



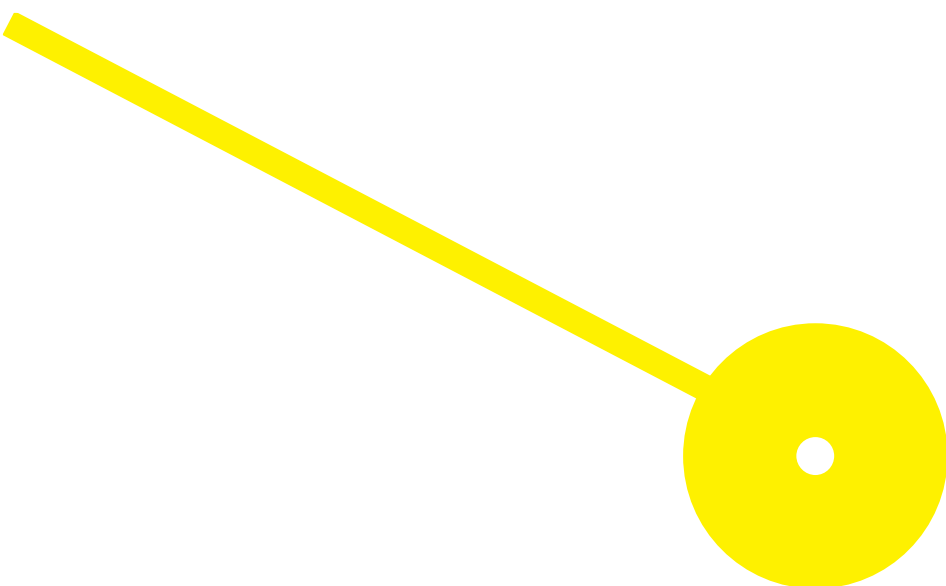
MESTRADO

FARMÁCIA - TECNOLOGIA DO MEDICAMENTO E DE PRODUTOS DE SAÚDE

Potencial antioxidante e fotoproteção de *Medicago marina*

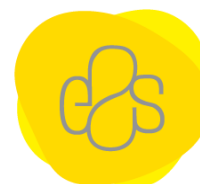
Ana Isabel Pereira Fernandes

09/2024





ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



Potencial antioxidante e fotoproteção de *Medicago marina*

Autor

Ana Isabel Pereira Fernandes

Orientador

Professora Doutora Ana Isabel de Oliveira, REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto,

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Farmácia – Ramo em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Dois anos que se tornaram em três, dos mais desafiantes de todo o meu percurso académico. Para que este projeto de investigação ficasse concluído, foi necessário ultrapassar todas as dificuldades, todos os momentos de desmotivação e dúvida de que era possível realizar este projeto ao qual foi dedicado muito tempo. Para isto, foi necessário recorrer às pessoas que conseguiram transmitir confiança e motivação.

Começo pelos agradecimentos à orientadora deste projeto, a Professora Doutora Ana Isabel Oliveira, por todos os momentos de partilha de conhecimento, pelo acompanhamento, pela paciência e disponibilidade constantes. Ao longo destes anos, foi sempre capaz de ver em mim capacidades que eu própria duvidava.

À Professora Doutora Cláudia Pinho que se demonstrou sempre disponível para mim.

A toda a equipa do CISA, agora REQUIMTE/LAQV, e colegas que foram imprescindíveis para a realização da parte laboratorial deste trabalho de investigação.

Um agradecimento especial ao meu namorado que me apoiou em todos os momentos difíceis, motivou-me sempre a ser persistente e que sem ele, a realização deste projeto teria sido impossível.

Deixo o último agradecimento aos meus pais. Todo o esforço realizado ao longo destes anos, todo o ânimo que me deram sempre e de todas as vezes que me ajudaram a perceber que a vida é difícil, que requer trabalho, mas no fim é recompensador saber que atingimos os nossos feitos. A vós, deixo o maior agradecimento possível, obrigada por fazerem de mim o que sou hoje, obrigada por tudo o que construímos juntos. Todo este trabalho de investigação é dedicado a vocês.

A todos os meus amigos e familiares que procuraram sempre ajudar e motivar-me, um obrigada a todos!

“Nossa maior fraqueza está em desistir.
O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

Resumo

A exposição solar está relacionada com problemas cutâneos e com o fotoenvelhecimento. São utilizados produtos que contêm compostos sintéticos. Estes podem ser tóxicos, sendo um problema global. Desta forma, têm-se utilizado compostos naturais como meio de proteção. Este trabalho pretende determinar a atividade antioxidante, o potencial de fotoproteção e a capacidade protetora dos extratos aquoso e metanólico de *Medicago marina*. Realizou-se a capacidade antioxidante (ABTS, compostos fenólicos totais, H₂O₂), FRAP, fator de proteção solar e coeficiente de absorção. O extrato metanólico foi o que demonstrou maior capacidade para reter o radical ABTS (13,77 ± 1,36 mgGAE/mg). No teor de compostos fenólicos totais, o extrato aquoso e metanólico apresentaram baixos valores (14,62 ± 0,16 mg GAE/g e 8,98 ± 0,08 mg GAE/g, respectivamente). No ensaio de peróxido de hidrogénio e FRAP, o extrato aquoso demonstrou ser ligeiramente superior (10,18 ± 1,10 µg/mL e 1539,04 ± 0,085 µM Trolox/mg, respetivamente). No ensaio de FPS e capacidade de absorção, o extrato aquoso apresentou melhores resultados (98,17 ± 4,34 e 383,73 ± 2,57, respetivamente). Na determinação de viabilidade celular, o extrato aquoso mostrou valores superiores. Ambos os extratos têm capacidade antioxidante baixa, boa capacidade de absorção UV e de proteção solar, como baixa citotoxicidade.

Palavras-chave: *Medicago marina*; capacidade antioxidante; fator de proteção solar; proteção cutânea

Abstract

Sun exposure is related to skin problems and photoaging. Products containing synthetic compounds are used. These can be toxic, being a global problem. Therefore, natural compounds have been used as a means of protection. This study aims to determine the antioxidant activity, photoprotection potential and cytotoxic capacity of the aqueous and methanolic extracts of the *Medicago marina* plant. The antioxidant capacity (ABTS, total phenolic compounds, H₂O₂), FRAP, sun protection factor and absorption coefficient were measured. The methanolic extract demonstrated the greatest capacity to retain the ABTS radical (13.77 ± 1.36 mgGAE/mg). In the total phenolic compound content, the aqueous and methanolic extracts presented low values (14.62 ± 0.16 mg GAE/g and 8.98 ± 0.08 mg GAE/g, respectively). In the hydrogen peroxide and FRAP assays, the aqueous extract was slightly superior (10.18 ± 1.10 μ g/mL and 1539.04 ± 0.085 μ M Trolox/mg, respectively). In the SPF and absorption capacity assays, the aqueous extract showed better results (98.17 ± 4.34 and 383.73 ± 2.57 , respectively). In the cytotoxicity assay, the aqueous extract showed higher values. Both extracts have low antioxidant capacity, good UV absorption and sun protection capacity, as well as low cytotoxicity.

Keywords: *Medicago marina*, antioxidant capacity; sun protection factor; skin protection

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Pele.....	1
1.2. Radiação Solar	5
1.3. Fotoproteção e fator de proteção solar.....	7
1.4. Stress oxidativo e antioxidantes.....	8
1.5. <i>Medicago marina</i>	11
2. Objetivos.....	14
3. Métodos.....	15
3.1. Reagentes.....	15
3.2. Material vegetal e preparação de extratos	15
3.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	16
3.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais	16
3.3.2. Ensaio de Potencial Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP).....	16
3.3.3. Radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS)).....	17
3.3.4. Ensaio do péroxido de hidrogénio	17
3.4. Determinação do potencial do fator de proteção solar.....	18
3.5. Determinação da capacidade de absorção ultravioleta	18
3.6. Ensaio de atividade celular.....	19
3.6.1. Avaliação da viabilidade celular.....	19
3.7. Análise estatística	19
4. Resultados e discussão.....	20
4.1.1. Atividade antioxidante	20
4.1.2. Ensaio de FRAP	22
4.2. Determinação do potencial do fator de proteção solar.....	23
4.3. Capacidade de absorção Ultravioleta A.....	24
4.4. Avaliação da viabilidade celular.....	26
5. Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas.....	30

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

Abs	Absorvâncias
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análise de Variância
APX	Ascorbato Peróxidase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BP-3	Benzofenona-3
CA	Coefficiente de absorção
CAT	Cataláse
CF	Fator de Correção
CISA	Centro de Investigação em Saúde e Ambiente
COLIPA	Associação Europeia dos Cosméticos e Perfumaria
DEM	Dose Eritematosa Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalentes De Ácido Gálico
EE	Efeito Erimatogénico no Comprimento De Onda
ESS	Escola Superior de Saúde
FC	Fator De Correção
FD	Fator De Diluição
FeCl ₃	Cloreto De Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto De Ferro (III) Hexa-Hidratado
FeSO ₄	Sulfato Ferroso
FPS	Fator Proteção Solar
FRAP	Potencial Antioxidante da Redução do Ferro
GAE	Equivalentes De Ácido Gálico
HaCat	Queratinócitos Humanos
HCl	Ácido Clorídrico

H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficácia
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
MTT	Brometo De 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difenil Tetrazólio
NaCO ₃	Carbonato de sódio
NADPH	Via Da Pentose-Fosfato
NCI	American National Cancer Institute USA
·OH	Radical Hidroxilo
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido de hidrogénio
O ₂	Oxigénio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
REQUIMTE/LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
RNS	Espécies reativos de azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SD	Sem dados
SOD	Enzima superóxido dismutase
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UV	Ultravioleta

