UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e
fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá)**

Karini Carvalho Costa

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e
fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá)***

Karini Carvalho Costa

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Avaliação in vitro e in vivo do potencial fotoprotetor e
fotoquimioprotetor da fração purificada de Inga edulis (Ingá)***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Karini Carvalho Costa

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/05/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Karini Carvalho

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá). Ribeirão Preto, 2015. 102.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira

1. Radiação Ultravioleta. 2. Atividade Antioxidante. 3. Atividade Anti-inflamatória. 4. Fotoquimioproteção. 5. *Inga edulis*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karini Carvalho Costa

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Karini Carvalho Costa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus queridos pais Ivanilda L. C. Costa
e Moacir Costa pelo apoio incondicional, ao meu
amor Alan M. Diniz pela compreensão e
incentivo nesta fase tão importante da minha vida
e aos familiares que contribuíram para esta
conquista.*

Agradecimientos

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me conceder sabedoria, discernimento, determinação e coragem para enfrentar os desafios encontrados no decorrer destes dois anos, e alcançar os objetivos propostos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Ivanilda e Moacir, pela atenção e especialmente por me proporcionarem a melhor herança: a educação. Também por me ensinaram a ter princípios, lutar pelos meus objetivos e sonhos. Obrigada pelo amor e carinho incondicional que dedicam a mim, e por serem protagonistas na minha formação pessoal.

Ao meu amor Alan, que me incentivou desde o processo de seleção, bem como vibrou quando fui aprovada no mestrado. Agradeço de coração pela cumplicidade e pela paciência nos momentos de privação da minha companhia e atenção. Obrigada pelo amor sincero que me oferece em todos os momentos.

Aos meus tios e padrinhos de batismo Fátima e Ivanildo pela força e especialmente pelas orações. A minha tia e madrinha de crisma Terezinha, pelo exemplo de dedicação profissional, pelo carinhoso apoio e por me aconselhar nos momentos de dúvidas. Ao meu primo irmão Alex, por estar sempre ao meu lado incentivando meus projetos de vida. E aos demais familiares por compartilharem comigo os momentos difíceis e de alegria.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca um agradecimento especial, primeiramente pela oportunidade concedida para orientação e também por compartilhar seus conhecimentos e se doar para o progresso deste trabalho. Suas críticas construtivas, reflexões e discussões foram fundamentais ao longo do percurso. Obrigada pela compreensão, paciência e por acreditar em mim. Foi uma honra ser orientada por uma profissional tão competente.

À empresa Amazon Dreams pelo fornecimento da fração purificada do extrato de *Inga edulis* estudada, em especial ao Dr. Hervé Rogez.

Aos docentes e aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por contribuírem para a minha formação, através de seus conhecimentos e também pela atenção e disposição nos momentos necessários.

À José Roberto Jabor, que é mais que um técnico de laboratório, é um amigo atencioso, disposto e dedicado para ajudar no que for preciso.

Ao professor Dr. Thiago Mattar Cunha da FMRP-USP e ao doutorando Rangel Leal Silva pela realização de uma parte das análises das amostras *in vivo*.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, por estarem ao meu lado durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos momentos de descontração, pela compreensão, troca de experiências e especialmente ajuda mútua e cooperação. Ana Claudia, Ana Luíza, Ana Paula, Bianca, Camila, Carla, Cibele, Dayane, Frederico, Geórgia, Greyce, Karol, Maria Amélia, Mayara, Michelle, Patrícia, Rebeca, Rosana, Stéfani, Sônia, em especial a Lidianne Advíncula que em todos os momentos pude contar e que levarei no coração.

À Ana Luiza S.A. Forte, Sônia A. Figueiredo e Dayane C. de Mores, pela ajuda e disponibilidade indispensáveis para a realização dos experimentos *in vivos*. E também pela amizade.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP Eleni Angeli Passos, Henrique Theodoro, Rafael Braga Poggi, Rosemary Ioshimine Gerolineto e Rosana Florêncio, pela eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados.

A todos os funcionários da FCFRP-USP, em especial ao Sr. Antônio (Portaria) e Sra. Evanira (Copa), pelo auxílio e gestos de carinho, pois mesmo não trabalhando mais na USP/RP, deixaram saudade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e desta conquista.

Muito Obrigada!

