minha trajetória acadêmica que se iniciou em 2018. Durante esse período eu tive a oportunidade de experienciar coisas que me fizeram evoluir muito como pessoa, estudante, profissional e pesquisadora. Meu primeiro agradecimento é aos meus pais, que mesmo de longe, acompanharam e me deram forças durante todo esse período, a eles que fizeram de tudo para que eu tivesse uma educação de qualidade desde o meu nascimento. Agradeço a minha irmã, que sempre me apoiou nas minhas decisões e foi meu porto seguro. Eu amo vocês.

À UFSC só tenho a enaltecer, a todo corpo docente que contribuiu para minha formação. Um agradecimento mais que especial para a professora Christiane Meyre, orientadora deste trabalho. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos e por me permitir trabalhar nesse projeto incrível do qual estuda a tantos anos, a Doutora Christiane definitivamente é uma profissional que eu admiro e tenho o maior prazer de poder ter trabalhado junto.

À minha banca, professores doutores Thiago Caon e Giovana Bazzo, meus mais sinceros agradecimentos pelas sugestões durante o desenvolvimento do projeto. Um destaque especial para a professora Giovanna que me acompanhou no laboratório para o desenvolvimento dos ensaios de atividade antioxidante e me deu todo o suporte que precisava.

Aos meus amigos da farmácia, Cauê, Érica, Paes, Raiza, Sabrina, Vitor e Yasmin, essa experiência toda não teria sido a mesma sem vocês, compartilhar dos mesmos sentimentos e responsabilidades com pessoas tão incríveis permitiu com que fosse “fácil” passar por tudo isso. Obrigada especial à Yasmin que me ajudou ativamente no desenvolvimento do projeto. É um prazer enorme ter vocês na minha vida, e tenho orgulho de ser farmacêutica junto com vocês. Eu os amo demais.

Além dos citados, gostaria de agradecer aos meus amigos Gaioli, Helô, Henrique, Jhonatan e Vitor, que foram meu apoio emocional durante todo esse desenvolvimento. Ter conhecido vocês foi uma das melhores coisas que poderia ter acontecido. Ter vocês ao meu lado me deixa mais leve, feliz e mais apaixonada por viver. Amo vocês.

## RESUMO

Embora a radiação ultravioleta (UVB) seja essencial para a produção de vitamina D, a qual exerce papel fisiológico na regulação de alguns íons, manutenção da homeostase e do sistema imunológico, a radiação quando em excesso apresenta riscos à saúde devido à formação de radicais livres e ao potencial desenvolvimento de câncer de pele. Portanto, é crucial adotar medidas de proteção, como o uso de protetores solares. Diante da busca atual por opções que causem menos efeitos negativos aos ecossistemas e da evidência de efeitos cumulativos e tóxicos dos protetores solares sintéticos, principalmente ao ambiente marinho, as plantas superiores surgem como uma importante fonte para novas descobertas. Estudos anteriores realizados com os frutos verdes de *Eugenia umbelliflora* demonstraram a prevalência em sua composição química de compostos fenólicos da classe de floroglucínóis, o que instiga a investigar seu potencial antioxidante e fotoprotetor. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a fotoproteção e o potencial antioxidante de extratos dos frutos verdes de *E. umbelliflora* obtidos por extração por fluido supercrítico (ESC), técnica que utiliza o CO<sub>2</sub> como solvente e reforça a busca pela química verde. O fator de proteção solar espectrofotométrico (FPSE) foi avaliado pelo método *in vitro* de Mansur e a atividade antioxidante pelo método de consumo de radical DPPH. Os extratos obtidos por ESC apresentaram um FPSE médio de 21,86 quando avaliados na concentração de 60 µg/mL (A: 13,78 ± 0,0043; B: 7,77 ± 0,016; C: 22,85 ± 2,14; D: 14,02 ± 0,0002; E: 7,60 ± 0,013; F: 14,52 ± 0,011; G: 14,87 ± 0,007; H: 13,86 ± 0,002), com destaque para o extrato C o qual revela-se enquadrado na categoria de média proteção conforme preconizado pela Anvisa (RDC N° 30, DE 1° DE JUNHO DE 2012). Para investigar a atividade antioxidante elegeu-se o extrato A como alvo inicial do estudo. O extrato A apresentou uma EC<sub>50</sub> de 900 µg/mL. Pode-se observar o potencial fotoprotetor dos extratos obtidos por ESC e moderada atividade antioxidante revelando o potencial dos extratos desta espécie vegetal e estimula a continuidade dos estudos diante da possibilidade de aplicação como insumo farmacêutico ativo em dermocosmético.

**Palavras-chave:** Bagaúçu, eugeniais, fotoproteção, antioxidante, DPPH, FPS.

## ABSTRACT

Although ultraviolet radiation (UVB) is essential for the production of vitamin D, which plays a physiological role in the regulation of certain ions, maintenance of homeostasis, and the immune system, excessive radiation poses health risks due to the formation of free radicals and the potential development of skin cancer. Therefore, it is crucial to adopt protective measures, such as the use of sunscreens. Given the current search for options that cause fewer negative effects on ecosystems and the evidence of cumulative and toxic effects of synthetic sunscreens, especially in the marine environment, higher plants emerge as an important source for new discoveries. Previous studies conducted with the green fruits of *Eugenia umbelliflora* have demonstrated the prevalence in their chemical composition of phenolic compounds of the floroglucinol class, prompting an investigation into their antioxidant and photoprotective potential. In light of this, the present study aimed to investigate the photoprotection and antioxidant potential of extracts from the green fruits of *E. umbelliflora* obtained by supercritical fluid extraction (SFE), a technique that uses CO<sub>2</sub> as a solvent and reinforces the pursuit of green chemistry. The sun protection factor spectrophotometric (SPF) was evaluated by the in vitro method of Mansur, and the antioxidant activity was assessed by the DPPH radical consumption method. The extracts obtained by SFE showed an average SPF of 21.86 when evaluated at a concentration of 60 µg/mL (A: 13.78 ± 0.0043; B: 7.77 ± 0.016; C: 22.85 ± 2.14; D: 14.02 ± 0.0002; E: 7.60 ± 0.013; F: 14.52 ± 0.011; G: 14.87 ± 0.007; H: 13.86 ± 0.002), with the highlight being extract C, which falls into the category of medium protection as recommended by Anvisa (RDC No. 30, June 1, 2012). To investigate the antioxidant activity, extract A was chosen as the initial focus of the study. Extract A showed an EC<sub>50</sub> of 900 µg/mL, indicating the photoprotective potential of the extracts obtained by SFE and moderate antioxidant activity, revealing the potential of extracts from this plant species and encouraging further studies in light of the possibility of application as an active pharmaceutical ingredient in dermocosmetics.

**Keywords:** Bagaçu, eugenials, photoprotection, antioxidant, DPPH, SPF

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Partes aéreas de <i>E. umbelliflora</i> O. Berg.	19
Figura 2.	Floroglucínóis-sesquiterpenos isolados dos frutos verdes de <i>E. umbelliflora</i> .	20
Figura 3.	DPPH utilizado nas análises	24
Figura 4.	Materiais utilizados para o preparo da solução de DPPH	24
Figura 5.	Solução de DPPH pronta	24
Figura 6.	Frutos imaturos de <i>E. umbelliflora</i>	25
Figura 7.	Frutos com pontos de maturação de <i>E. umbelliflora</i>	25
Figura 8.	Frutos secos de <i>E. umbelliflora</i>	26
Figura 9.	Peneira utilizada no processo final de moagem	26
Figura 10.	Frutos moídos de <i>E. umbelliflora</i>	26
Figura 11.	Esquema representativo de preparo das diluições	27
Figura 12.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato A	28
Figura 13.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato B	29
Figura 14.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato C	30
Figura 15.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato D	31
Figura 16.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato E	32
Figura 17.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato F	33
Figura 18.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato G	34
Figura 19.	Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato H	35
Figura 20.	Análise comparativa dos valores de FPS para os distintos extratos	36
Figura 21.	Estabilização do radical de DPPH	38
Figura 22.	Diluições do extrato C utilizadas para o ensaio de DPPH	38
Figura 23.	Análise preliminar com o extrato C (20 - 200 $\mu$ g/mL) pelo método DPPH no tempo 0	39
Figura 24.	Análise com o extrato C (20 - 200 $\mu$ g/mL) pelo método de DPPH no tempo 30 minutos	39
Figura 25.	Teste inicial com extrato C na concentração de 1000 $\mu$ g/mL. 1 - Branco, 2 - solução 1000 $\mu$ g/mL e 3 - controle positivo, respectivamente	40

Figura 26.	Soluções do extrato A em diferentes concentrações no tempo 30 minutos	41
Figura 27.	Gráfico de AA% x Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o extrato A	42
Figura 28.	Gráfico de dispersão da AA% do extrato	42
Figura 29.	Gráfico da estimativa da EC50	43

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Extratos obtidos por fluido supercrítico	22
Quadro 2.	Valores das constantes de EE x I determinada por Sayre (1979).	23
Quadro 3.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato A	27
Quadro 4.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato B	28
Quadro 5.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato C	29
Quadro 6.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato D	30
Quadro 7.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato E	31
Quadro 8.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato F	32
Quadro 9.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato G	33
Quadro 10.	FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato H	34
Quadro 11.	Resultados de absorvância do branco e solução 1000µg/mL	40
Quadro 12.	Investigação da Atividade Antioxidante (AA) do extrato A	41
Tabela 1.	Comparação do valor de FPS de todos os extratos	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESC	Extração por fluido supercrítico
FPS	Fator de Proteção Solar
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LATESC	Laboratório de termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
UV	Ultravioleta
FC	Fator de correção
EE( $\lambda$ )	Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda
I( $\lambda$ )	Intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1 Aspectos gerais sobre fotoproteção	17
3.2 <i>Eugenia umbelliflora</i> O. Berg	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1 Material Vegetal	21
4.2 Obtenção dos extratos	21
<b>5 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEAÇÃO SOLAR (FPS)</b>	<b>22</b>
5.1 Preparo da solução mãe	22
5.2 Preparo das soluções de extratos	22
5.3 Investigação do fator de proteção solar (FPS)	22
<b>6 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>23</b>
6.1 Método radicalar de DPPH	23
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
7.1 Coleta dos frutos	25
7.2 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)	26
7.2.1 Extrato (A) ESC ETOH 5%	27
7.2.2 Extrato (B) ESC ETOH 10%	28
7.2.3 Extrato (C) ESC 150 Bar/40°C	29
7.2.4 Extrato (D) ESC 200 Bar/40°C	30
7.2.5 Extrato (E) ESC 300 Bar/40°C	31
7.2.6 Extrato (F) ESC 150 Bar/50°C	32
7.2.7 Extrato (G) ESC 200 Bar/50°C	33
7.2.8 Extrato (H) ESC 300 Bar/50°C	34
7.2.9 Análise dos resultados	35
7.3 Investigação da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH	37
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A luz solar desempenha um papel fundamental na sobrevivência na Terra, trazendo uma ampla gama de benefícios. Ela é a principal fonte de obtenção de vitamina D no organismo humano, a qual desempenha papéis essenciais. Entre eles, destacam-se a absorção de cálcio no intestino, fortalecendo assim o tecido ósseo, a estimulação da secreção de insulina, a reabsorção de cálcio nos glomérulos na porção do túbulo distal, e o fortalecimento do sistema imunológico e muscular, dentre outros benefícios (BIKLE, 2021). No entanto, existe um paradoxo importante em relação aos benefícios da luz solar no metabolismo. Isso ocorre porque a radiação ultravioleta (UVA, UVB e UVC - subdividida de acordo com o comprimento de onda), pode penetrar nas camadas mais profundas da pele e provocar alterações no DNA, visto que as pirimidinas sofrem alterações fotoquímicas, das quais podem ser mimetizadas por meio de enzimas (como: DNA polimerase I, DNA ligase, ABC excinuclease) que atuam na reparação do conteúdo. A exposição excessiva a luz solar pode causar inflamações, queimaduras e supressão imunológica e, quanto maior o contato com a radiação ultravioleta, maior a quantidade de reparo necessário, tornando as enzimas insuficientes para regularizar os processos metabólicos em sua integralidade, o que pode resultar em alterações celulares que aumentam o risco de câncer, problemas dermatológicos e fotoenvelhecimento (BALOGH et al., 2011; NISHIGORI et al., 2023).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele é a forma mais comum de câncer no mundo, representando 27% de todos os tumores malignos no Brasil. É um assunto de extrema importância que requer atenção adequada, tanto em termos de implementação de tratamentos e principalmente, medidas de prevenção. É amplamente reconhecido que a exposição à luz solar é a principal causa do câncer de pele, visto que a luz ultravioleta induz mutações somáticas carcinogênicas por causar fotolesões nas bases nitrogenadas do DNA. Portanto, é essencial adotar medidas para proteção, como o uso diário de protetor solar (INCA, 2020; NISHIGORI et al., 2023).