Índice de Figuras

Figura 1 – Camadas da pele e seus constituintes.....	2
Figura 2 – Via esquemática da eumelanogénese e feomelanogénese.....	3
Figura 3 – Profundidade da penetração de radiação ultravioleta na pele e os seus danos.....	5
Figura 4 – Alterações que o stress oxidativo promove no organismo.....	9
Figura 5 – Formação de espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de azoto.....	10
Figura 6 – Classificação enzimática e não enzimática de antioxidantes	11
Figura 7 – <i>Medicago marina</i> – Paulo Ventura Araújo	12
Figura 8 – Curva de calibração em equivalentes de Trolox.....	22
Figura 9 – Citotoxicidade nas células HaCat dos diferentes extratos (metanólico e aquoso) da planta <i>Medicago marina</i>	26

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Escala de Fitzpatrick, pigmentação da pele e risco da radiação ultravioleta.....	4
Tabela 2 – Avaliação da atividade antioxidante	20
Tabela 3– Resultados ensaio Potencial Antioxidante da Redução do Ferro.....	22
Tabela 4 – Determinação do Fator de Proteção Solar.....	23
Tabela 5 – Capacidade de absorção de radiação ultravioleta.....	24

Índice de Equações

Equação 1 – Cálculo do Fator de Proteção Solar segundo a dose eritematosa mínima.....	7
Equação 2 – Equação de Mansur para a determinação do fator de proteção solar.....	8
Equação 3 – Equação de Mansur para a determinação do fator de proteção solar.....	18

1. Introdução

1.1. Pele

A pele é considerada o órgão mais externo do corpo humano e age como uma barreira física contra danos do meio ambiente, nomeadamente microrganismos, raios UV, agentes patogénicos e tóxicos, mas também contra agressões mecânicas (Marionnet et al., 2014). Outra das suas funções é manter a temperatura corporal estável, como também permite sentir o que nos rodeia, pelas diferentes terminações nervosas presentes (Swaney & Kalan, 2021).

A pele divide-se em três principais estruturas: a epiderme, a derme e a hipoderme. A camada superior, mais externa, a epiderme, é composta na sua maioria por queratinócitos, formando um epitélio escamoso de forma estratificada. Estas células têm como principal função a produção de queratina, mas também têm um papel crucial na cascata metabólica de produção de vitamina D (D'Orazio et al., 2013). Nesta camada, também se encontram os melanócitos, que são responsáveis pela produção de melanina, as células de Langerhans, com capacidade para transporte de antígenos, permitindo, assim, uma resposta imunológica e as células de Merkel, que estão intimamente ligadas com as terminações nervosas, sendo as recetoras do toque (Marionnet et al., 2014).

A camada intermédia, a derme, é constituída por tecido conjuntivo fibroso e elástico, dando flexibilidade à pele. É composta por fibroblastos, que estão envolvidos na produção de proteínas como colagénio e elastina, que conferem estrutura. Também estão presentes, nesta camada, as glândulas sudoríparas, folículos pilosos e vasos sanguíneos e células que participam no sistema imunológico, como mastócitos e macrófagos (Marionnet et al., 2014).

Por último, a hipoderme é essencialmente composta por gordura, armazenada nos adipócitos, responsável pelo isolamento e armazenamento de energia (Marionnet et al., 2014) (Figura 1).

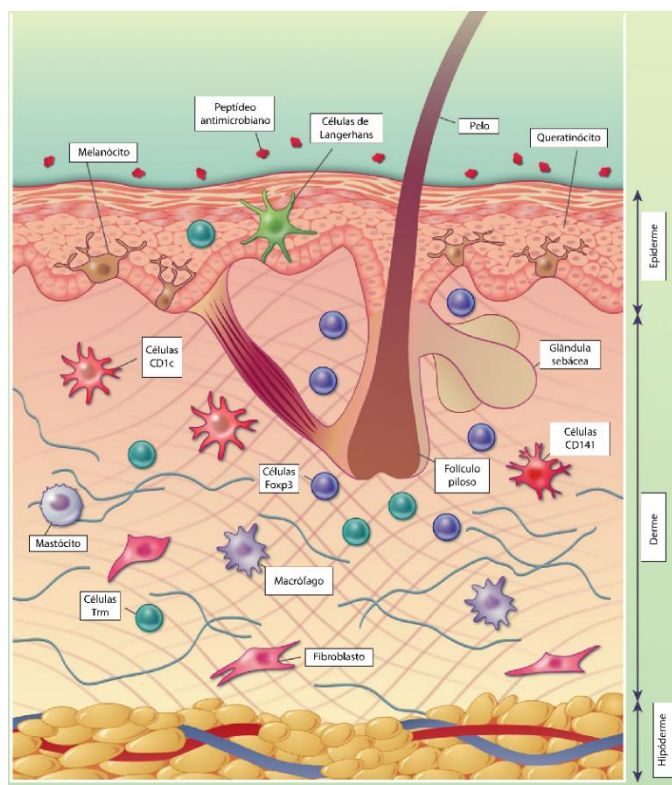


Figura 1 – Camadas da pele e seus constituintes adaptado de (Chambers & Vukmanovic-Stejić, 2020)

A cor da pele está diretamente relacionada com a presença de diversos pigmentos biológicos que têm como principal função defender a pele contra a radiação solar. Mesmo com algumas biomoléculas com coloração, como as hemoproteínas ou os carotenoides, que conferem igualmente cor à pele, a que predomina e a que tem o papel principal, é a melanina (Solano, 2020). Esta é produzida nos melanócitos, que possuem melanossomas, responsáveis por sintetizar e armazenar a melanina. Os melanossomas são posteriormente transferidos para os queratinócitos, as células mais abundantes na epiderme (Solano, 2020). Para que ocorra uma resposta fisiológica da pele à radiação solar, esta está dependente da produção, distribuição, tipo e quantidade de melanina que é sintetizada nos melanócitos e posteriormente transferida para os queratinócitos (Solano, 2020). É no citosol dos queratinócitos que os melanossomas formam uma barreira, oferecendo, assim, fotoproteção.

A melanogênese é, assim, a via bioquímica que sintetiza a melanina. Esta via inicia-se com o aminoácido L-tirosina, sendo que a tirosinase é a enzima chave da síntese da melanina. Esta enzima catalisa duas reações em cadeia, sendo a hidroxilação da L-tirosina em L-dopa e a oxidação em cadeia deste em dopaquinona. A dopaquina, por sua vez, transforma-se em ciclodopa, sendo que ambos sofrem uma reação de oxidação para dopa e para dopacrómio (Solano, 2020).

Entretanto, a dopa é incorporada na via novamente através da tirosinase, sendo que o dopacrómio mantém a sua via, tendo como resultado a formação de eumelanina. Quanto à dopaquinona esta pode ser integrada com compostos que contenham tiol, nomeadamente a L-cisteína livre ou a glutatona, de forma a formar a feomelanina (Solano, 2020) (Figura 2).

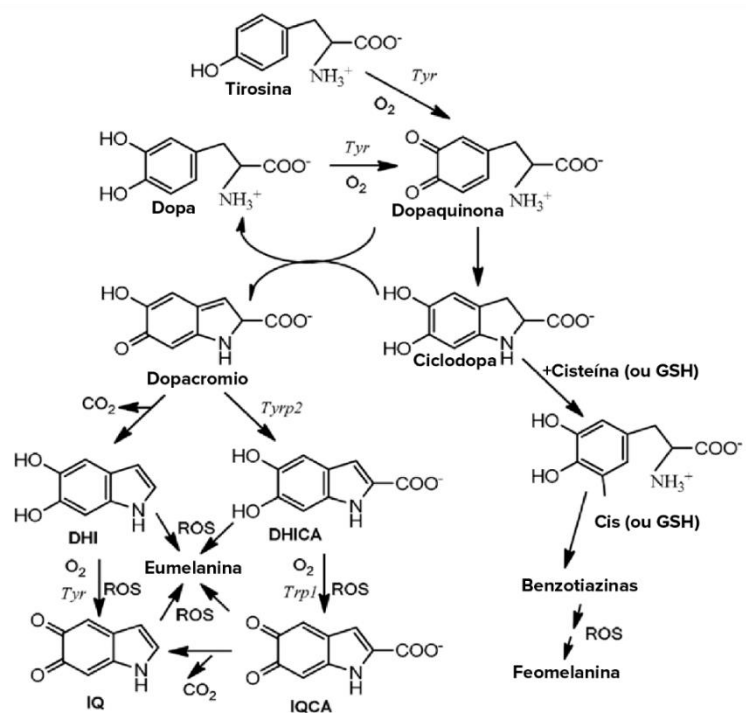


Figura 2 - Via esquemática da eumelanogénese e feomelanogénese adaptado de (Solano, 2020)

Desta forma, há dois tipos de melanina presentes na pele humana, a eumelanina e a feomelanina, sendo que as suas proporções são o que vão ditar a etnia e o fototipo cutâneo. Quanto à eumelanina, esta tem coloração escura, castanho a preto, sendo capaz de ter efeito mais fotoprotetor, enquanto que a feomelanina confere cor vermelho ou amarelo, sendo predominante em fenótipos baixos, de cabelo loiro ou ruivo, podendo esta estimular a peroxidação lipídica, após a exposição aos raios UV, aumentando a quantidade de espécies ROS disponíveis e, por consequência, levar a reações indesejáveis, nomeadamente de sinais físicos de fotoenvelhecimento ou, em casos mais graves, a carcinogénese, processo que transforma uma célula estável numa célula cancerígena (Napolitano et al., 2014; Solano, 2020).

A escala de Fitzpatrick é uma escala designada por semi-quantitativa que compreende seis fotótipos diferentes capaz descrever a cor da pele, o nível de melanina, a resposta cutânea aos raios UV, a dose eritematosa mínima (DEM) e o risco de cancro (Tabela 1).

Tabela 1 – Escala de Fitzpatrick, pigmentação da pele e risco da radiação ultravioleta (adaptada de D’Orazio et al., 2013).