*"Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos que
as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que
parecia impossível."*

(Charles Chaplin)

RESUMO

COSTA, K.C. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá).** 2015. 102. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A exposição à radiação ultravioleta (UV) pode provocar um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante da pele, prejudicando sua integridade e causando diversas alterações moleculares que conduzem ao fotoenvelhecimento e ao câncer de pele. Considerando a estreita relação entre o estresse oxidativo e os efeitos danosos causados por esta radiação na pele, aliado ao fato de que estudos demonstram que o uso de protetores solares não é completamente efetivo na prevenção destes danos, a fotoquimioproteção, que consiste no uso de substâncias naturais com diversas propriedades biológicas em formulações tópicas, aparece como uma importante alternativa nas terapias de fotoproteção. A administração tópica de substâncias naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias poderia prevenir ou reverter as alterações moleculares desencadeadas pela radiação UV, bem como os danos clínicos resultantes das mesmas. Diante disto, a fração purificada de *Inga edulis* foi avaliada *in vitro* quanto ao seu potencial antioxidante e fotoprotetor, e ainda, incorporada a uma formulação tópica para a liberação cutânea de seus compostos, foi avaliada *in vivo* quanto ao seu potencial fotoquimioprotetor. Os resultados obtidos demonstraram uma elevada capacidade antioxidante e um efeito fotoprotetor da fração purificada *in vitro* e a hidrossolubilidade de seus compostos antioxidantes. A formulação permitiu a penetração dos compostos da fração purificada na pele dos animais, proporcionando um aumento da atividade antioxidante e anti-inflamatória da pele, diminuindo a atividade da enzima mieloperoxidase e os níveis da citocina TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e da quimiocina derivada de queratinócitos, KC/CXCL1, após radiação UVB, porém não impediu a depleção da glutathione redutase, o aumento da atividade da metaloproteinase 9, e o aumento dos níveis da interleucina-1 β . A formulação adicionada da fração purificada não foi capaz de absorver a radiação UVB.

Palavras-chave: Radiação Ultravioleta, Atividade Antioxidante, Atividade Anti-inflamatória, Fotoquimioproteção, *Inga edulis*.

ABSTRACT

COSTA, K.C. **Evaluation *in vitro* and *in vivo* of the photoprotective potential and photochemoprotector of the fraction purified from *Inga edulis* (Inga).** 2015. 102. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Exposure to ultraviolet (UV) radiation can cause imbalance in the oxidant balance/antioxidant skin, causing damage to its integrity and leading to several changes, conducting to premature aging and skin cancer. Considering the close relationship between oxidative stress and the damaging effects caused by this radiation in the skin, coupled with the fact that studies show that the use of sunscreens is not completely effective in preventing such damage, photochemoprotector, that is the use of natural substances with diverse biological properties in topical formulations, appears as an important alternative therapy in photoprotection. Topical administration of natural substances with antioxidant and anti-inflammatory properties could prevent or reverse molecular changes triggered by UV radiation, as well as the clinical resulting therefrom. Thus, purified fraction of *Inga edulis* was evaluated *in vitro* for the antioxidant potential and photoprotector, and also incorporated into a topical formulation for skin release of its compounds, was evaluated *in vivo* for their photochemoprotector potential. The results showed a high antioxidant capacity and photoprotective effect of fraction purified *in vitro* and water solubility of their antioxidant compounds. The formulation allowed penetration the compound purified fraction on the skin of animals, resulting in an increase the antioxidant activity and anti-inflammatory skin by decreasing the activity the myeloperoxidase enzyme and levels of cytokine TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and chemokine-derived keratinocytes, KC / CXCL1, after UVB radiation, but not prevented depletion of glutathione reductase, increased activity of metalloproteinase 9, and increased levels the interleukin-1 β . Formulation added to the purified fraction was not able to absorb UVB radiation.

Keywords: Ultraviolet Radiation, Antioxidant Activity, Anti-Inflammatory Activity, photochemoprotector, *Inga edulis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Efeitos da radiação UV nas biomoléculas celulares da pele.....	03
Figura 2.	Principais lesões no DNA induzidos pela absorção da radiação UVB.....	04
Figura 3.	Vias de sinalização induzidas pela radiação UV.....	08
Figura 4.	Estrutura química básica dos flavonóides (núcleo flavano).....	11
Figura 5.	Estrutura química da Miricitrina.....	13
Figura 6.	Estrutura química da Vicenina-2	14
Figura 7.	Delineamento experimental usado no estudo de fotoproteção.....	26
Figura 8.	Esquema da caixa utilizada para exposição dos animais à radiação UVB.....	28
Figura 9.	Perfil cromatográfico da fração purificada de <i>Inga edulis</i> obtida por CLAE e compostos majoritários identificados.....	33
Figura 10.	Curva da porcentagem de inibição da quimioluminescência em função das concentrações da fração e curva de calibração entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência e a massa da fração purificada.....	35
Figura 11.	Medida da intensidade da fluorescência gerada pela DCF em cultura de células de fibroblastos (L929) com o agente oxidante H ₂ O ₂ e porcentagem de diminuição da intensidade da fluorescência na presença de soluções da fração purificada.....	37