Nesse contexto, é importante ressaltar outra consequência significativa da exposição à luz ultravioleta no organismo, sua capacidade oxidante. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado na camada de valência, tornando-os altamente reativos. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas normalmente formadas durante o consumo de oxigênio no metabolismo celular, e o corpo possui mecanismos para neutralizá-las, por meio de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Nesse contexto, a radiação UV estimula a formação desses radicais, o que pode levar a um

desequilíbrio oxidativo, do qual poderá apresentar danos às biomoléculas quando o estresse oxidativo prevalece. Estudos indicam que o estresse oxidativo está diretamente ligado ao câncer, uma vez que a molécula de DNA é sensível ao ataque de radicais hidroxila, causando modificações nas bases nitrogenadas (BALOGH et al., 2011; KLAUNIG, 2019).

Sendo assim, a utilização de protetores solares entra como uma alternativa para auxiliar nesse processo, visto que é capaz de bloquear a radiação UV e reduzir a formação de radicais livres. Além disso, o uso de agentes antioxidantes também é benéfico, uma vez que eles capturam os elétrons desemparelhados e diminuem sua reatividade.

Outro fator importante a ser destacado são os efeitos negativos dos protetores solares no organismo animal. Variados estudos relatam os efeitos negativos dos filtros solares sintéticos, como problemas reprodutivos, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (KRAUSE et al, 2012), aumento do estresse oxidativo (SHRIVASTAVA et al, 2013) e danos no DNA (MAKUMIRE et al, 2014).

Além dos efeitos ao organismo, outra preocupação é em relação aos efeitos negativos dos protetores solares sintéticos no ecossistema marinho. Esses protetores solares contêm compostos que não são facilmente biodegradáveis e podem se acumular no solo, nos oceanos, nas algas, nos peixes e nas aves terrestres, causando danos como o embranquecimento de corais e problemas reprodutivos e metabólicos em espécies marinhas. Essa acumulação pode, por sua vez, afetar os seres humanos, como evidenciado pela detecção desses compostos na urina e no leite materno (COUSELO-RODRÍGUEZ et al., 2022).

Um artigo publicado na revista *Analytica*, em 2015, compilou diferentes filtros solares sintéticos e os locais dos quais eles foram encontrados no organismo animal e no meio ambiente, dentre eles: sangue, urina, placenta humana, sêmen, leite materno, solo nigeriano, lagos na Alemanha dentre outros (GARCIA et al 2015).

Atualmente, estão sendo conduzidos estudos com o propósito de identificar alternativas naturais em plantas que possuam um alto fator de proteção solar (FPS), com o intuito de reduzir os impactos negativos no ecossistema marinho e buscar opções que sejam adequadas para formulações tópicas. Além de oferecerem proteção contra os raios solares, as plantas também podem atuar como antioxidantes, auxiliar na hidratação da pele e prevenir o fotoenvelhecimento e o surgimento de rugas (HE et al., 2021).

A ação antioxidante de extratos obtidos das folhas de *E. umbelliflora* já foi investigada (GOLDONI et al., 2019) porém os frutos não foram avaliados até o presente momento. Diante do exposto, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade

antioxidante e fotoprotetora de extratos obtidos por extração por fluido supercrítico a partir dos frutos verdes de *E. umbelliflora*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Realizar investigação da atividade fotoprotetora e antioxidante *in vitro* de extratos obtidos por extração por fluido supercrítico dos frutos imaturos de *Eugenia umbelliflora*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar os frutos imaturos de *E. umbelliflora*;
- Analisar os extratos obtidos por extração por fluido supercrítico;
- Determinar o fator de proteção solar (FPSE) pelo método de Mansur, *in vitro*, dos extratos obtidos;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos obtidos por extração por fluido supercrítico pelo método do radical DPPH.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Aspectos gerais sobre fotoproteção

A radiação ultravioleta proveniente da luz solar é não ionizante e capaz de promover excitação eletrônica levando ao desenvolvimento do câncer de pele por alterações no DNA. O uso de protetor solar é a principal medida preventiva, e, para garantir a máxima proteção, é crucial que a indústria farmacêutica esteja constantemente desenvolvendo novas tecnologias adaptadas aos usuários (SANTOS et. al, 2018).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que o FPS mínimo para ser comercializado um protetor solar é de 6,0: Sem proteção ( $0,0 \leq \text{FPS} \leq 5,9$ ), baixa proteção ( $6,0 \leq \text{FPS} \leq 14,9$ ), média proteção ( $15,0 \leq \text{FPS} \leq 29,9$ ), alta proteção ( $30,0 \leq \text{FPS} \leq 50,0$ ) e muito alta proteção ( $> 50$ ) (ANVISA, 2012). Portanto, deve ser levado em consideração esses resultados para caracterizar um extrato como tendo uma boa atividade fotoprotetora.

No presente momento, existe uma ampla variedade de marcas de protetores solares, todas com o objetivo comum de preservar a pele contra os danos causados pelos raios solares, e a presença de excipientes sintéticos nessas formulações pode representar uma grande preocupação ao entrar em contato com a vida marinha, visto que, alguns desses compostos têm a capacidade de bioacumular nos corais, algas e peixes, podendo ser ingeridos pelos seres humanos que consomem esses organismos. Essa cadeia de bioacumulação traz preocupações ambientais e de saúde, já que esses ativos e excipientes podem ter efeitos negativos nos organismos aquáticos e ser transmitidos para a cadeia alimentar humana (CARVE et al., 2021; CADENA-AIZAGA et al., 2020).

Sendo assim, é notável que há uma busca pelo aperfeiçoamento de formulações, visando atender às necessidades individuais dos consumidores e, ao mesmo tempo, adotar práticas sustentáveis que não agridam o meio ambiente ou contribuam para o desequilíbrio ecológico. Isso inclui a redução do uso de excipientes, assim como os ativos cosméticos com ação fotoprotetora, sintéticos e a exclusão de ingredientes de origem animal em suas composições.

O método de Mansur é um ensaio *in vitro* de investigação do potencial fotoprotetor com boa correlação com os *testes in vivo*, uma vez que relaciona a absorvância da substância em questão com o efeito eritematoso da radiação e a intensidade da luz em comprimentos de

ondas (Mansur *et al.*, 1986). A partir dos dados coletados e eficiência de proteção observada nos materiais vegetais investigados direciona-se à investigação *in vivo*.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uma substância ser considerada fotoprotetora deve apresentar um valor de FPS de no mínimo 6. Por definição da Anvisa um protetor solar é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação. Dependendo do grau de FPS de um substância a mesma pode ser enquadrada em quatro categorias, sendo elas: 1) Baixa proteção, FPS: 6,0-14,9; 2) Média proteção, FPS: 15,0-29,9; 3) Alta proteção, FPS: 30,0-50,0 e 4) Proteção muito alta, FPS: maior que 50,0 e menor que 100 (BRASIL, 2012).

### **3.2 *Eugenia umbelliflora* O. Berg**

A espécie medicinal *E. umbelliflora*, (Figura 1) pertencente à família Myrtaceae, é conhecida popularmente por guapê, baguaçú ou guamirim e amplamente utilizada na medicina popular como antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória, digestiva e diurética (REITZ, 1969). A planta é encontrada nas restingas dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, com expressiva dispersão pelo litoral Catarinense (LEGRAND, KLEIN, 1969).

O estudo fitoquímico, realizado anteriormente, a partir das folhas, levou ao isolamento de compostos da classe dos triterpenos (MEYRE-SILVA *et al.*, 2009); e dos frutos cinco floroglucinois inéditos identificados como eugenial A (1), eugenial B (2), eugenial C (3), eugenial D (4), e eugenial E (5) (Figura 2) (FAQUETI *et al.*, 2013; FAQUETI *et al.*, 2015; FARIAS *et al.*, 2018). Dos compostos isolados dos frutos foi observado a importância biológica do eugenial A pela propriedade anti-leishmania (CECHINEL *et al.*, 2013), do eugenial C e eugenial D como antimicrobianos (FAQUETI *et al.*, 2015), além da atividade citotóxica frente as células tumorais para ambos eugeniais C, D e E (FARIAS *et al.*, 2018).

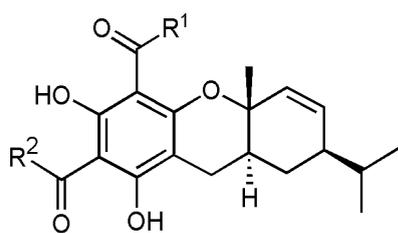
**Figura 1.** Partes aéreas de *E. umbelliflora* O. Berg.



*Fonte:* O autor.

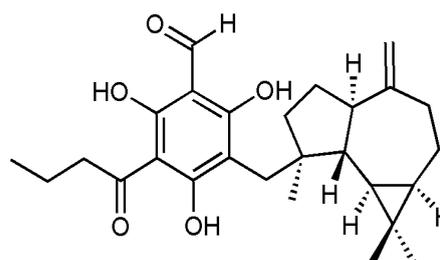
Na temática eleita para o estudo, visando a busca de um fitoterápico antioxidante e fotoprotetor, os frutos de *E. umbelliflora* se enquadram uma vez que os compostos majoritários tratam-se de compostos fenólicos contendo como estrutura base o benzeno-1,3,5-trihidroxi. Especificamente os compostos isolados dos frutos se enquadram na terminologia meroterpenóides uma vez que o floroglucinol, derivado da via biossintética dos compostos fenólicos, encontra-se ligado a uma parte estrutural, derivado da via biossintética dos terpenos, com unidades isoprênicas e, desta forma, origina metabólitos híbridos identificados como adutos terpênicos de floroglucinol com vasta aplicação terapêutica e patentes desenvolvidas (SINGH *et al.*, 2009).

**Figura 2.** Floroglucinóis-sesquiterpenos isolados dos frutos verdes de *E. umbelliflora*.

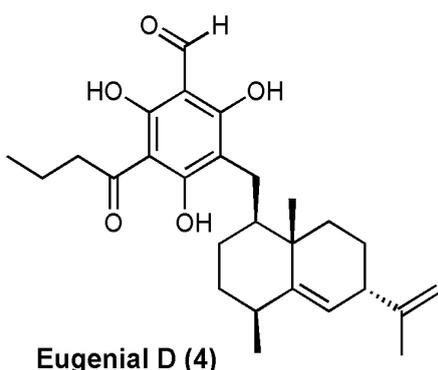


**Eugenial A (1)** R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

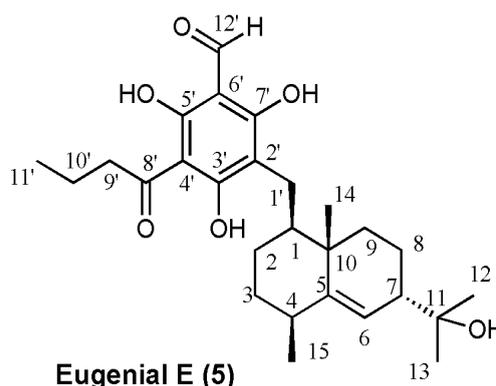
**Eugenial B (2)** R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = H



**Eugenial C (3)**



**Eugenial D (4)**



**Eugenial E (5)**

A atividade antioxidante relatada para compostos fenólicos já é bastante divulgada e refere-se principalmente a sua capacidade de captar os radicais livres promovendo sua estabilização pela presença de hidroxilas fenólicas e efeito de transferência de hidrogênio ou por doar elétron ao radical (CHERUBIM *et al.*, 2019). Não somente os componentes fenólicos podem exercer sua ação antioxidante como podem também suplementar formulações conforme estudos realizados por He *et al.*, 2021 onde enfatizam esta possibilidade.