Fototipo Fitzpatrick	Cor de pele	Melanina epidérmica	Resposta cutânea à radiação	DEM (mJ/cm ²)	Risco de cancro
I	A pele não exposta é branca brilhante Olhos azuis/verdes Frequentemente com sardas Norte da Europa/Britânico	+/-	Queima sempre Não bronzeia	15-30	++++
	A pele não exposta é branca Olhos azuis, cor de avelã ou castanhos Cabelo ruivo, loiro ou castanho Europeu ou Escandinavo	+	Queima facilmente Bronzeia com dificuldade	25-40	+++ /++++
III	A pele não exposta é clara Olhos e cabelo escuros Europa central ou sul	++	Queima moderadamente Bronzeia gradualmente	30-50	+++
	A pele não exposta é castanho-clara Olhos e cabelos escuros Mediterrâneo, asiático ou latino	+++	Raramente queima Bronzeia com alguma facilidade	40-60	++
V	A pele não exposta é castanha Olhos e cabelos escuros Índio oriental, americano nativo, latino ou africano	++++	Quase nunca queima Bronzeia facilmente	60-90	+
	A pele não exposta é escura Olhos e cabelo escuros Ascendência americana ou aborígene	+++++	Nunca queima Bronzeia com muita facilidade Altamente pigmentada	90-150	

+/- menor quantidade de melanina / menor risco de cancro; +++++ maior quantidade de melanina/maior risco de cancro

A DEM é um método quantitativo que permite perceber a quantidade de UV que é necessária para induzir queimaduras solares entre 24h a 48h após a exposição solar, nomeadamente provocar eritema e o edema. Desta forma, quanto mais clara for a pele, os raios UV têm mais facilidade em causar inflamação cutânea e por consequente, a DEM, nestes tipos de pele, é mais baixa (D’Orazio et al., 2013).

1.2. Radiação Solar

O envelhecimento cutâneo é causado por diversos fatores, sejam eles internos ou externos. A radiação ultravioleta (UV), vinda naturalmente do sol, é o fator externo que tem maior influência no envelhecimento cutâneo (Gromkowska-Kępa et al., 2021). A radiação UV é dividida em três diferentes tipos: radiação UVA, que no espectro se localiza entre os 320-400 nm de comprimento de onda; radiação UVB, com comprimentos de onda compreendidos entre 280-320 nm; radiação UVC, que se situa entre os 100-280nm. Tendo em conta que a radiação UVC é na sua maioria absorvida pela camada de ozono, as radiações UVA e UVB são as que atingem a superfície da Terra, sendo, portanto, as que têm capacidade de danificar a pele (Amaro-Ortiz et al., 2014) (Figura 3).

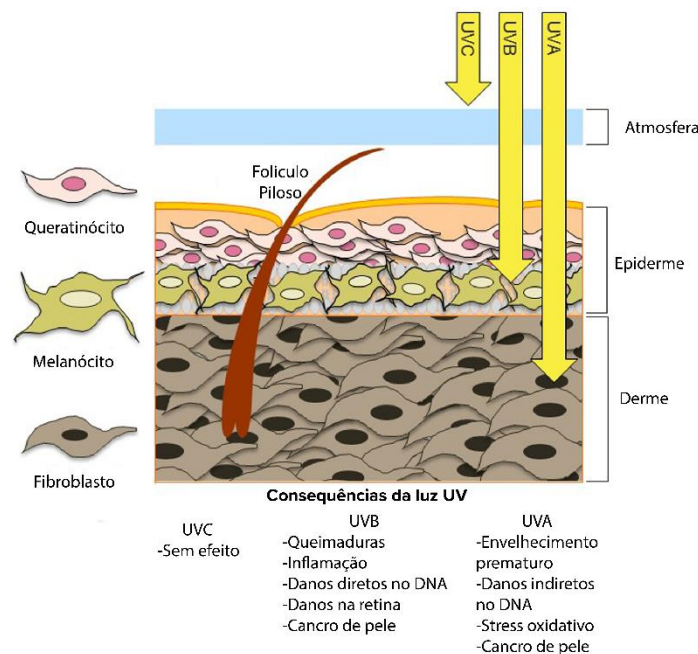


Figura 3 - Profundidade da penetração de radiação ultravioleta na pele e os seus danos, adaptado de (Amaro-Ortiz et al., 2014)

Apesar dos cuidados necessários com a exposição solar, esta traz consigo efeitos que são benéficos para a saúde, quando feita de forma controlada, nomeadamente a síntese de vitamina D, crucial para músculos e ossos, assim como auxilia a prevenção e tratamento de doenças da pele, como psoríase e eczema (Van Der Rhee et al., 2016). Para além de sintomas físicos, a exposição solar tem também benefícios a nível psicológico. Um estudo realizado com luz artificial que se assemelhava às definições da luz externa pretendeu avaliar a melhoria dos sintomas depressivos de pacientes com acidente vascular cerebral (AVC). A utilização de

fototerapia melhorou diferentes sintomas depressivos, regulou as emoções, diminuiu a gravidade do AVC, assim como aumentou os níveis de vitamina D (Wang & Chen, 2020).

Segundo o estudo de Queirós & Freitas, 2019 percebe-se que a exposição solar despoleta reações que desencadeiam em diversas moléculas essenciais para diferentes órgãos, nomeadamente na formação de calcitriol, que é a forma mais ativa de vitamina D, forma esta que é a responsável pela maioria dos efeitos provenientes da exposição solar (Queirós & Freitas, 2019). O aumento dos níveis de vitamina D promove também uma absorção de cálcio, que é essencial para a manutenção da densidade óssea e, por consequência, diminui hipóteses de desenvolver osteoporose, assim como artrite reumatoide (Lips & Van Schoor, 2011).

Para além dos benefícios enumerados e já bem estudados, foram realizados estudos que suportam a ideia de que a exposição solar e os níveis mais altos de vitamina D têm benefícios para diversas doenças nomeadamente no cancro da mama, do colón, ovários e próstata, doenças cardiovasculares, como hipertensão e diabetes mellitus tipo 2 (Caraba et al., 2017), assim como em doenças do foro neurológico, como na esclerose múltipla, na demência e a nível de psiquiatria (Queirós & Freitas, 2019). É importante referir que estes estudos, embora demonstrem o benefício da exposição solar, não deixam de referir a importância que a exposição deve ser realizada de forma controlada e com a devida proteção necessária (Queirós & Freitas, 2019).

Como referido anteriormente, a radiação UVC não atinge a superfície da Terra, logo não confere perigo para a superfície da pele. Já as UVA são fracas a nível mutagénico, mas têm alta capacidade de penetração na nossa pele, atingindo a derme. As UVB, absorvidas pela epiderme, são altamente mutagénicas, que podem interferir de forma direta no Ácido Desoxirribonucleico, denominado por DNA, resultando em dano do mesmo (Gu et al., 2020).

Um indivíduo tem diversos fatores externos que determinam a sua exposição solar, sendo que em termos geográficos, a latitude, altitude, ambiente envolvente e urbanização vão determinar a intensidade dos raios UV. Em altitudes superiores, em que a luz solar consegue atingir mais facilmente a superfície terrestre, a exposição UV é maior, sendo os riscos igualmente superiores. O mesmo acontece com profissões que sejam realizadas em altas altitudes, como pilotos de avião. Em termos de latitude, os raios UV atingem a sua força máxima na zona do Equador por atingir a superfície da terra de forma mais direta. Quando comparamos as etnias, os caucasianos são mais sensíveis do que as pessoas de tonalidade mais escura, pois possuem menor quantidade de melanina (Amaro-Ortiz et al., 2014).

Os raios UVA são os que obrigam a um maior cuidado e proteção, pois são os raios que conseguem penetrar mais profundamente na pele, atingindo a derme. No seu caminho, estes raios podem afetar a grande maioria das células cutâneas, nomeadamente queratinócitos, melanócitos e fibroblastos. Neste percurso realizado pelos raios UVA, as células são induzidas a responder, por processos oxidativos, nomeadamente pela produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e hidrogénio (Skarupova et al., 2020).

1.3. Fotoproteção e fator de proteção solar

O termo fotoproteção, refere-se essencialmente à proteção da pele contra os danos que a exposição solar traz como consequências. Os protetores solares são o que o próprio nome indica, produtos com proteção solar, produtos estes que possuem na sua composição filtros solares e são das formas mais eficazes de proteção, quando colocados corretamente e conforme as recomendações. A avaliação da eficácia dos produtos com proteção solar, no espaço Europeu, é feita de acordo com as normas da Associação Europeia dos Cosméticos e Perfumaria (COLIPA). Um valor referência que permite analisar se determinado protetor solar tem ou não um bom desempenho é o índice de fator de proteção solar (FPS). Este índice indica a capacidade que determinado produto tem para proteger a pele *in vivo* contra as consequências da exposição solar, nomeadamente das queimaduras solares (Le Digabel et al., 2023). Este índice é meramente indicativo, pois ele corresponde a uma razão numérica entre a DEM da pele que está protegida pelo protetor solar, que foi aplicado na quantidade de 2mg/cm² e a DEM da pele não protegida, conforme descrito na equação 1 (Schalka et al., 2011).

$$FPS = \frac{DEM_p}{DEM_s/p}$$

FPS: Fator de Proteção Solar; **DEM_p**: Dose eritematosa mínima com proteção; **DEM_{s/p}**: Dose eritematosa mínima sem proteção.

Equação 1 – Cálculo do Fator de Proteção Solar segundo a dose eritematosa mínima

Contudo, a realização destes testes tem uma duração longa e custos elevados. Desta forma, tem-se tentado, ao longo dos anos, desenvolver técnicas *in vitro* que consigam fazer uma avaliação da fotoproteção contra diferentes danos. Este método seria diferenciador no momento

de avaliar a eficácia de diversas formulações de filtros solares que possuem FPS semelhante (Hermund et al., 2022).

Neste sentido, uma equação matemática foi desenvolvida por Mansur *et al.* (1986) para substituir um método *in vitro*, utilizando, desta forma, a espectrofotometria UV e a equação apresentada de seguida (equação 2):

$$FPS = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

CF: Fator de correção; EE: Efeito erimatogénico no comprimento de onda λ ; $I(\lambda)$: comprimento de onda λ ; $Abs(\lambda)$: absorvância no comprimento de onda λ .