Figura 12.	Medida da intensidade da fluorescência gerada pela DCF em cultura de célula de fibroblastos (L929) com o agente oxidante radiação UVA e porcentagem de diminuição da intensidade da fluorescência na presença de soluções da fração purificada.....	38
Figura 13.	Redução da quimioluminescência (área sob a curva) e porcentagem de redução da quimioluminescência em relação ao branco gerada no sistema xantina/XOD/luminol obtidas no estudo de penetração <i>in vivo</i>	40
Figura 14.	Perfil cromatográfico obtidos por CLAE das amostras de pele dos animais tratadas com a formulação placebo e com a formulação adicionada de 1% da fração purificada	42
Figura 15.	Quantidade de EROs formada e porcentagem de proteção contra a radiação UVA das células de fibroblastos (L929)	44
Figura 16.	Viabilidade em porcentagem das células de fibroblastos (L929) expostas ou não à radiação UVB.....	45
Figura 17.	Quantidade de GSH nas amostras de pele dos animais expostos ou não à radiação UVB.....	47
Figura 18.	Quantificação da atividade da MPO em amostras de pele expostas ou não à radiação UVB.....	48
Figura 19.	Quantificação da atividade da MPO em amostras da pele exposta à radiação UVB, na ausência ou presença do inibidor	49
Figura 20.	Quantificação da atividade da MPO comercial na ausência ou presença do inibidor ou da fração purificada.....	50
Figura 21.	Visualização das bandas de atividade proteolítica das MMP-9 e	51

MMP-2 em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina e
quantificação das áreas das bandas da atividade da MMP-9.....

Figura 22. Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α e da quimiocina 53
KC/CXCL1 na pele dos animais não irradiados ou expostos à
radiação UVB.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gradiente por estepe utilizado na eluição dos compostos majoritários da fração purificada de <i>Inga edulis</i> por CLAE.....	20
Tabela 2.	Dados obtidos da porcentagem de inibição da quimioluminescência e das massas encontradas da fração purificada na fase aquosa das amostras controles e particionada na mistura binária octanol/água....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus centígrados
µg	Micrograma
µL	Microlito
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
¹ O ₂	Oxigênio singleto
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a curva
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
CI	Controle irradiado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm ²	Centímetros quadrados
CNI	Controle não irradiado
CO ₂	Dióxido de carbono
COLIPA	Associação Comercial Européia de Cosméticos
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPDs	Dímeros ciclobutano pirimidina
CXCR	Receptor de quimiocina CXC
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [•]	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
ECA	Equivalente de catequina
ECI	Equivalente de cianidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno glicol tetra-acético

ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMR	Equivalente de miricetina-3- <i>O</i> - α -ramnopiranosídeo
EPM	Erro padrão da média
EQ	Equivalente de quercetina
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fase aquosa
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Fe ²⁺	Íons Ferro
FPS	Fator de Proteção Solar
g	Grama
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil-amônio
IC ₅₀	Concentração que inibe 50%
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IF	Irradiado tratado com formulação adicionada de 1% da fração purificada de <i>Inga edulis</i>
IKB	Inibidor do fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1-alfa
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Irradiado tratado com formulação placebo
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KC/CXCL1	Quimiocina derivada de queratinócito/quimiocina CXC de ligante

Ko/a	Coefficiente de partição octanol/água
LC	Cromatografia líquida
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases de Matrix
MMP-1	Colagenase 1 ou colagenase intersticial
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Estromelisina -1
MMP-8	Colagenase 2
MMP-9	Gelatinase B
MMP-13	Colagenase 3
MPO	Mieloperoxidase
MRT	Miricitrina
MS	Espectrometria de massa
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NIF	Não irradiado tratado com formulação adicionada de 1% da fração purificada de <i>Inga edulis</i>
NIP	Não irradiado tratado com formulação placebo
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPT	O-ftalaldeído
p/p	Peso/peso