A planta *E. umbelliflora* revela-se como uma fonte promissora para o desenvolvimento de um fitoterápico com múltiplos benefícios para a saúde. A compreensão dos efeitos fotoprotetores e antioxidantes dos frutos contribuirá para ampliação do conhecimento sobre o potencial terapêutico dessa espécie vegetal com possibilidades futuras de continuidade para o desenvolvimento de um cosmético. Aliado ao efeito fotoprotetor, agregar uma ação antioxidante ao produto tem sido um dos objetivos no desenvolvimento de novos produtos uma vez que esta combinação tem revelado ação superior no que se refere à supressão da pigmentação, redução de espécies radicalares e redução na expressão de metaloproteases (YEAGER, LIM, 2019)

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Material vegetal**

Novos frutos de *E. umbelliflora* foram coletados em Junho de 2023, no município de Florianópolis, SC, Brasil ((27°36 '00.1 "S 48°31' 24.0"W). Uma excicata encontra-se depositada no Herbarium Barbosa Rodrigues (HBR), na cidade de Itajaí (SC), sob o número VCFilho50.

Ao realizar as coletas, procedeu-se à pesagem dos frutos para avaliação da diferença de massa após secagem, da qual foi feita na estufa a 50°C por 6 dias.

Posteriormente, os frutos já secos foram triturados utilizando processador de bancada, conteúdo triturado foi embalado a vácuo e armazenados para futuras atividades, visto que, para realização das análises deste trabalho foram utilizados extratos já prontos.

### **4.2 Obtenção dos extratos**

A extração por fluido supercrítico é uma técnica que envolve a alteração da pressão e temperatura de gases, geralmente dióxido de carbono, levando-os a um estado intermediário conhecido como "supercrítico". Nesse estado, eles se comportam como uma mistura de gás e líquido, podendo atuar como solvente para a maioria das moléculas orgânicas (MAUL. A. et al, 1996).

Esse método de extração apresenta diversas vantagens, sendo uma delas o fato de não utilizar solventes em seu processo, o que favorece a prática da química verde. A Extração Supercrítica (ESC) foi realizada em colaboração com o Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) e conduzido sob supervisão do professor Marcelo Lanza, no qual foram alterados parâmetros de pressão (300, 200 e 150 Bar) e temperatura (50°C e 40°C), com o objetivo de investigar se esses parâmetros influenciam na qualidade do extrato. Os ESC ETOH são os extratos dos quais foram adicionados etanol, isso resultou em aumento do rendimento. Abaixo estão listados os extratos obtidos (Quadro 1).

Quadro 1. Extratos obtidos por fluido supercrítico.

Código extrato	Condições extrativas (Pressão e T)
A	ESC ETOH 5%
B	ESC ETOH 10%
C	ESC 150 Bar/40°C
D	ESC 200 Bar/40° C
E	ESC 300 Bar/40° C
F	ESC 150 Bar/50° C
G	ESC 200 Bar/50° C
H	ESC 300 Bar/50° C

## **5 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

### **5.1 Preparo da solução mãe**

Para cada ensaio de FPS foi necessário preparar uma solução mãe na concentração de 200 µg/mL. Sendo assim, foram pesados 5mg de cada extrato e dissolvidos com etanol em um balão volumétrico de 25mL.

### **5.2 Preparo das soluções de extratos**

Os ensaios de FPS foram feitos em diferentes concentrações, a fim de avaliar o comportamento e caracterizar o extrato mais ativo, priorizando um FPS maior ou igual a 6. O objetivo principal foi identificar o extrato que apresentasse este fator de proteção ideal em uma menor concentração. Foram testados os extratos nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 140 e 200µg/mL. Os testes foram realizados em duplicata.

### **5.3 Investigação do fator de proteção solar (FPS)**

O FPS de cada amostra foi determinado por espectrofotometria seguindo o método *in vitro* de Mansur et al. (1986), do qual utiliza a equação a seguir (equação 1), em conjunto

com as informações expostas no quadro 2, para quantificar o fator de proteção solar por meio da absorvância da amostra em comprimentos de onda selecionados.

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

FPS= fator de proteção solar.

FC= fator de correção (=10).

EE( $\lambda$ ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda ( $\lambda$ ).

I( $\lambda$ ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ).

**Quadro 2.** Valores das constantes de EE x I determinada por Sayre (1979).

Comprimento de onda ( $\lambda$ , nm)	EE x I (normalizado)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,8390
320	0,0180
total	1

## 6 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 6.1 Método radicalar de DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH foi realizada conforme descrito por Kavoosi e colaboradores (2018), com algumas adaptações.

O DPPH utilizado na análise foi o da marca Fluka, e para preparo do reagente foram utilizados 0,002gramas do DPPH e completado com etanol 99% em um balão volumétrico de 25mL, obtendo uma concentração de 0,08mg/mL e molaridade de 0,2mmol. O solvente utilizado para preparo DPPH foi o mesmo utilizado para preparo das soluções dos extratos e respectivas diluições.

Figura 3 - DPPH utilizado nas análises



Fonte: Autor

Figura 4 - Materiais utilizados para preparo da solução de DPPH



Fonte: Autor

Figura 5 - Solução de DPPH pronta



Fonte: Autor

Para o ensaio, foram utilizados 1,5mL de cada diluição + 1,5mL do reagente. Para o branco foi utilizado 1,5 mL do etanol 99% + 1,5 mL do reagente. O ácido ascórbico foi empregado como controle positivo.

A atividade anti-radicalar foi avaliada mediante a elaboração de um gráfico baseado na variação da absorbância em função da concentração da amostra. O cálculo para efeito da atividade antioxidante foi realizado conforme equação 2.

**Equação 2**

$$AA\% = \frac{AbsB - AbsA}{AbsB} \times 100$$

Onde:

AA% = Atividade antioxidante

AbsB = Absorbância do Branco

AbsA = Absorbância da amostra

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Coleta dos frutos

Com o intuito de obter material vegetal para eventuais necessidades de novo preparo de extrato no final do mês de junho foram coletados os frutos para a pesquisa. A árvore responsável pela produção dos frutos está localizada no estacionamento do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (27°36 '00.1 "S 48°31' 24.0"W). Essa espécie de árvore é nativa da mata atlântica e é amplamente encontrada na região litorânea.

Ao realizar as coletas, procedeu-se à pesagem dos frutos, obtendo-se um total de 993,9779g de frutos imaturos (figura 6). Frutos com pontos de maturação (figura 7), evidenciados macroscopicamente pelo aparecimento da coloração vermelha, foram coletados indevidamente, mas foram separados no momento da secagem.

**Figura 6.** Frutos imaturos de *E. umbelliflora*



Fonte: autor

**Figura 7.** Frutos com pontos de maturação de *E. umbelliflora*



Fonte: autor

Os frutos foram previamente pesados antes do processo de secagem, a fim de avaliar a perda de massa durante esse período. Os frutos foram colocados na estufa a 50°C por um

período de 6 dias. Essa medida foi tomada para assegurar a integridade dos testes subsequentes, evitar o crescimento de fungos e preservar a qualidade da amostra.

Após o processo de secagem, o conteúdo foi pesado novamente, resultando em um total de 626,1456g de frutos imaturos, o que indica uma perda de aproximadamente 64% de massa (Figura 8).

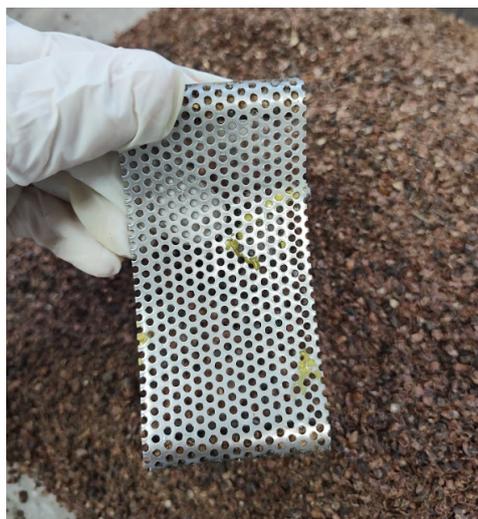
Em seguida, o conteúdo seco foi submetido à trituração processador de bancada, a fim de aumentar a superfície de contato e melhorar o rendimento dos extratos obtidos (Figura 9-10). Após a trituração, o material foi embalado à vácuo e armazenado para ser utilizado posteriormente caso os extratos já prontos não sejam suficientes ou não apresentem resultados satisfatórios.

**Figura 8.** Frutos secos de *E. umbelliflora*



Fonte: Autor

**Figura 9.** Peneira utilizada no processo final de moagem



Fonte: Autor

**Figura 10.** Frutos moídos de *E. umbelliflora*

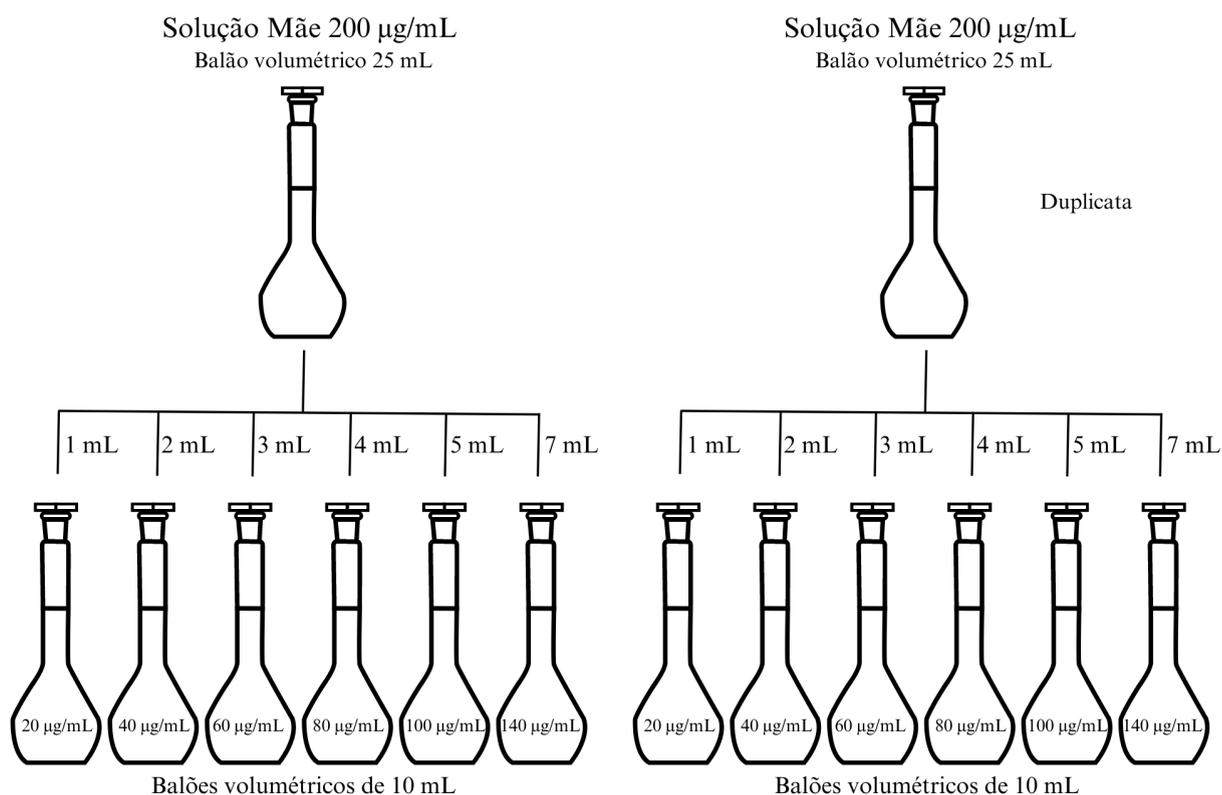


Fonte: Autor

## 7.2 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

O FPS de cada amostra foi determinado por espectrofotometria seguindo o método *in vitro* de Mansur et al. (1986), conforme descrito na metodologia. A figura 11 ilustra o preparo de cada solução extrativa submetida ao ensaio, obtidas a partir da solução mãe (200 µg/mL) com 7 diluições, em duplicata.