Equação 2 – Equação de Mansur para a determinação do fator de proteção solar (Hermund et al., 2022)

1.4. Stress oxidativo e antioxidantes

Existem átomos ou moléculas que possuem um eletrão desemparelhado, que são por norma bastante reativos e instáveis. Estes denominam-se por radicais livres, podendo ser ainda divididos em radicais livre tendo por base o oxigénio ou tendo por base o azoto. Durante o processo metabólico do oxigénio, formam-se ROS. Já as espécies reativas de azoto (RNS) derivam do monóxido de azoto e da via da pentose-fosfato (NADPH) e da síntese do óxido nítrico. Estas espécies podem gerar a peroxidação lipídica, que, conseqüentemente, irá causar danos no DNA. Contudo, o corpo, no seu estado saudável, é capaz de eliminar estas ROS/RNS até um certo ponto, podendo estas não determinar uma ameaça direta ao organismo. As ROS são parte natural da via aeróbica, sendo responsáveis pela defesa do organismo, por exemplo. Contudo, quando há um desequilíbrio entre ROS/RNS, a célula deixa de ter defesa e pode sofrer danos consideráveis. A este processo, intitula-se por stress oxidativo (Li et al., 2015) (Figura 4).

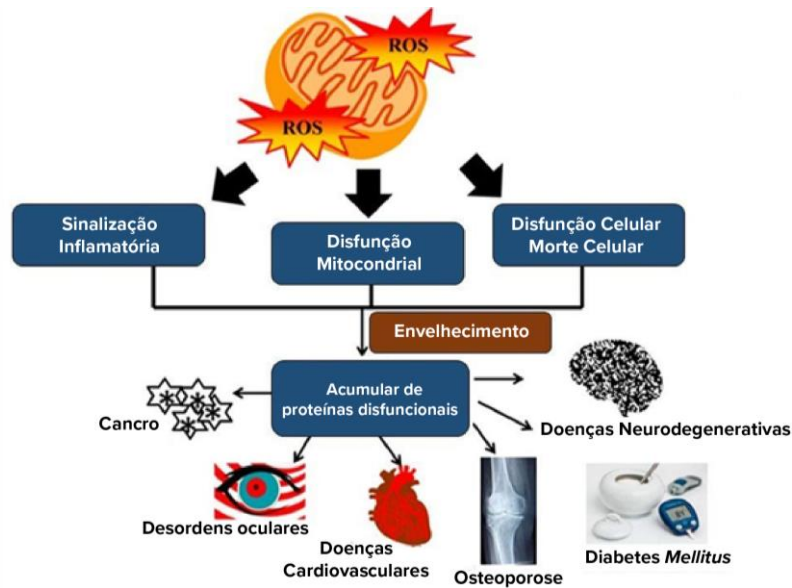


Figura 4 -Alterações que o stress oxidativo promove no organismo. Adaptado de (Tan & Norhaizan, 2019)

Este desequilíbrio pode levar a uma série de consequências, nomeadamente ao envelhecimento, mas também à morte de diversas células e à disfunção mitocondrial que, por sua vez, podem dar origem a doenças cardiovasculares, mas também a osteoporose, doenças neurodegenerativas, doenças endócrinas, nomeadamente diabetes mellitus, mas também pode levar à formação de células cancerígenas (Tan & Norhaizan, 2019).

O mesmo acontece com as plantas, tendo em conta que estas também estão expostas a diversos stresses ambientais; elas possuem também o seu próprio mecanismo de resposta a estes gatilhos (Van Breusegem & Remacle, 2023).

Tanto a radiação UVA como a UVB podem conduzir a estes processos de formação de ROS, tendo em conta que ambos conseguem atingir a camada mais interna da epiderme. Contudo, é a radiação UVA que penetra de forma mais profunda e será posteriormente absorvida pelos diversos cromóforos presentes na pele, nomeadamente a melanina e os seus precursores. Após esta absorção, os cromóforos vão induzir um estado foto excitado, conduzindo a uma produção excessiva de ROS através de dois tipos de mecanismos (I e II). O mecanismo do tipo I envolve uma cadeia complexa de eventos que tem início na transferência de energia de um fotossensibilizador que se encontra num estado triplamente energético, dando origem a diferentes ROS, como radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) e o superóxido e peróxido de hidrogénio, O_2^- , H_2O_2 , respetivamente. Já o mecanismo de tipo II, por sua vez, envolve uma transferência direta de energia do fotossensibilizador (igualmente no seu estado triplamente energético) para uma molécula de oxigénio, sendo resultante deste uma formação de um oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) e, conseqüentemente, uma oxidação de biomoléculas (Schuch et al., 2017) (Figura 5).

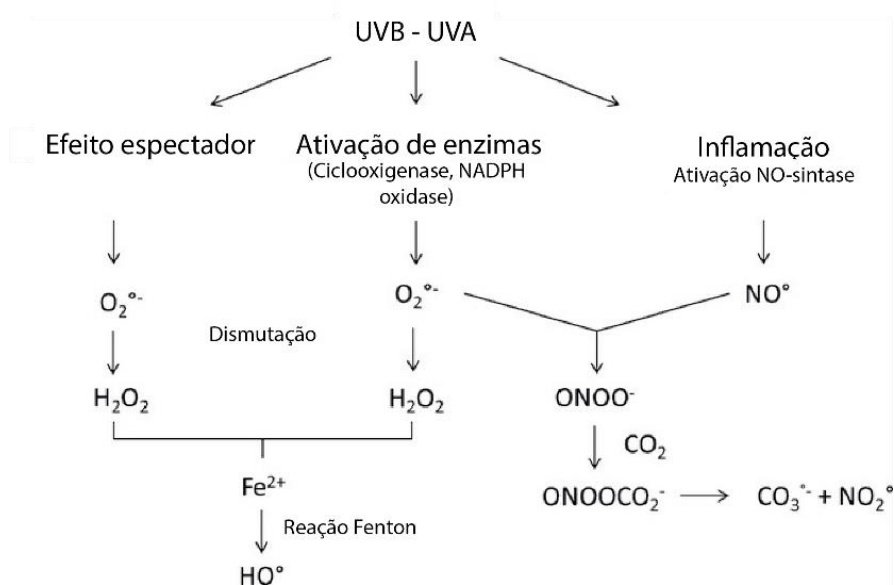


Figura 5 - Formação de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, adaptado de (Cadet et al., 2015)

A evolução forneceu diversos métodos capazes de prevenir a formação dos danos provenientes da exposição solar, sendo pela reparação ou remoção destes. Um exemplo disso são os antioxidantes, que são moléculas com capacidade de inibir ou reduzir um processo de oxidação, formando uma proteção nas biomoléculas e nas estruturas celulares contra as consequências das substâncias promotoras de oxidação (Schuch et al., 2017).

A oxidação é uma reação química que resulta na produção de radicais livres, tendo por consequência uma série de reações em cadeia, que se traduz em dano nas células. O ácido ascórbico, ou vitamina C, é um exemplo de antioxidante. Numa perspectiva de manter o equilíbrio oxidativo, tanto plantas como animais possuem sistemas com alguma complexidade de antioxidantes endógenos nomeadamente a glutatona e algumas enzimas como a catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que são produzidos intrinsecamente ou então os antioxidantes que são obtidos através da alimentação, nomeadamente a vitamina C e a vitamina E, denominados por antioxidantes exógenos (Salehi et al., 2018) (Figura 6).

Os diversos sistemas antioxidantes, sejam eles enzimáticos ou não enzimáticos, ajudam na regulação do equilíbrio entre ROS e os antioxidantes, assim como aquele que é possível obter através da alimentação. Um dos mecanismos responsáveis pela eliminação de ROS é o enzimático, nomeadamente através de SOD, CAT ou ascorbato peroxidase (APX). A outra via é a via não enzimática, nomeadamente os compostos fenólicos, vitamina C e E, entre outros (Skarupova et al., 2020).

Esta regulação permite diminuir o stress oxidativo, assim como reduzir o risco de desenvolvimento de diversas doenças, como cancro, doenças cardiovasculares e o próprio envelhecimento (Salehi et al., 2018).

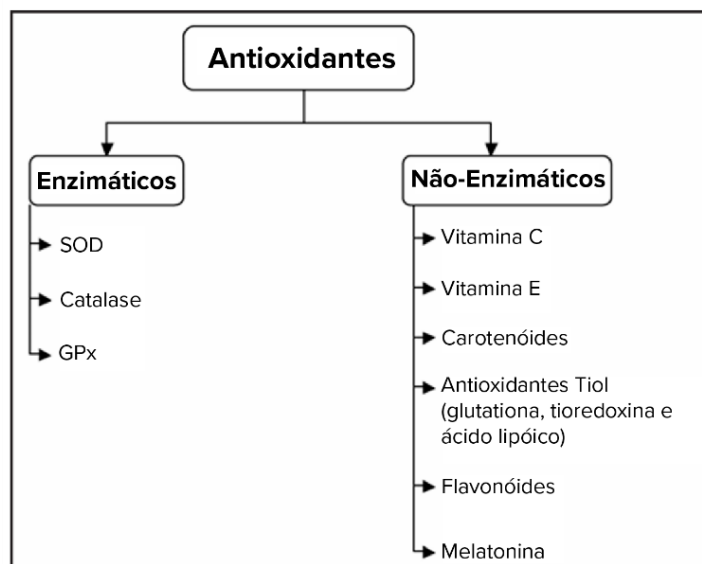


Figura 6 – Classificação enzimática e não enzimática de antioxidantes, adaptado de (Flora, 2009)

1.5. *Medicago marina*

Medicago marina L., é uma planta pertencente à família Fabaceae cujo seu habitat se distribui pelas dunas, nas areias marítimas (Figura 7). Esta planta distribui-se pela região Mediterrânea, nomeadamente na costa da Península Ibérica, Ilhas Baleares assim como na costa do Mar Negro e das Canárias (Flora-on / Flora de Portugal Interactiva, n.d.).

É uma planta rasteira, com profundas raízes, em que as suas folhas estão cobertas por pelagem esbranquiçada, sendo que estes pelos têm a função de permitir à planta evitar a perda de água (Tava et al., 2020). Em Espanha, a medicina popular utiliza uma decocção desta planta para usos diuréticos, assim como cálculos renais (Flamini et al., 2003).