p/v	Peso/volume
PBS	Tampão fosfato salina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial de hidrogênio
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
ROO [•]	Radical peroxil
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
-SH	Tiol
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
UFPA	Universidade Federal do Pará
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VCT	Vicenina-2
v/v	Volume/volume
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Radiação solar e danos causados à pele.....	2
1.2. Extratos vegetais como agentes fotoquimioprotetores	9
1.2.1. <i>Inga edulis</i> (Ingá)	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção da fração purificada de <i>Inga edulis</i>	18
3.2. Quantificação dos compostos majoritários presentes na fração purificada de <i>Inga edulis</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	19
3.3. Caracterização funcional da atividade antioxidante e físico-química da fração purificada de <i>Inga edulis</i>	20
3.3.1. Avaliação da atividade antioxidante da fração purificada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina oxidase/luminol (xantina/XOD/luminol).....	20
3.3.1.1. Preparo das amostras	20
3.3.1.2. Procedimento do Ensaio	20
3.3.2. Determinação do coeficiente de partição octanol/água da fração purificada	21
3.3.3. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante da fração purificada por medida da intensidade da fluorescência gerada pela diclorofluoresceína em cultura de célula	22
3.3.3.1. Linhagem e cultivo celular	22
3.3.3.2. Preparo das amostras	22
3.3.3.3. Procedimento do ensaio.....	22
3.4. Preparo de emulsão estabilizada por polímero hidrofílico adicionada da fração purificada de <i>Inga edulis</i>	23
3.5. Avaliação da penetração/retenção cutânea <i>in vivo</i> dos compostos antioxidantes da fração purificada incorporada à formulação	23
3.5.1. Animais.....	23
3.5.2. Procedimento do ensaio.....	24
3.6. Avaliação do potencial fotoprotetor <i>in vitro</i> da fração purificada de <i>Inga edulis</i> e da formulação adicionada da fração	25

3.6.1. Amostras	25
3.6.2. Cultivo celular e irradiação UVA	25
3.6.3. Cultivo celular e irradiação UVB	26
3.7. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor <i>in vivo</i> da fração purificada incorporada à formulação	27
3.7.1. Eficácia <i>in vivo</i> da formulação contendo a fração purificada na proteção do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)	28
3.7.2. Avaliação da eficácia da formulação contendo a fração purificada em diminuir a atividade da mieloperoxidase (MPO)	28
3.7.2.1. Avaliação <i>in vitro</i> da presença de MPO na amostra de pele exposta à radiação UVB	29
3.7.2.2. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de inibição da MPO pelos compostos da fração purificada	29
3.7.3. Avaliação da eficácia da formulação adicionada da fração purificada em inibir a atividade/secreção das metaloproteinases (MMPs)	30
3.7.4. Quantificação das citocinas IL-1 β e TNF- α e quimiocina KC/CXCL1	30
3.8. Análise estatística dos resultados	31
 4. RESULTADOS	 32
4.1. Quantificação dos compostos majoritários presentes na fração purificada de <i>Inga edulis</i> por CLAE	33
4.2. Caracterização funcional da atividade antioxidante e físico-química da fração purificada de <i>Inga edulis</i>	34
4.2.1. Avaliação da atividade antioxidante da fração purificada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol e determinação do coeficiente de partição octanol/água da fração purificada	34
4.2.2. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante da fração purificada por medida da intensidade da fluorescência gerada pela diclorofluoresceína em cultura de células	36
4.3. Avaliação da penetração/retenção cutânea <i>in vivo</i> dos compostos antioxidantes da fração purificada incorporada à formulação	38
4.3.1. Quantificação da fração purificada penetrada na pele por medida da inibição da quimioluminescência	39
4.3.2. Quantificação dos compostos majoritários penetrados na pele por CLAE	41
4.4. Avaliação do potencial fotoprotetor <i>in vitro</i> da fração purificada de <i>Inga edulis</i> e da formulação adicionada da fração	43
4.5. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor <i>in vivo</i> da fração purificada incorporada à formulação	46
4.5.1. Eficácia <i>in vivo</i> da formulação contendo a fração purificada na proteção do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)	46
4.5.2. Avaliação da eficácia da formulação contendo a fração purificada em diminuir a atividade da mieloperoxidase (MPO)	47

4.5.3. Avaliação da eficácia da formulação adicionada da fração purificada em inibir a atividade/secreção das metaloproteinases (MMPs).....	50
4.5.4. Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α e quimiocina KC/CXCL1	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS	66

1. Introdução

1.1. Radiação solar e danos causados à pele

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele é uma barreira entre o meio interno e o meio externo, que protege o organismo contra agentes agressores físico-químicos e microbiológicos do meio ambiente (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). É constituída por três camadas de tecido: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por um conjunto de células vivas e um conjunto de células mortas, que originam respectivamente a epiderme viável e o estrato córneo. A epiderme viável, por sua vez, é composta de células metabolicamente ativas, tais como, queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. A derme, localizada abaixo da epiderme, é uma camada mais flexível e resistente, constituída de fibras de colágeno, elastina e fibroblastos e, ao contrário da epiderme, é vascularizada. E, por último, a hipoderme, é formada por tecido adiposo, cuja principal função é armazenar energia (CHU, 2012).