**Figura 11.** Esquema representativo de preparo das diluições.



**Fonte:** autor

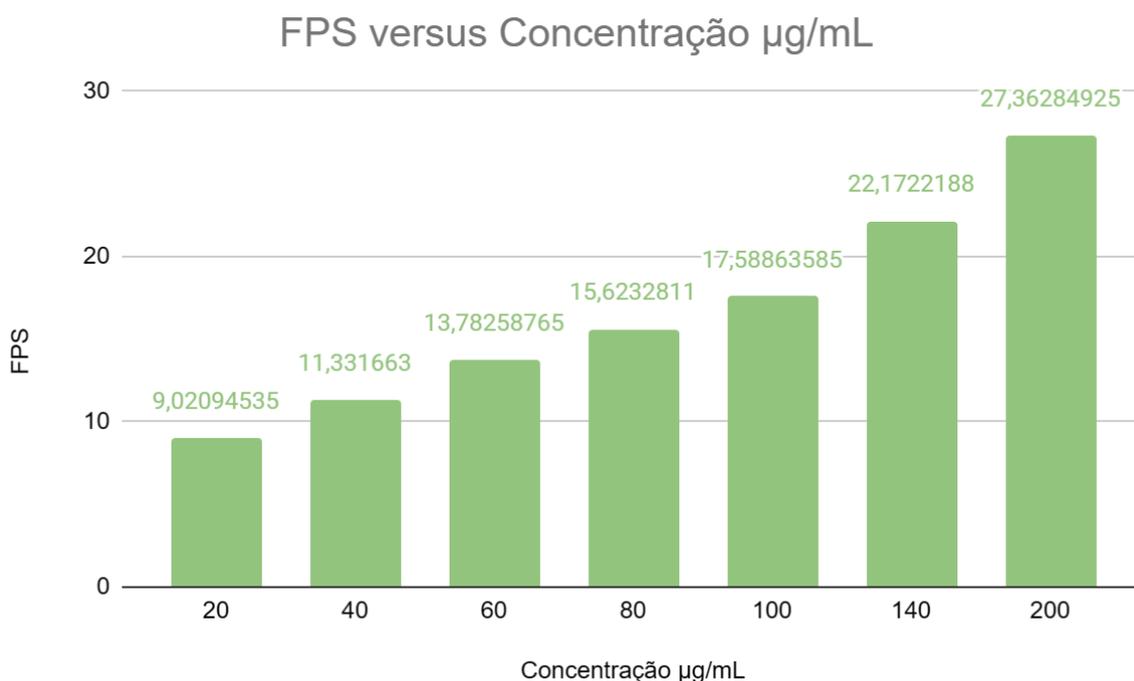
### 7.2.1 Extrato (A) ESC ETOH 5%

O extrato revelou um FPS de  $9,02 \pm 0,029$  na menor concentração (quadro 3). Conforme antecipado, observou-se um aumento do fator de proteção solar à medida que a concentração do extrato aumentou (figura 12), evidenciando a eficácia do método extrativo em extrair os compostos responsáveis por conferir a essa substância tal propriedade. Quando testado em sua maior concentração, o extrato A apresentou um FPS de  $27,36 \pm 0,0005$ .

**Quadro 3.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato A.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	9,021 $\pm 0,029$	11,332 $\pm 0,026$	13,782 $\pm 0,0043$	15,623 $\pm 0,0001$	17,589 $\pm 0,019$	22,172 $\pm 0,003$	27,363 $\pm 0,0005$

**Figura 12.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato A.



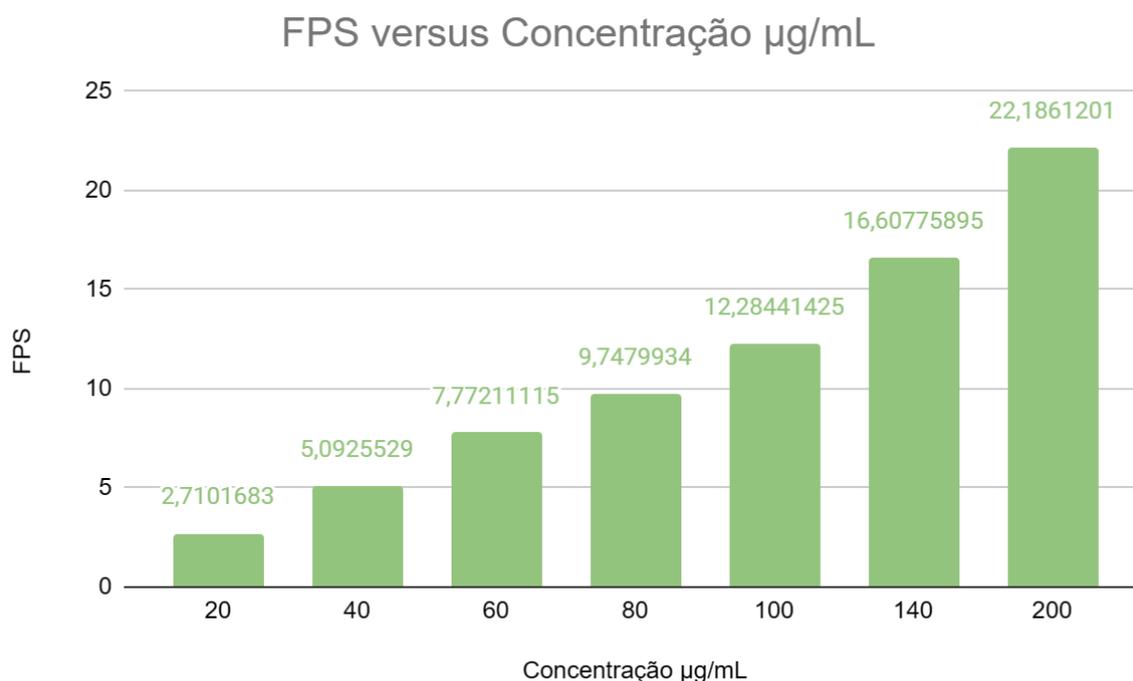
### 7.2.2 Extrato (B) ESC ETOH 10%

Conforme evidenciado na Figura 13, o extrato resultante da extração por fluido supercrítico, com adição de 10% de etanol a uma concentração de 60 µg/mL, apresentou um FPS superior a 6, considerado ideal pela ANVISA e classificado como de baixa proteção. No entanto, ao ser comparado com os demais extratos, seu perfil de proteção solar foi aproximadamente três vezes inferior, tornando sua utilização para fins posteriores menos vantajosa, visto que precisou de 80 µg/mL para apresentar um FPS próximo do extrato A.

**Quadro 4.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato B.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	2,710 ± 0,028	5,092 ± 0,032	7,772 ± 0,016	9,748 ± 0,044	12,592 ± 0,038	16,608 ± 0,082	22,186 ± 0,105

**Figura 13.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato B.



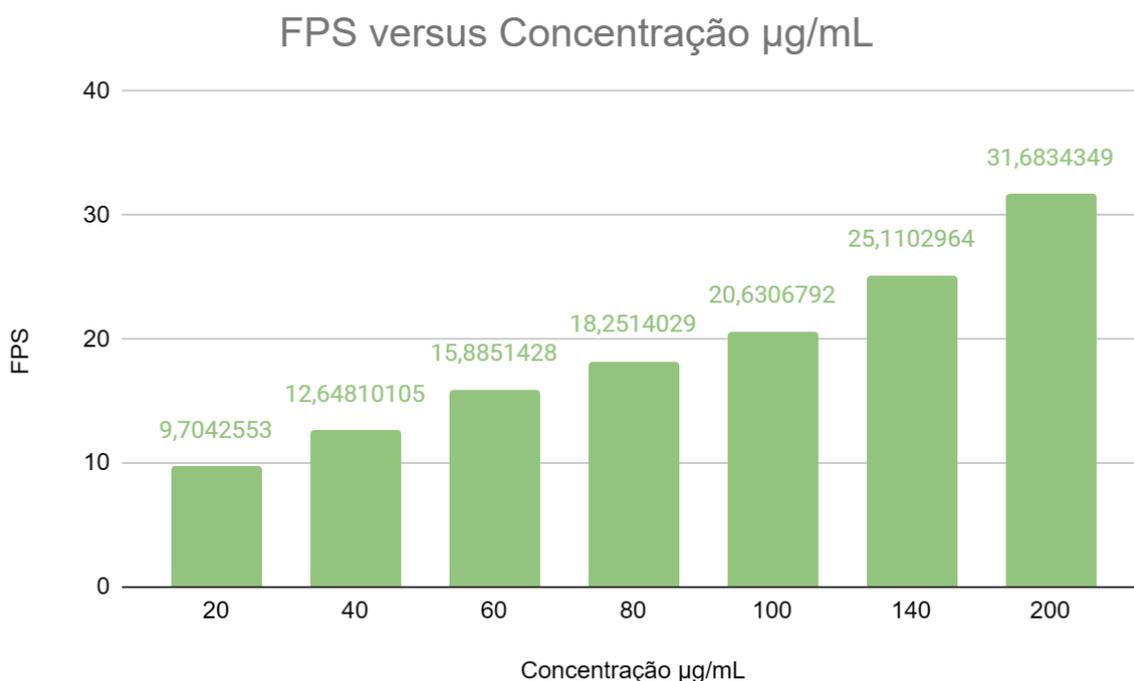
### 7.2.3 Extrato (C) ESC 150 Bar/40°C

Como pode ser observado na figura 14, o extrato obtido através da extração por fluido supercrítico a 150 bar e temperatura de 40°C na concentração de 20µg/mL revelou um FPS acima de 6, considerado ideal pela ANVISA, ou seja, sua menor concentração testada foi o suficiente para atingir o objetivo. Além disso, é interessante ressaltar que esse extrato foi o que atingiu os maiores valores de FPS, sendo considerado nessa análise, o extrato mais ativo.

**Quadro 5.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato C.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	9,704 ± 0,035	12,6485 ± 0,057	15,885 ± 0,022	18,251 ± 0,099	20,631 ± 0,112	25,110± 0,026	31,683 ± 0,122

**Figura 14.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato C.



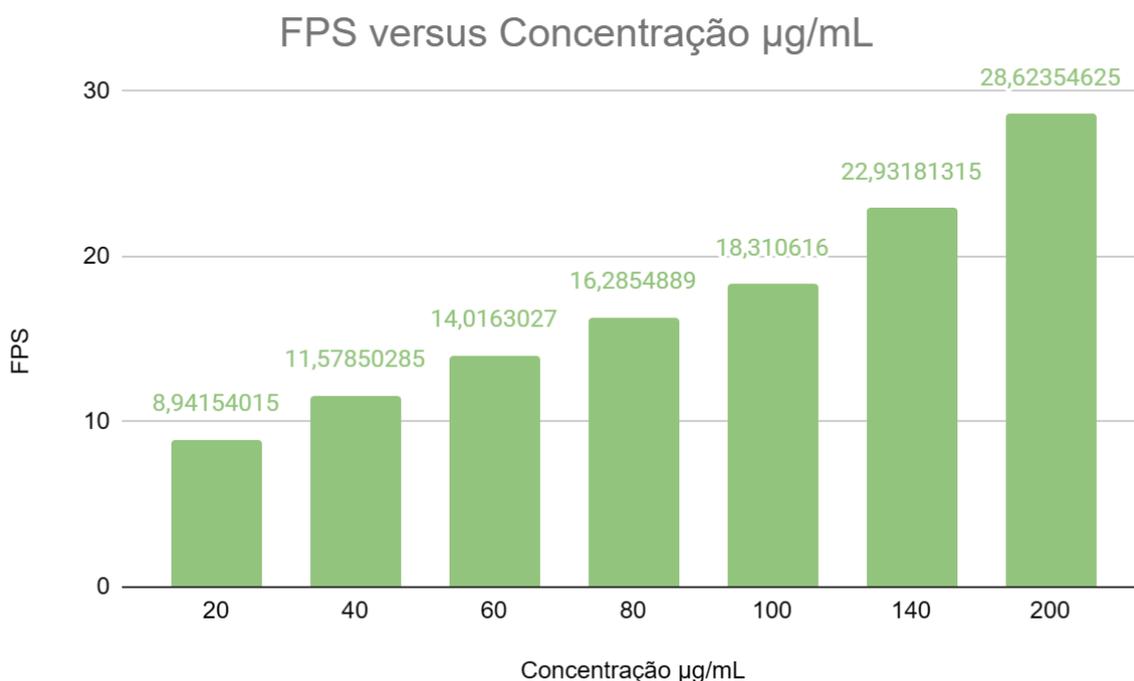
#### 7.2.4 Extrato (D) ESC 200 Bar/40°C

O extrato D, cujo os parâmetros extrativos foram pressão de 200 Bar a 40°C de temperatura apresentou em sua menor concentração testada um FPS superior ao desejado de 6. Quando comparado com os demais testados, não houve grande destaque em seu comportamento.