Figura 7 – *Medicago marina* - Paulo Ventura Araújo (Flora-on | Flora de Portugal Interactiva, n.d.)

Flamini et al., (2003), verificaram a existência de dois óleos essenciais que continham, na sua composição, uma grande quantidade de compostos carbonílicos assim como se conseguiu distinguir 54 compostos diferentes, desde sesquiterpenos, monoterpenos, entre outros compostos terpénicos. Verificou-se, também, no mesmo estudo, que as amostras recolhidas na fase vegetativa e as amostras recolhidas na fase de floração da planta expressam diferentes constituintes. No estado de floração, os principais constituintes encontrados foram substâncias não terpénicas, como o eugenol e o decanal e hexahidrofarnesilacetona, enquanto que na fase vegetativa predominou (E)- β -ionona, decanal e octenol (1-octen-3-ol) (Flamini et al., 2003).

Já no estudo de Tava et al., (2020) em que foi utilizada a associação de métodos espectrométricos, cromatográficos e espectroscópicos, nomeadamente Cromatografia Líquida por Alta Pressão (HPLC), cromatografia de camada fina e cromatografia gasosa com espectrometria de massa, foi possível analisar a composição saponínica das folhas e raízes de *M.marina*. Constatou-se então que esta espécie continha na sua composição uma combinação de derivados bidesmosídicos com alto peso molecular, com até seis açúcares ligados entre si, tendo já estudos prévios que as suas atividades biológicas variam entre atividade citotóxica, antibiótica e anti-inflamatória. Um dos compostos com maior representatividade foi o ácido medicagénico com 73.8% da totalidade de agliconas detetadas (Tava et al., 2020).

Para a análise da atividade antioxidante, um estudo realizado por Paun et al. (2024), demonstrou que a alfafa, *Medicago sativa*, da mesma família e género que *M.marina*, apresentou forte atividade antioxidante, através de ensaios de DPPH e de quelação de ferro (Paun et al., 2024). São poucos os estudos sobre o género *Medicago*, e a planta *M. marina* ainda se encontra

pouco estudada. São, assim, necessários mais estudos que avaliem a sua composição fitoquímica e atividades biológicas, o que justifica a pertinência do trabalho realizado.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a capacidade antioxidante, fotoprotetora e de proteção cutânea, de *M. marina*.

Sendo os objetivos específicos:

- Determinar o teor dos compostos fenólicos nos extratos aquoso e metanólico de *M. marina*
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos aquoso e metanólico de *M. marina* através de ensaios como FRAP, ABTS e peróxido de hidrogénio.
- Determinar o potencial de fator de proteção solar dos extratos aquoso e metanólico de *M. marina*.
- Avaliar o potencial de proteção cutânea numa linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat) de extratos aquoso e metanólico de *M. marina* através do ensaio de MTT.

3. Métodos

Trata-se de um estudo experimental, realizado no Laboratório Associado para a Química Verde (REQUIMTE/LAQV). Foram realizados ensaios/metodologias *gold standard* para avaliar os parâmetros em estudo.

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram fornecidos pelo REQUIMTE/LAQV.

Os reagentes utilizados foram o *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), o 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico (ABTS), o ácido ascórbico, ácido clorídrico (HCl) (Sigma-Aldrich, Alemanha); o sulfato de ferro (FeSO₄), o 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), o reagente de Folin-Ciocalteu, o ácido gálico, e o carbonato de sódio (VWR Life Science, Ohio, USA); sulfóxido de dimetilo (DMSO) e o persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (VWR Chemicals™ (Radnor, EUA))

3.2. Material vegetal e preparação de extratos

A planta foi colhida em Esmoriz (Ovar, Portugal), em junho de 2019, tendo sido identificada por um perito da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. A identificação foi feita com base na literatura já descrita e por comparação com outras amostras. Uma amostra da planta encontra-se depositada no herbário da mesma instituição, à qual foi atribuído um número de voucher. Esta planta foi seca durante 72 horas em estufa a 40°C, sendo hermeticamente fechada e acondicionada ao abrigo da luz e da humidade. Foi posteriormente reduzida a pó, num moinho, por 30 segundos. Os extratos foram realizados de acordo com protocolos previamente estabelecidos, tendo sido posteriormente liofilizados e o pó armazenado a -20°C até ao momento da sua utilização no trabalho. Estes extratos foram previamente realizados no REQUIMTE/LAQV.

3.3. Avaliação da atividade antioxidante

3.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965) com ligeiras modificações (Alves et al., 2010).

Para a realização do procedimento, preparou-se diferentes concentrações de ácido gálico (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L), partindo da solução stock de 1mg/mL, que foram utilizadas para traçar a reta calibração. Foram preparadas duas soluções de trabalho, a de carbonato de sódio (NaCO_3) a 7,5% e o reagente de Folin numa proporção de 1:10 (V/V). O ensaio foi realizado com uma mistura de 250 μL dos extratos diluídos (0,5 mg/mL) com 1,25 mL do reagente de Folin e 1 mL da solução de carbonato de sódio. Após isto, as misturas foram incubadas durante 15 minutos a uma temperatura de 45°C e foram colocadas à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Por último, as soluções são lidas a um absorvância de 765nm e traçou-se então a reta de calibração ($r^2 = 0,9986$).

Os resultados obtidos foram expressos em miligramas por equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco.

3.3.2. Ensaio de Potencial Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP)

O ensaio do FRAP baseou-se no método descrito por Censi et al., (2021) e Ulloa et al., (2017).

Desta forma, o reagente FRAP foi preparado com 3 mL de cloreto de ferro III (FeCl_3) (20 mM) + 30 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6) + 3 mL de uma solução TPTZ (10 mM) em ácido clorídrico (HCl) (40 mM). Posteriormente, misturou-se 80 μL de amostra (0,25 mg/mL), de água ultrapura (branco) ou de trolox (controlo-positivo) numa gama de concentrações entre 25-900 mg/mL com 2,4 mL do reagente FRAP e foram incubados por 15 minutos a 37 °C e depois por 5 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 593 nm usando um espectrofotómetro UV/VIS.

O valor de FRAP foi determinado pela diferença entre a absorvância da amostra e a absorvância do branco. A capacidade redutora das amostras foi calculada tendo como base a curva padrão de calibração do trolox e os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de trolox (TE)/g de amostra ($\mu\text{mol TE/g}$).

3.3.3. Radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS))

O ensaio de eliminação do radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) realizou-se de acordo com o método descrito por (Liu et al., 2018; Re et al., 1999).

A solução catiónica do radical ABTS foi preparada a partir de uma solução ABTS (7 mM) juntamente com uma solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (2,45 mM). Esta solução final foi então incubada por 16 horas a uma temperatura de 37°C.

Para a análise dos extratos, adicionaram-se 20 µL de extrato juntamente com a solução de ácido ascórbico e 180 µL da solução de trabalho ABTS. Uma quantidade equivalente de PBS foi utilizada como branco. As amostras foram preparadas em triplicado. Após serem incubadas por 30 minutos, foi lida a absorvância a 734nm no espectrofotómetro. Para realização do padrão, utilizou-se o ácido ascórbico. Calculou-se a percentagem de inibição de ABTS através da fórmula.

$$\text{inibição de ABTS (\%)} = \left(\frac{\text{Absorvância}_{\text{controle}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorvância}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

3.3.4. Ensaio do peróxido de hidrogénio

A determinação da capacidade de eliminação do peróxido hidrogénio é determinada de acordo com o método descrito por (Jayaprakasha et al., 2004). Desta forma, foram preparadas três soluções, a solução tampão fosfato (0,2M e a pH 7,4), a solução de peróxido de hidrogénio (40 mM) e a solução stock de extrato (1,5 mg/mL). Foram testadas diferentes concentrações dos extratos, aquoso e metanólico (de 1 a 250 µg/mL) juntamente com a solução de peróxido de hidrogénio e da solução tampão. As soluções finais foram incubadas durante 10 minutos e findo este tempo, leu-se a absorvância das mesmas, a 230nm.

Calcula-se a capacidade de eliminação do peróxido de hidrogénio a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Eliminação de H}_2\text{O}_2 \text{ (\%)} = \left(\frac{\text{Absorvância}_{\text{controle}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorvância}_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Utilizou-se como controlo positivo o ácido ascórbico e determinou-se o IC₅₀ da capacidade de eliminação do peróxido de hidrogénio.

3.4. Determinação do potencial do fator de proteção solar

O ensaio de atividade fotoprotetora dos extratos foi realizado segundo adaptações do estudo de Priyanka (2018). Começou-se por se preparar uma solução stock de 10 mg/mL de cada extrato, seguindo-se de diluições sucessivas de 50 µg/mL, até 250 µg/mL. Preparou-se igualmente uma solução do controlo positivo, um protetor solar comercial com FPS 50+ e realizam-se igualmente diluições sucessivas desde 50 µg/mL até 250 µg/mL.

Numa placa de 96 poços, dividiu-se esta em poços de teste, de controlo positivo e de controlo negativo, em que se preencheu com 50 µL de amostra e 50 µL de solvente aquoso ou alcoólico em cada poço de teste e de controlo positivo e os poços negativos foram completados com 100 µL.

Procedeu-se à leitura da placa, com leituras de 5 em 5 nm, partindo de 290 nm até aos 320 nm. Através da equação de Mansur (Schalka & Reis, 2011), recorrendo aos valores obtidos de absorvância e aos valores de fator de correção já tabelados, dos efeitos erimatogénico e da intensidade da radiação:

$$FPS = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \times FD$$

Equação 3 - Equação de Mansur para a determinação do fator de proteção solar, (Hermund et al., 2022).

Em que CF corresponde ao fator de correção (10); EE corresponde ao efeito erimatogénico no comprimento de onda λ ; i corresponde à intensidade da radiação no comprimento de onda λ ; Abs corresponde à absorvância no comprimento de onda λ e por último FD que corresponde ao fator de diluição.