Por ser uma barreira protetora de longa extensão, a pele está diretamente exposta aos efeitos deletérios da radiação solar que é composta de um espectro contínuo de radiações eletromagnéticas com comprimentos de ondas ultravioletas (UV), visível e infravermelho. A radiação UV pode ser dividida em 3 faixas de acordo com suas características de propagação e efeito biológico: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC é um potente agente mutagênico, mas que praticamente não atinge a superfície terrestre, pois é absorvida pela camada de ozônio. Por outro lado, a radiação UVB (5%) e especialmente a UVA (95%) são capazes de atingir a terra causando danos na pele (Figura 1). A UVB, por ser altamente energética, é capaz de penetrar na epiderme provocando danos diretos ao DNA, inflamação (eritema ou queimadura solar), imunossupressão, melanogênese, fotoenvelhecimento e câncer de pele, além de danos indiretos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A radiação UVA, menos energética que a UVB, penetra mais na pele atingindo a derme, causando indiretamente danos biológicos, através das EROs que são geradas por fotossensibilização endógena. Estas EROs, por sua vez, afetam biomoléculas tais como, lipídios, proteínas e DNA, ocasionando principalmente fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (AFAQ; MUKHTAR, 2001; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; AFAQ, 2011; FIGUEIREDO et al., 2014).

Figura 1: Efeitos da radiação UV nas biomoléculas celulares da pele. Modificada de Svobodova, Walterova e Vostalova (2006).

Neste contexto, a radiação UVB, ao entrar em contato com a pele (Figura 1), pode ser absorvida diretamente por cromóforos celulares, como as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico (DNA), porfirinas, riboflavinas, aminoácidos e seus derivados, como o ácido trans-urônico e melanina. Quando absorvida, esta radiação desencadeia reações fotoquímicas que causam danos direto ao DNA, induzindo principalmente a formação de dímeros do tipo ciclobutano pirimidina (CPDs) e dos fotoprodutos (6,4) pirimidina-pirimidona (Figura 2). Alguns dímeros CPDs, como timina-citosina e citosina-citosina, são responsáveis por desencadear mutações no gene p53, que é fundamental para o reparo do DNA, uma vez que este é importante na interrupção do crescimento celular e no processo de apoptose. Logo, quando ocorrem mutações neste gene, as células perdem a sua capacidade de se conduzir ao processo de apoptose e, como consequência, desencadeiam a fotocarcinogênese (HECK et al., 2004; CADET; SAGE; DOUKI, 2005; MONTAGNER; COSTA, 2009; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; TAKAHASHI et al., 2011; BOLFA et al., 2013; GODIC et al., 2014).

Figura 2: Principais lesões no DNA induzidas pela absorção da radiação UVB: dímeros de ciclobutano pirimidina (A) e fotoprodutos (6,4) pirimidina-pirimidona (B). Retirada de Svobodova, Walterova e Vostalova (2006).

Por outro lado, a radiação UVA (Figura 1) é absorvida por fotossensibilizantes endógenos que, quando excitados, podem tanto realizar a transferência de elétrons por meio de uma interação direta com outra biomolécula resultando, então, na formação de radicais livres, quanto transferir seus elétrons para moléculas de oxigênio, produzindo assim EROs. Dessa forma, os danos no DNA induzidos indiretamente por esta radiação incluem a formação de dímeros de pirimidina e de 8-hidroxi-7,8-diidroguanina e/ou 8-oxo-7,8-diidroguanina, que podem ser utilizados como marcador de exposição crônica à radiação UV. A maioria desses fotossensibilizantes endógenos ainda permanecem desconhecidos, mas alguns exemplos são a porfirina, a melanina e o ácido trans-urônico que são substâncias cromóforas (RAVANAT; DOUKI; CADET, 2001; WONDRAK; JACOBSON M.; JACOBSON E., 2005; PANDEL et al., 2013; YIN et al., 2013).