**Quadro 6.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato D.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	8,941 ± 0,022	11,578 ± 0,011	14,016 ± 0,0002	16,285 ± 0,039	18,311 ± 0,016	22,932 ± 0,035	28,623 ± 0,044

**Figura 15.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato D.



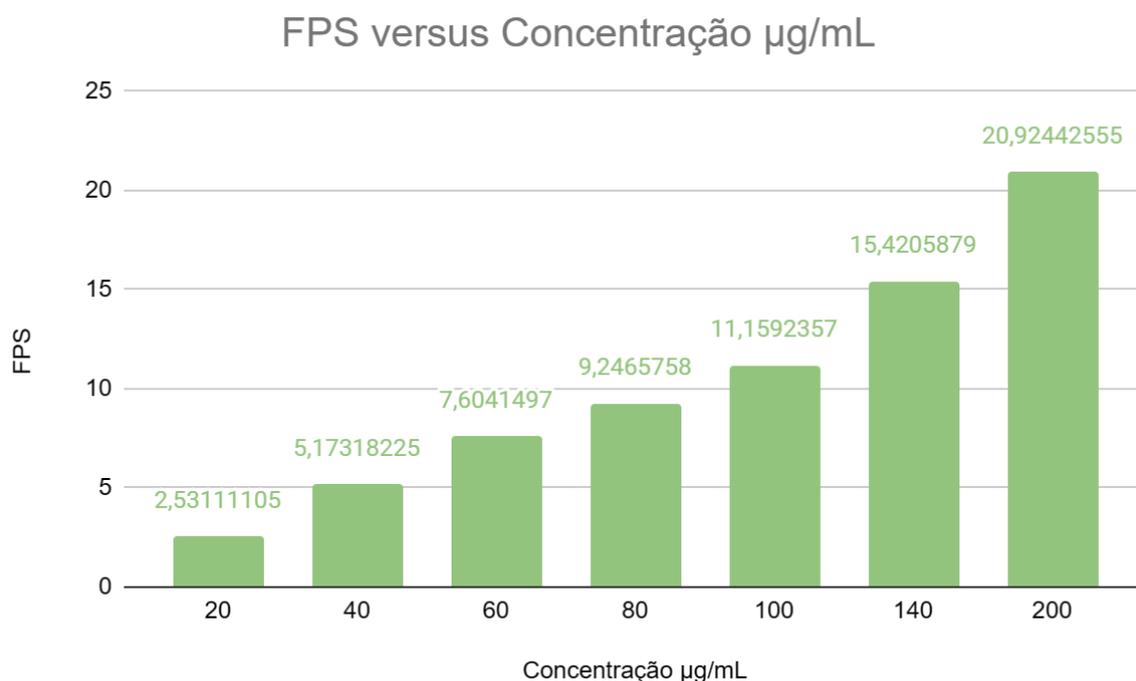
### 7.2.5 Extrato (E) ESC 300 Bar/40°C

O extrato E, obtido por meio de extração por fluido supercrítico a 300 Bar de pressão e 40°C de temperatura, foi o que apresentou menor FPS. Seu comportamento exibiu um padrão comparável ao extrato B. Para alcançar um FPS superior a 6, foi necessário utilizar uma concentração mais elevada de extrato, atingindo esse limiar somente na concentração de 60 µg/mL, em contraste com os demais extratos. Demonstrando que a pressão de 300 Bar e a temperatura de 40°C não favoreceram a extração.

**Quadro 7.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato E.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	2,531 ± 0,061	5,173 ± 0,135	7,604 ± 0,013	9,246 ± 0,118	11,159 ± 0,168	15,420 ± 0,224	20,924 ± 0,523

**Figura 16.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato E.



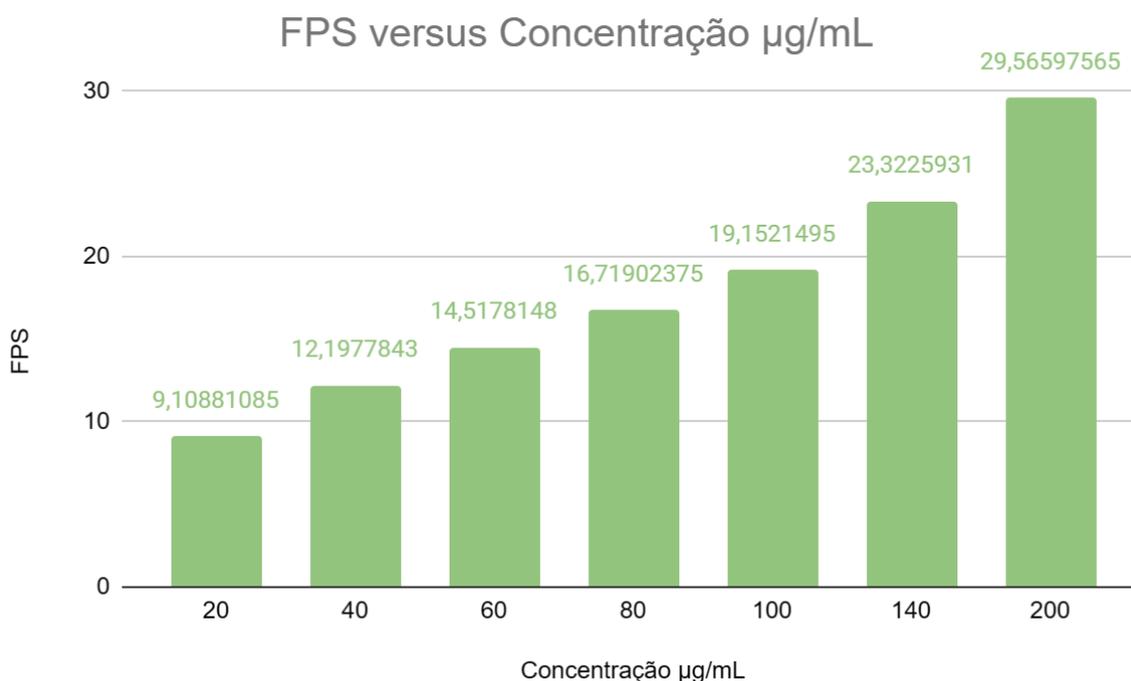
#### 7.2.6 Extrato (F) ESC 150 Bar/50°C

O extrato F, obtido por meio de extração por fluido supercrítico a uma pressão de 150 bar e 50°C revelou um comportamento semelhante aos demais extratos, visto que em sua menor concentração testada apresentou um valor de FPS em torno de 9, e em sua maior concentração testada um valor em torno de 30. Seus resultados foram superiores ao extrato B e E.

**Quadro 8.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato F.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	9,109 ± 0,001	12,198 ± 0,005	14,518 ± 0,011	16,719 ± 0,009	19,152 ± 0,014	23,322 ± 0,007	29,566 ± 0,011

**Figura 17.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato F.



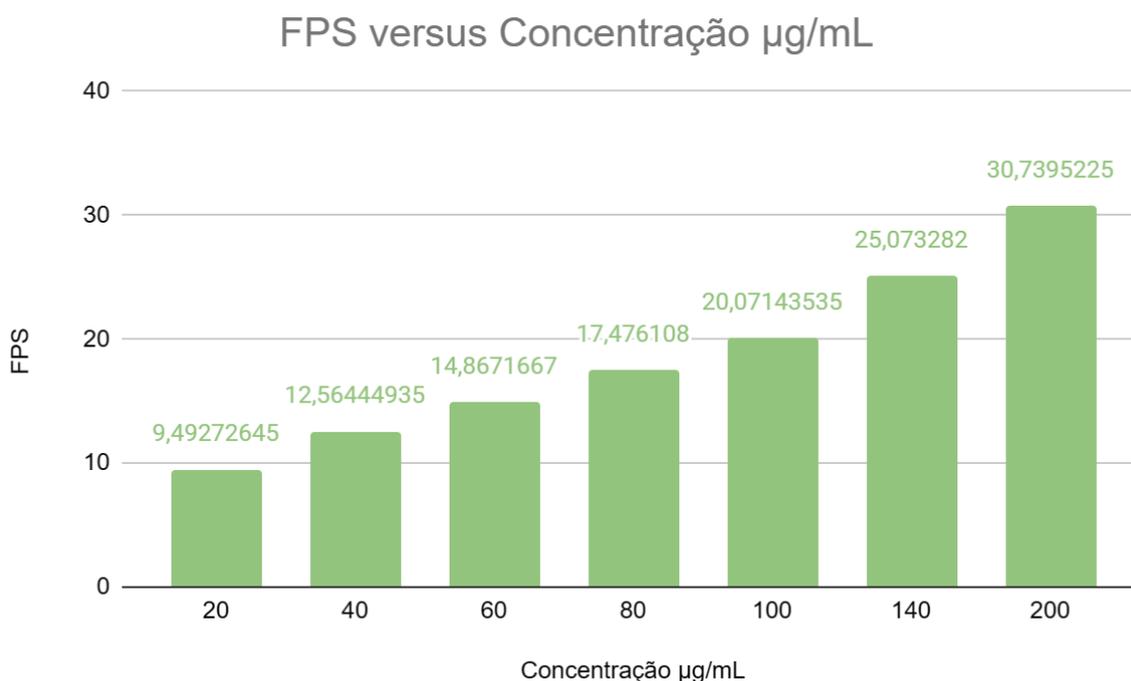
### 7.2.7 Extrato (G) ESC 200 Bar/50°C

O extrato G, assim como o A e o H, apresentaram em sua menor concentração testada um FPS superior a 9, atendendo ao desejado e com um bom perfil fotoprotetor. Assim como os demais extratos, o FPS aumenta gradativamente com o aumento da concentração. Em sua maior concentração testada, o FPS foi o segundo maior, com valor de  $30,74 \pm 0,004$ , perdendo apenas para o extrato C com o valor de  $31,68 \pm 0,122$ .