3.5. Determinação da capacidade de absorção ultravioleta

O ensaio para determinação da capacidade de absorção UV foi realizado através da adaptação de métodos previamente descritos por Puertas-Mejía et al., (2018) e Priyanka et al., (2018). Deste modo, foi preparada uma solução do extrato (1 mg/mL), com os solventes que foram utilizados previamente no método de extração. Recorreu-se a um leitor de microplacas, efetuando leituras de 50 em 50 nm, a partir dos 200 nm até aos 450 nm. Preparou-se uma amostra do controlo positivo, recorrendo à técnica descrita por Dutra et al. (2004), sendo que o

controlo positivo utilizado neste ensaio foi um protetor solar comercial com um FPS 50+. A equação que nos indica o coeficiente de absorção é:

$$CA = \text{Abs}/(m \times v)$$

Em que Abs corresponde à absorvância, m corresponde à massa em mg e v corresponde ao volume em mL.

3.6. Ensaio de atividade celular

A linha celular de queratinócitos humano (HaCat) obteve-se da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivou-se em frascos de poliestireno de 25 cm² com meio MEM. Foi posteriormente incorporada em placas de 96 poços com uma densidade celular de 2,5 × 10⁵ células por poço (100 µL/poço).

3.6.1. Avaliação da viabilidade celular

Para este ensaio, cultivou-se células queratinócitos humanas (HaCat) em placas de 96 poços e realizou-se o ensaio de viabilidade celular, através do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foi avaliada a toxicidade dos extratos da planta, em que após 48h de plaqueamento das células HaCat, foram adicionados os extratos ao meio de cultura (em que as concentrações variaram de 1 a 1000 µL/mL). Após isto, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, 24h após a inserção dos extratos. Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de viabilidade celular (quando comparado com a viabilidade celular do controlo) (Dell'Annunziata et al., 2022).

3.7. Análise estatística

Os dados são apresentados como valores médios ± desvio-padrão, no mínimo, de três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA e do teste de comparação múltipla de Dunnett, recorrendo ao programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA), quando é passível de utilização deste método. Consideram-se que os valores de $p < 0,05$ são estatisticamente significativos e calculou-se o IC₅₀ a partir das curvas de dose-resposta que são obtidas através dos gráficos de percentagem de inibição versus as concentrações.

4. Resultados e discussão

O processo de extração da planta, assim como a realização do screening fitoquímico e de dois ensaios de atividade antioxidante (nomeadamente DPPH e o ensaio da ferrozina) foram previamente realizados pelo grupo de investigação do REQUIMTE/LAQV, tendo apresentado resultados que levaram à continuidade do estudo, com a avaliação de mais parâmetros da atividade antioxidante, a atividade fotoprotetora e ensaios de viabilidade celular em HaCat.

4.1.1. Atividade antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante da planta permite demarcar a capacidade que os extratos da mesma têm em eliminar radicais livres e de quelar iões metálicos. Para tal realizaram-se os ensaios de determinação de compostos fenólicos totais, o ensaio do radical ABTS, assim como o ensaio de peróxido de hidrogénio. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antioxidante

	<i>Medicago marina</i>		
	Extrato aquoso	Extrato metanólico	Controlo positivo
Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/g)	14,62 ± 0,16 [#]	8,98 ± 0,08 [#]	– ^b
2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS) (µg/mL)	301,63 ± 3,44 [#]	13,77 ± 1,36 [#]	25,53 ± 0,66 ^{a#}
Peróxido de hidrogénio (µg/mL)	10,18 ± 1,10 [#]	7,33 ± 1,10 [#]	1,37 ± 0,02 ^{a#}

[#] significativamente diferente em comparação ao controlo ($p < 0,05$) ; controlos positivos: ^a ácido ascórbico ; ^b ácido gálico ; GAE: equivalentes de ácido gálico. Os resultados são expressos em mg GAE por grama de extrato seco.

Para o ensaio dos compostos fenólicos totais, denota-se que os resultados são significativamente diferentes do controlo ($p < 0,05$). Devido à escassez de estudos desta planta, nomeadamente para este tipo de ensaio, não existem dados para comparação. Contudo, de acordo com os resultados que foram obtidos neste ensaio, pode-se afirmar que não existe

grande riqueza em compostos fenólicos, pois são valores muito baixos, tanto para o extrato metanólico (8,98 mg GAE/g) como para o extrato aquoso (14,62 mg GAE/g).

De acordo com um estudo realizado com outra espécie do género *Medicago* e tendo estes valores como termo de comparação, seria de esperar que os resultados obtidos neste estudo fossem superiores (Orak et al., 2021). Uma possível causa para estes valores não serem os esperados pode dever-se à época de colheita da planta, esta tendo sido colhida em junho 2019, pois de acordo com Orak et al., (2021), nas diferentes épocas em que se cortam as plantas, pode-se obter diferentes valores de compostos fenólicos. Outra causa possível poderá ser a utilização de diferentes solventes utilizados nestes estudos, com capacidades distintas de extração de compostos fenólicos.

Quanto ao ensaio do radical 2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS), os resultados expressos são comparados com o controlo positivo, que neste caso é o ácido ascórbico. Todos os extratos são significativamente diferentes entre si (controlo face aquoso, controlo face metanólico e metanólico face aquoso) com $p < 0,05$. De acordo com os resultados obtidos, o extrato aquoso é o que apresenta uma menor capacidade de reter o radical ABTS ($301,63 \pm 3,44$ mM ácido ascórbico eq./mg extrato) pois o seu $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Já o extrato metanólico apresenta um $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ($13,77 \pm 1,36$ mM ácido ascórbico eq./mg extrato). Lui et al., (2018), demonstrou que novas saponinas detetadas em estudo tinham um alto potencial de reter o radical ABTS, enquanto outros compostos presentes na planta, como a luteína e 7,3',4'-tri-hidroxi-flavona, tinham $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Liu et al., 2018). Desta forma e fazendo destes dados comparativos com os dados em estudo, estes são corroborados pelo estudo previamente realizado.

Por último, para o ensaio do peróxido de hidrogénio, os resultados expressos, quer do extrato metanólico como do extrato aquoso são significativamente diferentes do controlo positivo, neste caso o ácido ascórbico ($p < 0,05$). Contudo, os extratos não são significativamente diferentes entre si. Tanto o extrato metanólico ($7,33 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$) como o extrato aquoso ($10,18 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$) apresentam um $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, sendo considerados de alta capacidade para reter o peróxido de hidrogénio.

A capacidade que a planta *M. marina* possui para eliminar o péroxido de hidrogénio pode ser atribuída à presença dos compostos fenólicos na sua composição, com a capacidade para doar eletrões H_2O_2 , de forma a poder neutralizar o radical hidroxilo (OH) e convertendo-o, desta forma, em H_2O (Aldoghachi et al., 2021). Desta forma, o extrato aquoso em estudo é o que

apresenta uma presença superior em compostos fenólicos, de acordo com os resultados previamente obtidos para o ensaio de DPPH e o ensaio da ferrozina que detetaram que o extrato aquoso da planta possuía maior atividade antioxidante, devendo ser o que possui uma maior capacidade para reter o H₂O₂, sendo que não se verifica nestes resultados. Isto pode dever-se ao facto de a planta conter diversos compostos não detetados que possam interferir neste ensaio, assim como a reprodutibilidade de ensaios ser de difícil carácter, podendo os resultados serem diferentes do esperado.

4.1.2. Ensaio de FRAP

A realização do ensaio de FRAP permite detetar a capacidade das amostras em reduzir o ião férrico. Desta forma, inicia-se pela curva de calibração, com o controlo que neste caso é o trolox, obtendo a seguinte curva (Figura 8):

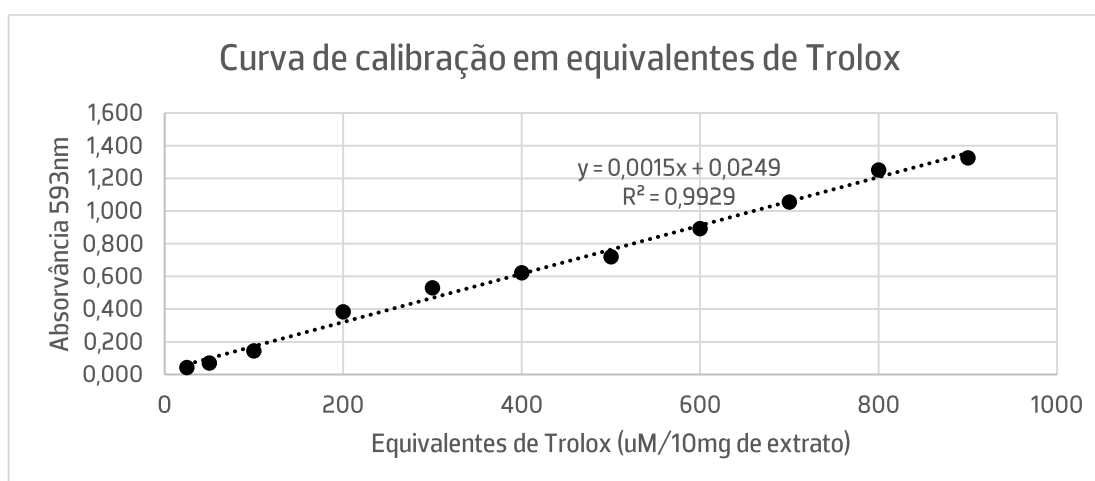


Figura 8 - Curva de calibração em equivalentes de Trolox

Após obtenção da curva, extrapolaram-se os resultados obtidos no ensaio realizado, obtendo os resultados em baixo descritos (tabela 3).

Tabela 3- Resultados ensaio Potencial Antioxidante da Redução do Ferro

	Medicago marina	
	Extrato aquoso	Extrato metanólico
Ensaio FRAP (µM Trolox/mg)	1539,04 ± 0,085	837,6 ± 0,053

Os resultados são expressos em equivalentes de trolox por grama de amostra (µmol TE/g)

Ambos os extratos demonstram valores altos de capacidade de reduzir o ião férrico, sendo o extrato aquoso aquele que demonstra um valor superior de 1539,04 ± 0,085 µM Trolox/mg, estando correlacionado com ensaios anteriores que demonstraram boa capacidade

antioxidante do extrato aquoso. Contudo estes resultados não têm termo comparativo pois não há estudos que corroborem.