**Quadro 9.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato G.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	9,493 $\pm 0,006$	12,564 $\pm 0,006$	14,867 $\pm 0,007$	17,476 $\pm 0,006$	20,071 $\pm 0,004$	25,073 $\pm 0,036$	30,739 $\pm 0,004$

**Figura 18.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato G.



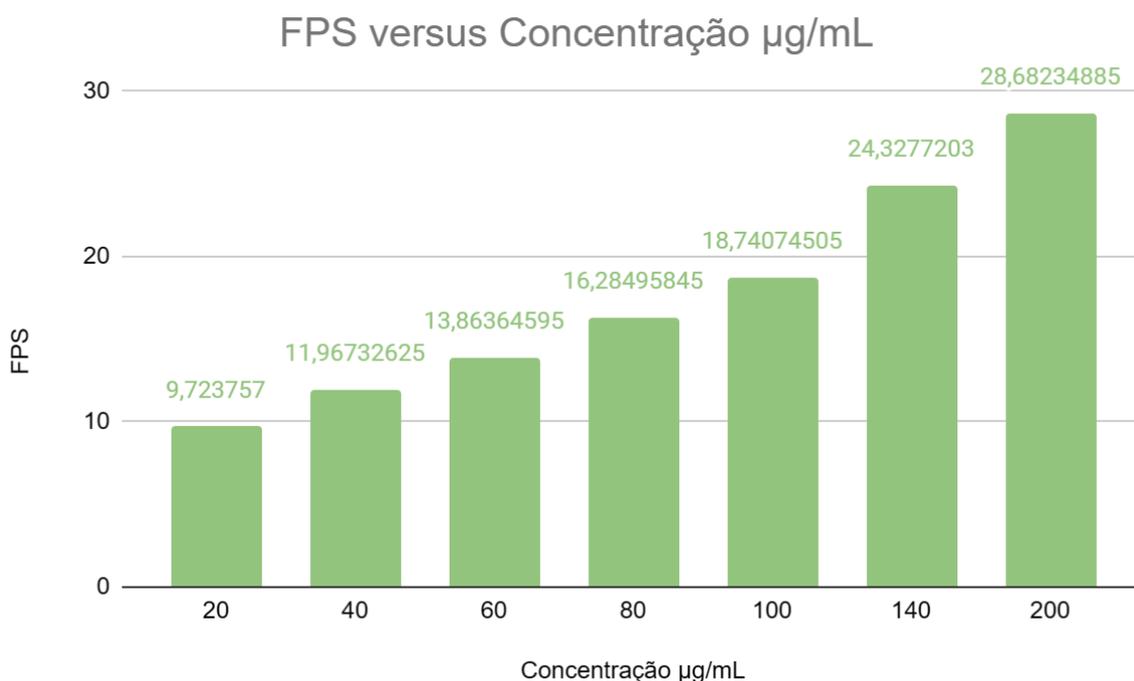
### 7.2.8 Extrato (H) ESC 300 Bar/50°C

Por fim, o extrato H, cujo seus parâmetros de extração foram pressão de 300 Bar e temperatura de 50°C, apresentou em sua menor concentração testada o valor de  $9,73 \pm 0,066$ , sendo o maior FPS obtido na concentração de 20 µg/mL comparativamente aos demais extratos, no entanto, embora obedeça o padrão de aumentar o fator de proteção solar com o aumento da concentração, seus resultados são inferiores ao extrato C, que em sua maior concentração testada atingiu um valor de  $31,68 \pm 0,122$  vs os  $28,68 \pm 0,022$  do extrato H.

**Quadro 10.** FPS das diferentes concentrações testadas para o extrato H.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
FPS	9,724 ± 0,066	11,967 ± 0,008	13,864 ± 0,002	16,285 ± 0,004	18,741 ± 0,004	24,328 ± 0,006	28,682 ± 0,022

**Figura 19.** Gráfico do comportamento fotoprotetor do extrato H.



### 7.2.9 Análise dos resultados

Conforme descrito anteriormente, os extratos que apresentaram um FPS mais alto nos ensaios conduzidos foram os extratos A, C, D, F, G e H. Baseado nos resultados obtidos, espera-se que o extrato H, mesmo que tenha um comportamento semelhante aos demais, tenha vantagens na utilização para a incorporação em uma formulação cosmética, visto que é mais vantajoso a utilização de menor quantidade de extrato mais ativo do que maior quantidade de extrato menos ativo.

Além disso, vale destacar que os testes foram feitos em duplicata, e a diferença estatística não foi calculada, portanto, embora seja feita uma breve discussão sobre os resultados encontrados, é necessário posteriormente analisar se houve diferença estatística entre os valores apresentados para os diferentes extratos.

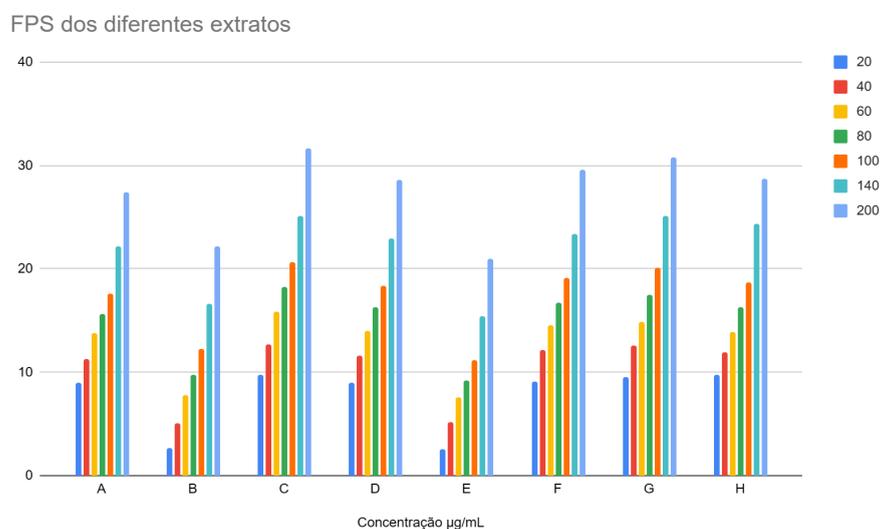
**Tabela 1.** Comparação do valor de FPS de todos os extratos.

Conc. (µg/mL)	20	40	60	80	100	140	200
<b>Extrato</b>	9,021	11,332	13,782	15,623	17,589	22,172	27,363
<b>A</b>	± 0,029	± 0,026	± 0,0043	± 0,0001	± 0,019	± 0,003	± 0,0005

<b>FPS</b>	<b>Extrato B</b>	2,710 ± 0,028	5,092 ± 0,032	7,772 ± 0,016	9,748 ± 0,044	12,592 ± 0,038	16,608 ± 0,082	22,186 ± 0,105
	<b>Extrato C</b>	9,704 ± 0,035	12,6485 ± 0,057	15,885 ± 0,022	18,251 ± 0,099	20,631 ± 0,112	25,110± 0,026	31,683 ± 0,122
	<b>Extrato D</b>	8,941 ± 0,022	11,578 ± 0,011	14,016 ± 0,0002	16,285 ± 0,039	18,311 ± 0,016	22,932 ± 0,035	28,623 ± 0,044
	<b>Extrato E</b>	2,531 ± 0,061	5,173 ± 0,135	7,604 ± 0,013	9,246 ± 0,118	11,159 ± 0,168	15,420 ± 0,224	20,924 ± 0,523
	<b>Extrato F</b>	9,109 ± 0,001	12,198 ± 0,005	14,518 ± 0,011	16,719 ± 0,009	19,152 ± 0,014	23,322 ± 0,007	29,566 ± 0,011
	<b>Extrato G</b>	9,493 ± 0,006	12,564 ± 0,006	14,867 ± 0,007	17,476 ± 0,006	20,071 ± 0,004	25,073 ± 0,036	30,739 ± 0,004
	<b>Extrato H</b>	9,724 ± 0,066	11,967 ± 0,008	13,864 ± 0,002	16,285 ± 0,004	18,741 ± 0,004	24,328 ± 0,006	28,682 ± 0,022

O gráfico abaixo traz um comparativo de todos os extratos testados em duplicata e os resultados obtidos em todas as concentrações, para que seja possível avaliar visualmente as diferenças entre eles (Figura 20).

**Figura 20.** Análise comparativa dos valores de FPS para os distintos extratos.



Portanto, conforme citado anteriormente, os extratos que apresentaram um FPS mais elevado foram os extratos C e G. Entretanto, análises estatísticas serão feitas em breve com o intuito de avaliar se houve diferença estatística nos valores de FPS dos extratos estudados. Sendo assim, é crucial que estudos subsequentes no desenvolvimento de um cosmético se dediquem a avaliar a quantidade e concentração ideais de extrato para a formulação, a fim de determinar qual extrato seria o mais adequado.

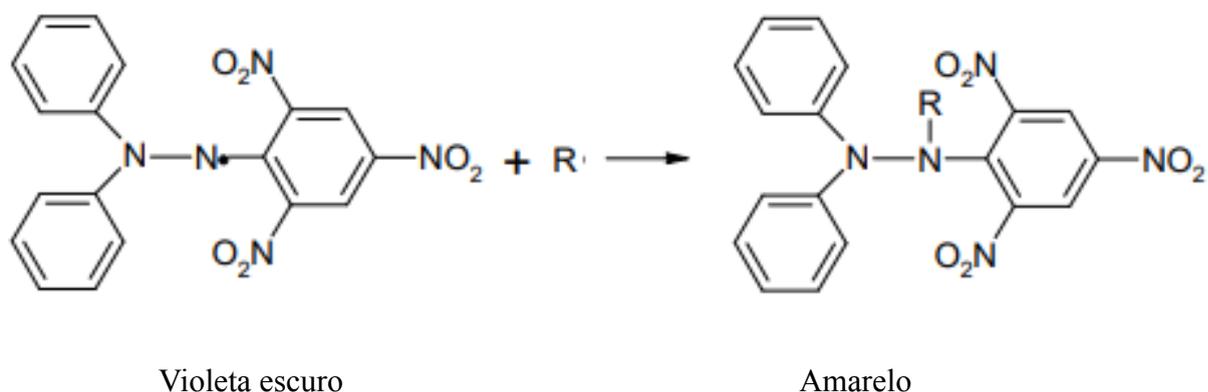
Um estudo conduzido na Colômbia em 2022 avaliou a atividade fotoprotetora de extratos obtidos de flores de diversas espécies de plantas ornamentais, incluindo a *Rosa centifolia*, *Posoqueria latifolia* e *Ipomoea horsfalliae*. Os resultados obtidos neste estudo foram promissores, evidenciando uma atividade fotoprotetora considerável. Contudo, para atingir um FPS acima de 6,0, foram necessárias concentrações de 125µg/mL para a *Rosa centifolia* rosa, *Posoqueria latifolia* e *Ipomoea horsfalliae*, e 250µg/mL para a *Rosa centifolia* fúcsia (FUENTES et al., 2022). Diante desses resultados, fica claro que a espécie vegetal *E. umbelliflora* apresenta um FPS *in vitro* superior à outras plantas estudadas, o que estimula a continuidade dos estudos para avaliar o valor de FPS em modelo *in vivo*.

### **7.3 Investigação da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH**

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da captura do radical DPPH-, seguindo a metodologia descrita por Goés (2017). O objetivo é determinar o consumo do radical livre DPPH nas amostras por meio da medida da diminuição da absorbância. Conforme esquema abaixo (figura 21), o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) que possui coloração violeta-escuro, na presença de uma substância antioxidante é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, sendo esta monitorada pelo decréscimo da absorbância (RUFINO et al 2007).

Pode-se dizer que o DPPH é um radical livre mais estável que aceita elétrons ou hidrogênios para se estabilizar. O modelo de sequestrante do DPPH é amplamente utilizado para a avaliação relativamente rápida de atividade antioxidante em comparação com outros métodos. Sua capacidade de redução é determinado pelo decréscimo da absorbância em 517 nm sendo este observado uma descoloração de roxo para amarelo, quando induzido por substâncias antioxidantes (SUCUPIRA et al 2015)

**Figura 21** - Estabilização do radical de DPPH.



Fonte: Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. 2007

Para dar início à investigação do potencial antioxidante dos extratos vegetais e avaliar se a planta em estudo, *E. umbelliflora*, apresentaria alguma atividade antioxidante, foi selecionado o extrato C para análise preliminar, visto que apresentou resultados superiores no ensaio de FPS. Seguindo as mesmas concentrações utilizadas no ensaio de FPS (20, 40, 60, 80, 100, 140 e 200 $\mu$ g/mL) (figura 22), foi realizado o ensaio de captura do radical de DPPH. Essa primeira análise foi utilizada de triagem para verificar se haveria mudança da coloração com as concentrações determinadas.

**Figura 22** - Diluições do extrato C utilizadas para o ensaio de DPPH



Fonte: Autor

A figura 23 representa o teste inicial realizado com o extrato C nas mesmas concentrações utilizadas no teste de fotoproteção (20 - 200  $\mu$ g/mL). Como pode ser observado, na concentração testada, o extrato C não apresentou efeito antiradicalar uma vez que não ocorreu a descoloração da solução contendo o radical DPPH quando comparado ao

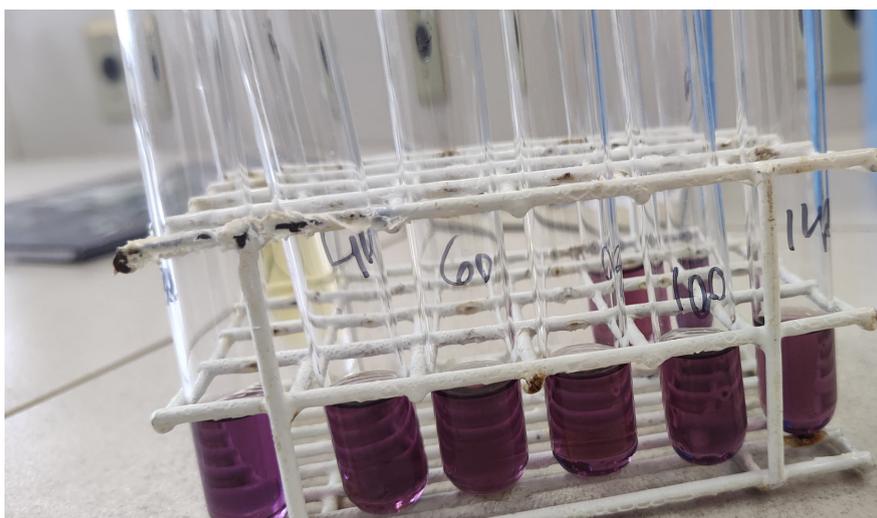
controle positivo (ácido ascórbico). Para esse ensaio, é necessário deixar as amostras reagirem por 30 minutos em ambiente escuro, e após medir a absorbância em 517nm.

**Figura 23** – Análise preliminar com o extrato C (20 - 200ug/mL) pelo método DPPH no tempo 0.



Fonte: autor.

**Figura 24** - Análise com o extrato C (20 - 200ug/mL) pelo método DPPH no tempo 30 minutos.



Fonte: autor

Era esperado que os extratos manifestassem alguma alteração na coloração inicial, idealmente revelando um degradê em consonância com o aumento da concentração. No entanto, ao constatar que a coloração inicial foi mantida mesmo na maior concentração testada (200 $\mu$ g/mL), concluiu-se que as concentrações ensaiadas não exibem atividade antioxidante suficiente para provocar uma mudança visível na coloração do reagente. Dessa forma, optou-se por não realizar a medição da absorbância.

Com o intuito de obter resultados significativos, procedeu-se a uma nova análise utilizando o extrato C, desta vez em uma concentração cinco vezes superior à maior testada

anteriormente. Preparou-se, assim, uma solução de 1000µg/mL para verificar se os extratos de *E. umbelliflora* apresentam atividade antioxidante nessa concentração mais elevada.

A imagem abaixo (Figura 25) trazem respectivamente o branco, a solução de 1000µg/mL do extrato C e o controle positivo 30 minutos após a adição do reagente, mostrando visualmente alteração da coloração inicial, mostrando que em concentrações mais elevadas, a *E. umbelliflora* apresenta atividade antioxidante. Com essa manifestação visual, foi realizada a medida de absorbância com o objetivo de quantificar a atividade antioxidante.

**Figura 25** – Teste inicial com extrato C na concentração de 1000µg/mL. 1 - Branco, 2 - solução 1000µg/mL e 3 - controle positivo, respectivamente



Fonte: autor

A medida da absorbância do branco e da solução foi realizada a 517nm, revelando os resultados apresentados no Quadro 11.

**Quadro 11** - Resultados de absorbância do branco e solução 1000µg/mL.

	<b>Branco</b>	<b>Solução 1000µg/mL</b>
	1,3427	0,5632
$AA = [(Absorbância\ do\ branco - absorbância\ da\ amostra) / absorbância\ do\ branco] \times 100\%$ $AA = [(1,3427 - 0,5632) / 1,3427] \times 100\%$ <p style="text-align: center;">Atividade antioxidante = 58%</p>		

O resultado encontrado de atividade antioxidante do extrato C na concentração de 1g/mL foi de 58%. A partir dos resultados coletados optou-se em repetir o procedimento

utilizando distintas concentrações para encontrar a EC50, desta forma foram preparadas soluções nas seguintes concentrações 600, 800, 1000, 1200 e 1400µg/mL. No entanto, para dar procedência às análises, o extrato A foi escolhido por dois motivos: o primeiro era para obter um segundo resultado de atividade antioxidante na concentração de 1000µg/mL para avaliar se há diferença entre eles, e segundo pela quantidade do extrato A ser superior ao extrato C, podendo assim preparar as soluções de mais alta concentração que necessitam de maior massa. Além disso, ambos extratos apresentaram resultados semelhantes no teste de FPS.

Repetido o experimento realizado anteriormente com o extrato C, visualmente foi possível observar diferentes colorações após 30 minutos de adição do reagente como é como mostra a figura 26.

**Figura 26.** Soluções do extrato A em diferentes concentrações no tempo 30 minutos.



Fonte: Autor

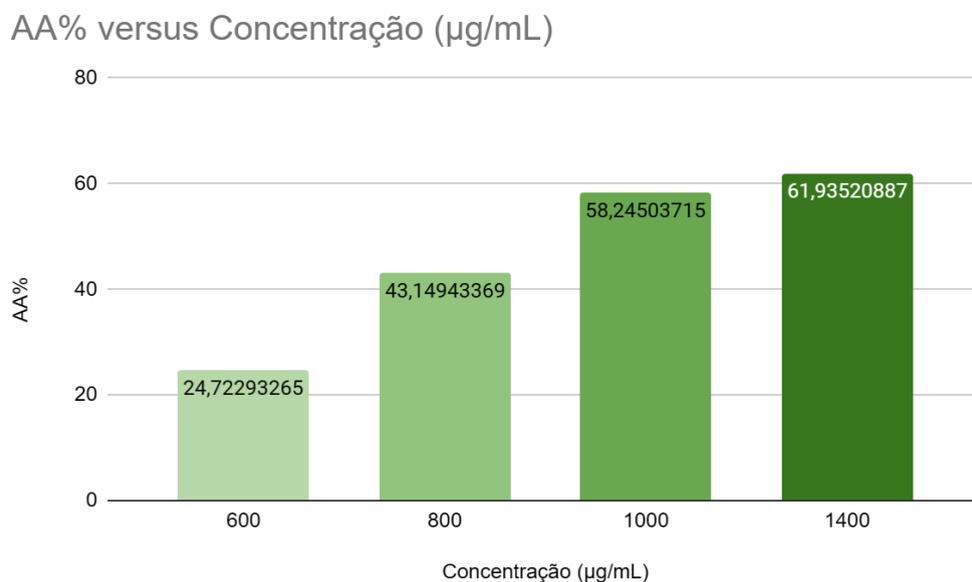
Em seguida foram lidas em espectrofotômetro a 517 nm, apresentando os resultados indicados no quadro abaixo.

**Quadro 12.** Investigação da atividade antioxidante (AA) do extrato A.

Concentração (µg/mL)	Absorbância	AA%
600	1,2362	24,72293265
800	0,9336	43,14943369
1000	0,6857	58,24503715
1400	0,6251	61,93520887
Branco	1,6422	-

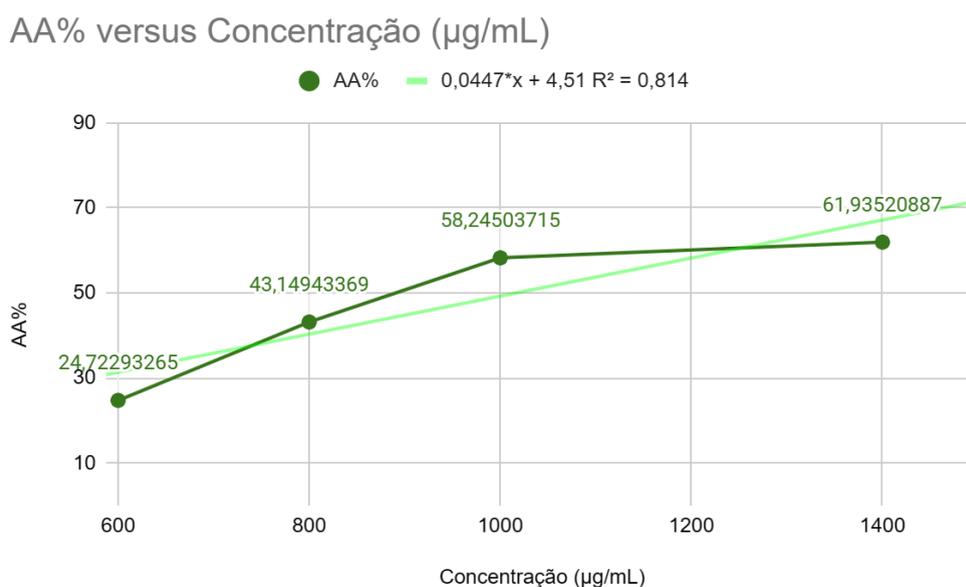
A partir dos resultados obtidos, gerou-se um gráfico para proporcionar uma visualização mais clara dos valores obtidos (Figura 27).

**Figura 27.** Gráfico de AA% x Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o extrato A.



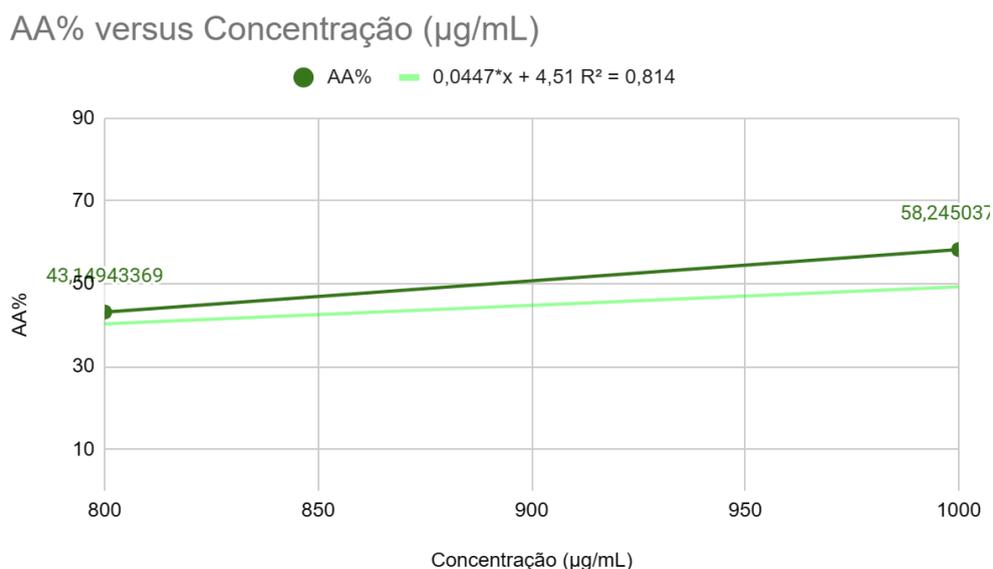
Como no ensaio de FPS é possível observar que a AA% aumenta com o aumento da concentração. Com os resultados gerados, foi elaborado um gráfico (Figura 28) de dispersão com o objetivo de obter a equação da reta para calcular o EC50.

**Figura 28.** Gráfico de dispersão da AA% do extrato A.



Conforme evidenciado na Figura 28, os resultados obtidos não seguiram uma tendência linear, refletindo um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) insatisfatório. Dessa forma, a determinação da EC50 pela equação linear tornou-se inviável. Entretanto, uma estimativa sugere que a concentração requerida para inibir 50% da atividade gire em torno de  $900\mu\text{g/mL}$ , conforme destacado no gráfico subsequente.

**Figura 29.** Gráfico de estimativa da EC50.



É crucial ressaltar que os ensaios preliminares sobre a atividade antioxidante dos extratos de *E. umbelliflora* representam apenas uma abordagem inicial, sendo necessário aprofundar a investigação. Isso se deve ao fato de que a atividade antioxidante foi avaliada exclusivamente pelo método de Mansur, sendo que há diversos outros métodos disponíveis para investigar essa propriedade. Além disso, os ensaios não foram conduzidos em duplicata, um componente essencial para assegurar a qualidade e fidedignidade dos resultados.

Um estudo publicado em 2019 analisou a atividade antioxidante dos polissacarídeos e derivados da *Momordica charantia* pelo método de DPPH. Em comparação com o presente estudo, as concentrações empregadas foram 10 vezes menores. O resultado obtido pelos pesquisadores revelou uma atividade antioxidante de 56% na concentração de  $3,2\text{ mg/mL}$ , demonstrando que comparativamente com a *Momordica charantia* a *E. umbelliflora* é mais ativa, visto que para atingir 58% de atividade antioxidante precisou de uma concentração de  $1\text{ mg/mL}$ . (CHEN et al. 2019).