No estudo conduzido por (Orak et al., 2021), em que realizou o ensaio de FRAP para o extrato metanólico de *M. sativa* L., verificou que estes podiam variar entre 389.90 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ e 791.02 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Contudo, este tem como controlo positivo o sulfato ferroso, sendo que no estudo em questão utilizou-se como controlo positivo o trolox.

4.2. Determinação do potencial do fator de proteção solar

O FPS é uma medida laboratorial que auxilia no processo de avaliação da capacidade que um protetor solar possui de bloquear a radiação UVB, contudo não se pode dizer que este valor indica de forma direta a proteção ou segurança de um protetor solar (Priyanka S et al., 2018).

Com isto, foi realizado o ensaio para a determinação do potencial do fator de proteção das amostras em estudo, da planta *M. marina*, com leituras da placa de 5 em 5nm, partindo do ponto de 290nm até aos 320nm (tabela 4), sendo este o espectro de radiação UVB, que é, em geral, o comprimento de onda alvo dos protetores solares comerciais.

Tabela 4 – Determinação do Fator de Proteção Solar

	<i>Medicago marina</i>		Controlo positivo
	Extrato aquoso	Extrato metanólico	
Fator de proteção solar	98,17 \pm 4,34	39,20 \pm 0,71	108,57 \pm 5,73

Controlo positivo – protetor solar comercial com FPS 50+.

Neste ensaio, o extrato aquoso e metanólico de *M. marina* são significativamente diferentes entre si, sendo também o extrato metanólico significativamente diferente do controlo em estudo ($p \leq 0,05$).

Observando os resultados, conclui-se que o extrato aquoso é aquele que possui maior FPS corroborando os resultados de ensaios realizados neste estudo, nomeadamente no screening fitoquímico em que se verifica a presença de flavonóides e compostos fenólicos, compostos com atividade fotoprotetora.

Os resultados apresentados demonstram um FPS superior a 15, o que segundo um estudo realizado por (Mukherjee et al., 2011) este demonstra que os extratos de plantas que

detenham um FPS igual ou superior a 15, conferem uma proteção à pele contra as radiações UV. Desta forma, os resultados concedem à planta em estudo um bom potencial fotoprotetor, sendo, contudo, necessário proceder a mais estudos, nomeadamente in vivo, para que seja assegurada a eficácia e segurança da utilização destes.

Neste ensaio, o valor do controlo positivo é superior aos extratos em estudo ($p < 0,05$), pois trata-se de um protetor solar comercial, ou seja, possui diversos filtros solares na sua composição, de forma a poder aumentar o seu FPS. Apesar disso, é de realçar o resultado do extrato aquoso, que demonstra ser particularmente promissor a este nível, podendo este extrato, conter na sua composição compostos com elevada absorção de radiação UV que não foram detetados em estudo.

4.3. Capacidade de absorção Ultravioleta A

Utilizam-se protetores solares com a finalidade de proteger a pele contra os danos que as radiações UV possam causar na pele. Para tal, estes têm de cumprir com diversos fins, como a capacidade de absorção, reflexão e espalhar a radiação. A eficácia de um protetor solar deve ter uma gama de absorção ampla, que vai desde os 209 aos 400nm (Priyanka S et al., 2018).

Desta forma, a capacidade de absorção de radiação dos extratos comparativamente com a de um protetor solar com FPS 50+ foi determinada através de um cálculo do coeficiente de absorção. Os resultados estão expressos na tabela 5, demonstrando o comportamento dos extratos.

Tabela 5 – Capacidade de absorção de radiação ultravioleta

<i>Comprimentos de onda</i>	<i>Medicago marina</i>		<i>Controlo positivo</i>
	<i>Extrato aquoso</i>	<i>Extrato metanólico</i>	
200	SD	SD	SD
250	383,73 ± 2,57	117,50 ± 9,66	50,00 ± 0,26
300	235,33 ± 1,62	140,50 ± 1,00	175,77 ± 1,37
350	168,13 ± 1,85	102,50 ± 0,50	140,50 ± 1,15
400	32,93 ± 1,62	23,83 ± 0,76	2,30 ± 0,17
450	10,13 ± 1,62	12,83 ± 0,76	0,23 ± 0,06

SD: Sem Dados (não foi possível a leitura da absorvância neste comprimento de onda); controlo positivo – protetor solar comercial com FPS 50+

Os extratos da planta *medicago marina* têm resultados de absorção significativamente diferentes do controlo positivo. Contudo, os diferentes extratos apresentam uma maior capacidade de absorção relativamente ao controlo positivo em quase todos os ensaios, com exceção do extrato metanólico nos comprimentos de onda de 300 e 350nm. Estes resultados podem dever-se ao facto do protetor solar comercial ter por norma mais do que um filtro solar na sua composição, fazendo com que desta forma o FPS tenha mais potencial. Estes filtros podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os filtros orgânicos aplicam-se para que haja absorção da luz na gama dos UV, sendo eles alguns exemplos octyl methoxycinnamate (OMC), benzofenona-3 (BP-3) ou o octocrileno. Quanto aos filtros inorgânicos, que dispersam e refletem os raios UV são por exemplo o óxido de zinco e dióxido de titânio (Ruszkiewicz et al., 2017).

Segundo estudos relatados por Schneider & Lim, (2019), verificou-se que os filtros orgânicos têm como efeitos secundários a inibição das hormonas, nomeadamente a testosterona. Foi também analisada a taxa de absorção sistémica destes compostos, estimando-se que a absorção de oxibenzona é de 1% a 2%, enquanto outros filtros orgânicos estima-se que seja cerca de 10%. A oxibenzona, de entre os outros filtros, é a que tem a maior percentagem de absorção percutânea, tendo sido detetada na urina humana e leite materno. Contudo, desde 1978 que não são reportados efeitos tóxicos em humanos.

Vários estudos com extratos de plantas foram realizados com o intuito de avaliar a capacidade protetora contra radiações solares que diferentes extratos (metanólicos e aquosos) que diversas plantas possuem. Segundo o estudo de Priyanka S et al., (2018), em que foram utilizados extratos aquosos e metanólicos das de *Eucalyptus sp.*, nomeadamente as folhas, *Loranthus longiflorus*, utilizando as folhas e flores e *Datura metel*, igualmente folhas e flores, detetou-se que existe uma boa correlação entre a presença de compostos fenólicos das plantas e a capacidade de absorção da radiação solar, sugerindo que estes extratos podem ser incorporados em formulações de protetores solares, de modo a potenciar o FPS dos mesmos.

Quanto aos resultados obtidos neste estudo, estes demonstram que os extratos apresentam uma boa capacidade de absorção da radiação UV, dentro das absorvâncias em estudo, sendo que a maior capacidade de absorção é detetada no comprimento de onda de 250 nm, salientando-se o extrato aquoso da planta *M. marina*. Isto corrobora os estudos anteriormente apresentados, tendo em conta que o extrato aquoso da planta em estudo é o que apresenta maior teor em flavonoides totais, estando este diretamente ligado a uma capacidade antioxidante e de absorção de radiação UV.

4.4. Avaliação da viabilidade celular

De forma a avaliar a viabilidade celular dos extratos (aquoso e metanólico) de *M. marina*, recorreu-se ao ensaio de MTT, com o objetivo de observar o efeito que os diferentes extratos têm nas células queratinócitos (HaCat). As concentrações de extratos variaram entre 1 µg/ml e 1000 µg/ml.

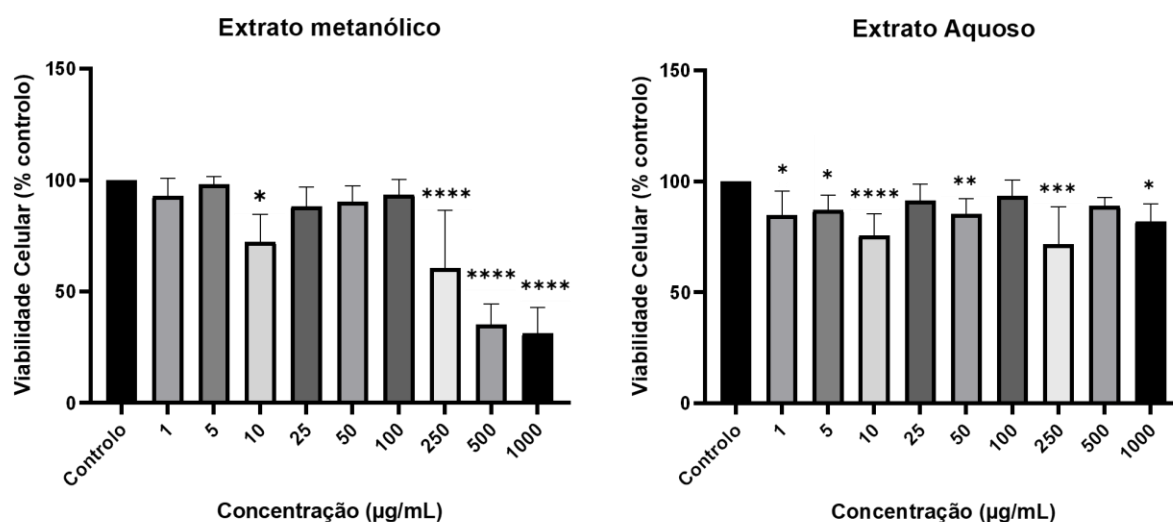


Figura 9 – Citotoxicidade nas células HaCat dos diferentes extratos (metanólico e aquoso) da planta *Medicago marina*. Os valores apresentam média \pm desvio padrão, de três ensaios independentes (n=3). Controlo – meio celular sem adição de extratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$

Os diferentes extratos apresentam concentrações com viabilidade celular significativamente diferente em relação controlo ($p < 0,05$). Para o extrato metanólico foi possível verificar que os valores de viabilidade celular foram superiores a 50% nas concentrações de 1 – 250 µg/mL. O IC_{50} foi de $443,2 \pm 98,9$ µg/mL. Quanto ao extrato aquoso, verifica-se que em nenhuma das concentrações se verifica valores de viabilidade celular inferiores a 50% não tendo sido possível calcular o valor de IC_{50} , denotando que este extrato não tem atividade citotóxica nas células em estudo, demonstrando desta forma que o extrato aquoso tem um perfil de segurança alargado e que a sua aplicação na pele não trará danos de forma direta para as células.