Victoria e col. (2012) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* pelo método de DPPH. Como resultado de EC50, concentração necessária para

alcançar 50% da atividade, encontraram um valor de  $833.3 \pm 20.7 \mu\text{g/mL}$ , resultado próximo ao encontrado para o extrato dos frutos imaturos de *E. umbelliflora*.

Um terceiro estudo analisado investigou a atividade antioxidante de folhas e sementes de *Eugenia involucrata*, e observou uma grande diferença de EC50 para as duas partes, encontrando o valor de  $33,6\mu\text{g/mL} \pm 3,2$  para sementes e  $>350\mu\text{g/mL}$  para as folhas (GIRARDELO et al 2023). Evidenciando que uma mesma planta apresenta características distintas em uma composição que impactam diretamente em sua atividade. Os resultados apresentados por Girardelo et al mostram que a *Eugenia involucrata* é mais ativa que a *E. umbelliflora* no teste de DPPH.

É importante ressaltar que ainda não foi estabelecido um padrão definido para determinar o que constitui uma atividade antioxidante satisfatória em relação à concentração. Portanto, é possível que ambos os conjuntos de resultados possam ser empregados para propósitos distintos, sem que se possa categorizar de forma definitiva como bom ou ruim no contexto da atividade antioxidante.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no ensaio de Fator de Proteção Solar (FPS) foram altamente satisfatórios, alcançando o objetivo principal de encontrar um FPS igual ou superior a 6 nas concentrações mais baixas testadas. Todos os extratos exibiram essa característica, com a maioria registrando valores superiores a 9 em sua menor concentração testada. Isso evidencia a capacidade da *E. umbelliflora* em bloquear a radiação UV, instigando, assim, futuros estudos para o desenvolvimento de uma formulação de protetor solar de origem natural que incorpore extratos da planta.

É relevante ressaltar que os resultados do FPS *in vitro* não estão diretamente associados aos resultados do FPS do produto final a ser comercializado. Portanto, é imprescindível realizar outros testes após o desenvolvimento da formulação para avaliar se há aumento ou diminuição da atividade fotoprotetora da *E. umbelliflora*, e ainda, avaliar seu uso como adjuvante, e não apenas como principal filtro solar.

No âmbito da atividade antioxidante, as concentrações inicialmente testadas revelaram-se insuficientes para induzir qualquer alteração na coloração do reagente, indicando uma inadequação dessas concentrações para manifestar atividade antioxidante. Contudo, ao aumentar a concentração, tanto o extrato C quanto o extrato A alcançaram, a 1000µg/mL, uma atividade antioxidante de 58%, mostrando não haver diferença entre os dois métodos extrativos testados para o resultado final, porém com possibilidade de alterações para os demais extratos não testados, dando destaque ao B e E. Esse resultado de 58% abriu a possibilidade para a realização de novas análises com valores tanto superiores quanto inferiores, possibilitando, assim, uma análise mais detalhada do perfil antioxidante destes extratos.

Sendo assim, os resultados obtidos encorajam novos testes para avaliar a viabilidade da utilização dos frutos imaturos de *Eugenia umbelliflora* para o desenvolvimento de uma formulação de um produto cosmético de origem natural. Essa formulação teria como principal objetivo a proteção contra os danos provocados pela radiação UV e a formação de radicais livres, adicionalmente, colaborar com a sustentabilidade e preservação do meio ambiente, reduzindo a agressão que os produtos disponíveis no mercado causam ao ecossistema marinho.

## REFERÊNCIAS

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros em Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BIKLE, D. D. Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. **National Library of Medicine**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>>. Acesso em: 12 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 30, de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2012.

CADENA-AIZAGA, M. I.; MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 25, p. e00079–e00079, 1 mar. 2020.

CARVE, M.; NUGEGODA, D.; ALLINSON, G.; SHIMETA, J. Review. A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115-894, 2021.

CHEN, F; HUANG, G; YANG, Z; HOU, Y. Antioxidant activity of Momordica charantia polysaccharide and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 673–680, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019346161?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 nov. 2023.

CHERUBIM, D. J. L; MARTINS, C. V. B; FARIÑA, L. O. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 33–37, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jocd.13093>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

COUSELO-RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ-ESTEBAN, P. C.; DIÉGUEZ MONTES, M. P.; FLÓREZ, A. Impacto de los filtros ultravioleta en el entorno natural. **Actas dermo-sifiliográficas**. 113, n. 8, p. 792–803, 1 set. 2022.

FAQUETI, L.G.; PETRY, C.M.; MEYRE-SILVA, C.; MACHADO, K.E.; BELLA CRUZ, A.; GARCIA, P.A.; CECHINEL-FILHO, V.; FELICIANO, A.S.; MONACHE, F.D. Euglobal-like compounds from the genus *Eugenia*. **Natural Product Research**, v.27, n.1, p.28-31, 2013.

FAQUETI, L. G.; FARIAS, I. V.; SABEDOT, E. C.; MONACHE, F. D.; FELICIANO, A. S.; SCHUQUEL, I. T. A.; CECHINEL-FILHO, V.; CRUZ, A. B.; MEYRE-SILVA, C. Macrocarpal-like Compounds from *Eugenia umbelliflora* Fruits and Their Antibacterial Activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 63 p. 8151-8155, 2015.

FARIAS, I.V.; FAQUETI, L. G.; NOLDIN, V. F.; FRANCHI JUNIOR, G.; NOWIL, A. E.; SCHUQUEL, I. T. A.; DELLE MONACHE, F.; GARCÍA, P. A.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; SAN FELICIANO, A.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C. Cytotoxic Phloroglucinol Meroterpenoid from *Eugenia umbelliflora* fruits. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 187–192, 2018.

FARIAS, I. V.; AMORIM, C. M.; GRAFF, E.; BREIA, I.; DOS SANTOS, M. C.; NORBERTO, S.; FAQUETI, L. G.; BRESOLIN, T. M. B.; BELLA CRUZ, A.; MEYRE-SILVA, C. Improvement in phloroglucinol compound extracted from different parts of *Eugenia umbelliflora* monitored by LC-UV and antimicrobial activity. **Natural Products Research**, 4, p. 1-4, 2021.

FUENTES, J. L.; BARRERA, C. A.; MANTILLA, D. A.; GONZALEZ, S. J.; SIERRA, L. J., OCAZONEZ, R. E.; STASHENKO, E E. Flower Extracts from Ornamental Plants as Sources of Sunscreen Ingredients: Determination by In Vitro Methods of Photoprotective Efficacy, Antigenotoxicity and Safety. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5525, 27 ago. 2022.

GARCIA, E, B; MACHADO, T, S, C; FERRARIS, F, K; AMENDOEIRA, F, C. Contaminação ambiental e da cadeia alimentar com filtros solares: um potencial risco à saúde humana. **Analytica**, v. 77, jul 2015. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/11841/Analytica\\_2015\\_45-54.pdf?sequence=2](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/11841/Analytica_2015_45-54.pdf?sequence=2)>. Acesso em: 7 dez. 2023.

GIRARDELO, J. R; MUNARI, E. L; DALLORSOLETA, J. C. S; CECHINEL, G; GOETTEN, A. L. F; SALES, L. R; REGINATTO, F. H; CHAVES, V. C; SMANIOTTO, F. A; SOMACAL, S; EMANUELLI, T; BENECH, J. C; SOLDI, C. WINTER, E; CONTERATO, G. M. M. Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata* DC. **Food Research International**, v. 137, p. 109615–109615, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920306402>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

GOLDONI, F. C. BARRETTA, C.; NUNES, R.; BROERING, M. F.; DE FAVERI, R.; MOLLERI, H. T.; CORRÊA, T. P.; FARIAS, I. V.; AMORIN, C. K.; PASTOR, M. V. D.; MEYRE-SILVA, C.; BRESOLIN, T. M.; DE FREITAS, R. A.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTIN, J. R. Effects of *Eugenia umbelliflora* O. Berg (Myrtaceae)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112133, 2019.

HE, H.; LI, A.; LI, S.; TANG, J.; LI, L. XIONG, L. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 134, p. 111161–111161, 1 fev. 2021.

INCA. Câncer de Pele: saiba como prevenir, diagnosticar e tratar. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/cancer-de-pele-saiba-como-prevenir-diagnosticar-e-tratar>. Acesso em: 11 jun. 2023.

KAVOOSI, Fraidoon et al. Medical and dental applications of nanomedicines. *Apmis*, v. 126, n. 10, p. 795-803, 27 set. 2018.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design** v. 24, n. 40, p. 4771–4778, 15 mar. 2019.

KRAUSE, M; KLIT, A; JENSEN, M; SOEBORG, T; FREDERIKSEN, H; SCHLUMPF, M; LICHTENSTEIGER, W; SKAKKEBAEK, N, E; DRZEWIECKI, K, T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **Andrology**, v. 35, n. 3, p. 424–436, 2012. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. 1969. Mirtaceas – Flora ilustrada Catarinense – Parte I. Herbarium Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC, 172p.

MACHADO, K. E.; CECHINEL-FILHO, V.; MALLMANN, R.; TESSAROLO, M. L. MEYRE-SILVA, C.; BELLA CRUZ, A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 636-639, 2005.

MACHADO, K. E.; CECHINEL FILHO, V.; CRUZ, R. C.; MEYRE-SILVA, C.; CRUZ, A. B. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. **Natural Products Communication**, v. 4, n. 9, p. 1181-1184, 2009.

MAKUMIRE, S; CHAKRAVADHANULA, V; KÖLLISCH, G; REDEL, E; SHONHAI, A. Immunomodulatory activity of zinc peroxide (ZnO<sub>2</sub>) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles and their effects on DNA and protein integrity. **Toxicology Letters**, v. 227, n. 1, p. 56–64, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631018/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

MAUL, A.A; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 5, n. 2, 1 jan. 1996.

NACIONAL, A.; SANITÁRIA, V. Ministério da Saúde. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030\\_01\\_06\\_2012.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.pdf)>. Acesso em: 11 set. 2023.

NISHIGORI, C.; YAMANO, N.; KUNISADA, M.; NISHIAKI-SAWADA, A.; OHASHI, H.; IGARASHI, T. Biological Impact of Shorter Wavelength Ultraviolet Radiation-C. **Photochemistry and Photobiology**, v. 99, p. 335–343, 2023.

REITZ, R. Myrtaceas: *Eugenia*: FIC, I Parte, Fasc. Mirt. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Legrand & Klein, 1969, p. 176-279.

RUFINO, M; ALVES, R; BRITO, E; MORAIS, S; SAMPAIO, C; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH Introdução. 2007. Disponível em: <[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot\\_127.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf)>.

SANTOS, S. O.; SOBRINHO, R. R.; OLIVEIRA, T. A. Importância do uso de protetor solar na prevenção do câncer de pele e análise das informações desses produtos destinados a seus usuários. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 279, 2018. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964694/8-1913.pdf>>.

SHRIVASTAVA, R.; RAZA, S.; YADAV, A.; KUSHWAHA, P.; FLORA, S, J, S. Effects of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>, ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 336–347, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24344737/>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

SINGH, I. P.; SIDANA, J.; BANSAL, P.; FOLEY, W. J. Review: Phloroglucinol compounds of therapeutic interest: global patent and technology status. **Expert Opinion on Therapeutical Patents**, v. 19, n. 6, p. 847-866, 2009.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *Journal of Health Sciences*, v. 14, n. 4, 2015. Disponível em: <<https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/885>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

VICTORIA, F.; LENARDÃO, E.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.; ALVES, D.; SILVA, W.; MOTTA, A.; NASCENTE, P.. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012. Disponível em: <[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151200333X?ref=pdf\\_download&fr=RR-2&rr=82a744cccbea0317](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151200333X?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=82a744cccbea0317)>. Acesso em: 23 nov. 2023.

YEAGER, D. G.; LIM, H. W. What’s New in Photoprotection. A Review of New Concepts and Controversies. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 2, p. 149-157, 2019. E eu, mais claro, ainda emitem além desse total horário, seja o pau Neymar caveiro como o Palmeiras.