De acordo com o American National Cancer Institute (NCI), as *guidelines* apontam que o critério para que se considere um extrato com potencial de citotoxicidade, quando o IC_{50} é inferior a 20 µg/mL (Hameed, 2012). Desta forma, verificou-se que nenhum dos extratos se enquadram dentro dos valores das *guidelines*.

Contudo, deve-se salientar o facto de que neste ensaio não foram realizados estudos de comparação em diferentes tempos, nomeadamente de 48h e 72h, o que seria benéfico para que fosse possível obter conclusões mais robustas.

5. Conclusão

As plantas têm sido alvo de inúmeros estudos nas diferentes áreas de medicina, pois estas apresentam componentes bioativos que conferem atividades biológicas benéficas para uso humano, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, entre outros.

Desta forma, neste estudo foi determinado o teor de compostos fenólicos, a capacidade antioxidante da planta através de diferentes ensaios, o fator de proteção solar e a capacidade de absorção UV dos extratos aquoso e metanólico de *M. marina*.

De acordo com ensaios previamente realizados, ambos os extratos apresentam baixo teor de compostos fenólicos totais, quando comparado com estudos realizados em plantas da mesma família. Quanto ao ensaio do radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico), o extrato metanólico possui uma alta atividade antioxidante, enquanto o extrato aquoso possui baixa capacidade. No que concerne ao ensaio do peróxido de hidrogénio, ambos os extratos apresentam um $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, sendo considerados com alta capacidade para reter o peróxido de hidrogénio. Quanto ao ensaio de FRAP, este demonstrou que o extrato aquoso possuía maior capacidade de reduzir o ião férrico, comparativamente ao extrato metanólico. Estes resultados podem estar diretamente relacionados com o teor de compostos fenólicos neles existentes, mas pode também haver influência de outros compostos, nomeadamente dos flavonóides.

No que diz respeito aos ensaios de proteção solar e de absorção UV, o extrato aquoso foi o que demonstrou valores mais promissores, podendo este ser utilizado isolado ou conjugado com filtros sintéticos, com a finalidade de potencializar o FPS.

Relativamente ao ensaio de viabilidade celular, para as células HaCat, ambos os extratos demonstraram ter baixo potencial citotóxico nas células em estudo (apesar de mais marcado no extrato metanólico, particularmente a partir da concentração de $250 \mu\text{g/mL}$), sendo desta forma possível aferir que estes possuem alta capacidade de proteção para estas células, em particular nas concentrações mais baixas.

Como perspetiva futura, destaca-se a necessidade de realizar ensaios que consigam identificar de forma mais precisa os compostos presentes na planta, nomeadamente através de HPLC. Refere-se igualmente uma necessidade de realizar ensaios de toxicidade cutânea, nomeadamente com períodos de incubação diferentes assim como realizar para outra linhagem

celular, nomeadamente fibroblastos, de modo a perceber a possibilidade de incorporação destes extratos em cosméticos.

Embora Portugal apresente uma vasta flora, com atividades biológicas interessantes, os estudos ainda são escassos. Desta forma, pretendemos com este estudo, abrir novos caminhos e interesses nesta área.

Para uma maior robustez de resultados, é necessário proceder a mais estudos, nomeadamente para se detetar diferentes componentes que possuam atividades biológicas e que sustentem os resultados obtidos.

Referências Bibliográficas

- Aldoghachi, F. E. H., Noor Al-Mousawi, U. M., & Shari, F. H. (2021). Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid Extracted and Purified from *Mentha piperita*. *Archives of Razi Institute, Online First*. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.356072.1770>
- Alves, R. C., Costa, A. S. G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M. J., & Oliveira, B. (2010). Antiradical Activity, Phenolics Profile, and Hydroxymethylfurfural in Espresso Coffee: Influence of Technological Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12221–12229. <https://doi.org/10.1021/jf1031229>
- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. (2014). Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, *19*(5), 6202–6219. <https://doi.org/10.3390/molecules19056202>
- Caraba, A., Crişan, V., Romoşan, I., Mozoş, I., & Murariu, M. (2017). Vitamin D Status, Disease Activity, and Endothelial Dysfunction in Early Rheumatoid Arthritis Patients. *Disease Markers*, *2017*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/5241012>
- Censi, R., Vargas Peregrina, D., Gigliobianco, M. R., Lupidi, G., Angeloni, C., Pruccoli, L., Tarozzi, A., & Di Martino, P. (2021). New Antioxidant Ingredients from Brewery By-Products for Cosmetic Formulations. *Cosmetics*, *8*(4), 96. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040096>
- Dell'Annunziata, F., Cometa, S., Della Marca, R., Busto, F., Folliero, V., Franci, G., Galdiero, M., De Giglio, E., & De Filippis, A. (2022). In Vitro Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of *Arctostaphylos uva-ursi* Leaf Extract against *Cutibacterium acnes*. *Pharmaceutics*, *14*(9), 1952. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091952>
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Flamini, G., Luigi Cioni, P., Morelli, I., Ceccarini, L., Andolfi, L., & Macchia, M. (2003). Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, *18*(5), 460–462. <https://doi.org/10.1002/ffj.1253>
- Gromkowska-Kępa, K. J., Puścion-Jakubik, A., Markiewicz-Żukowska, R., & Socha, K. (2021). The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging—Review of in vitro studies. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *20*(11), 3427–3431. <https://doi.org/10.1111/jocd.14033>

- Gu, Y., Han, J., Jiang, C., & Zhang, Y. (2020). Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Research Reviews*, *59*, 101036. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>
- Hameed, E. (2012). Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, *2*(2), 93–112. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2012/1040>
- Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2004). Antioxidant activities of flavidin in different in vitro model systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*(19), 5141–5146. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.028>
- Lips, P., & Van Schoor, N. M. (2011). The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *25*(4), 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.002>
- Liu, X.-G., Huang, M.-Y., Gao, P.-Y., Liu, C.-F., Sun, Y.-Q., Lv, M.-C., Yao, G.-D., Zhang, L.-X., & Li, D.-Q. (2018). Bioactive constituents from *Medicago sativa* L. with antioxidant, neuroprotective and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, *45*, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.025>
- Marionnet, C., Tricaud, C., & Bernerd, F. (2014). Exposure to Non-Extreme Solar UV Daylight: Spectral Characterization, Effects on Skin and Photoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 68–90. <https://doi.org/10.3390/ijms16010068>
- Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., & Sarkar, B. K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, *19*(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.003>
- Orak, H. H., Karamač, M., Orak, A., TeniKeciEr, H. S., & Amarowicz, R. (2021). Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of Different Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties Grown in Turkey. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, *31*(4), 995–1000. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.946487>
- Paun, G., Neagu, E., Alecu, A., Albu, C., Seciu-Grama, A.-M., & Radu, G. L. (2024). Evaluating the Antioxidant and Antidiabetic Properties of *Medicago sativa* and *Solidago virgaurea* Polyphenolic-Rich Extracts. *Molecules*, *29*(2), 326. <https://doi.org/10.3390/molecules29020326>
- Puertas-Mejía, M. A., Gutierrez-Villegas, M. I., Mejía-Giraldo, J. C., Winkler, R., & Rojano, B. (2018). In vitro UV absorption properties and radical scavenging capacity of *Morella parvifolia*

- (Benth.) Parra-Os. Extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(3).
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000317498>
- Queirós, C. S., & Freitas, J. P. (2019). Sun Exposure: Beyond the Risks. *Dermatology Practical & Conceptual*, 249–252. <https://doi.org/10.5826/dpc.0904a01>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., & Aschner, M. (2017). Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports*, 4, 245–259. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.006>
- S, P., Rani Inala, M. S., Hs, N., Avm, K., & P, K. (2018). A PILOT STUDY ON SUN PROTECTION FACTOR OF PLANT EXTRACTS: AN OBSERVATIONAL STUDY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(4), 67. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i4.23671>
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P., Sharifi-Rad, M., Kumar, P., & Sharifi-Rad, J. (2018). Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*, 8(4), 124. <https://doi.org/10.3390/biom8040124>
- Schalka, S., & Reis, V. M. S. D. (2011). Fator de proteção solar: Significado e controvérsias. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 507–515. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300013>
- Schuch, A. P., Moreno, N. C., Schuch, N. J., Menck, C. F. M., & Garcia, C. C. M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>
- Skarupova, D., Vostalova, J., & Rajnochova Svobodova, A. (2020). Ultraviolet A protective potential of plant extracts and phytochemicals. *Biomedical Papers*, 164(1), 1–22. <https://doi.org/10.5507/bp.2020.010>
- Solano, F. (2020). Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules*, 25(7), 1537. <https://doi.org/10.3390/molecules25071537>
- Swaney, M. H., & Kalan, L. R. (2021). Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. *Infection and Immunity*, 89(4), e00695–20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20>

- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age-Related Diseases? *Molecules*, *24*(9), 1801. <https://doi.org/10.3390/molecules24091801>
- Tava, A., Biazzi, E., Ronga, D., Mella, M., Doria, F., Accogli, R., Argentieri, M. P., & Avato, P. (2020). Triterpenic saponins from *Medicago marina* L. *Phytochemistry*, *174*, 112333. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112333>
- Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the Addition of Propolis Extract on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Craft Beer. *Journal of Chemistry*, *2017*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>
- Van Breusegem, F., & Remacle, C. (2023). Oxidative stress responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, *204*, 394. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.05.012>
- Van Der Rhee, H. J., De Vries, E., & Coebergh, J. W. (2016). Regular sun exposure benefits health. *Medical Hypotheses*, *97*, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.10.011>
- Wang, S.-J., & Chen, M.-Y. (2020). The effects of sunlight exposure therapy on the improvement of depression and quality of life in post-stroke patients: A RCT study. *Heliyon*, *6*(7), e04379. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04379>