As EROs geradas pela radiação UV compreendem vários metabólitos ativos, incluindo radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical peroxil ($\text{ROO}^\bullet$), e os precursores desses metabólitos ativos, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (AFAQ; MUKHTAR, 2001; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; KRYSTON et al., 2011).

Em condições normais, as EROs formadas continuamente pelas células, como consequência de reações bioquímicas oxidativas ou de fatores externos, são rapidamente removidas pelo sistema de defesa antioxidante da pele, o qual inclui enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, e antioxidantes não enzimáticos como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno, os quais são suficientes nessas condições para manter a homeostasia do organismo. Entretanto, a capacidade destes antioxidantes é limitada após uma exposição excessiva da pele à radiação UV, uma vez que ocorre depleção destes antioxidantes e um aumento na quantidade de EROs formadas, ocasionando um desequilíbrio no sistema pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro, desencadeando, assim, um estresse oxidativo (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; KOHEN; GATI, 2000; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; GODIC et al., 2014).

A glutathione é um tripeptídeo endógeno constituído do ácido γ -glutâmico, cisteína e glicina, e é o mais prevalente tiol intracelular presente na maioria dos tecidos, incluindo a pele. Esse antioxidante não enzimático, quando em sua forma reduzida (GSH), é capaz de sequestrar diretamente radicais livres pela transferência de hidrogênio ao radical, através do grupo tiol (-SH) da cisteína, desempenhando um papel fundamental na defesa celular contra o dano oxidativo. Após a exposição da GSH ao agente oxidativo, esta é oxidada a GSSG com a participação da enzima glutathione peroxidase, e reciclado novamente a GSH pela enzima glutathione reductase, com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) atuando como doador de hidrogênio. A GSH também funciona como um doador de hidrogênio para vários outros antioxidantes endógenos, tais como o ácido ascórbico. Logo, a disponibilidade deste antioxidante é essencial para o sistema de fotoproteção cutânea. Contudo, sob condições de excesso de agentes oxidantes, ocorre um desequilíbrio entre o consumo de GSH e a redução da sua forma oxidada GSSG, contribuindo, assim, para o estresse oxidativo (AFAQ; MUKHTAR, 2001; CARINI et al., 2000).

Além dos danos causados no DNA, as EROs provocam oxidação protéica em aminoácidos como prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina, os quais levam à fragmentação da proteína quando oxidados. Como a maioria das proteínas não possui mecanismo de reparo, é necessário que ocorra uma nova síntese pelo organismo para substituir as que foram danificadas (BOVOK; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004). As EROs também alteram a função celular através da oxidação dos lipídeos das membranas biológicas, visto que estes são as biomoléculas mais susceptíveis ao ataque dessas espécies reativas, pois são altamente insaturados e banhados por fluídos ricos em oxigênio e metal

(INAL; KANBAK; SUNAL, 2001; BUEGE; AUST, 1978). Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana celular sofre uma desorganização com liberação de fosfolipídios que atuam sinergicamente, aumentando a atividade da fosfolipase A₂ e da ciclooxygenase 2 (COX-2), induzidas pela radiação UV, resultando na produção de leucotrienos, e prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂), que conduzirá à inflamação (HRUZA; PENTLAND, 1993; BAYIR, 2005).

O processo inflamatório inclui uma cascata de eventos que ocorrem em resposta ao dano tecidual, com o intuito de repará-los. Durante uma exposição contínua, a radiação UV é capaz de induzir à expressão da óxido nítrico sintase (NOS), enzima que produz o óxido nítrico (NO). O NO, juntamente com as PGE₂ (geradas após peroxidação lipídica) e outros mediadores liberados no local da inflamação, como as histaminas, vão ocasionar uma vasodilatação arteriolar com aumento do fluxo sanguíneo para subsequente migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) da circulação sanguínea para o tecido lesado. Além dessas substâncias quimiotáticas, citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e quimiocinas, geradas por melanócitos e queratinócitos da epiderme e por fibroblastos, mastócitos e outras células inflamatórias da derme, também são liberadas após a radiação UV. As células endoteliais, quando ativadas por estas citocinas, expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), enquanto que as quimiocinas induzem alterações que levam à liberação das integrinas. As selectinas medeiam a adesão fraca dos leucócitos, enquanto que as integrinas, a adesão forte, já as quimiocinas ativam e estimulam a migração transendotelial dos leucócitos para o local da inflamação. Esta migração dos leucócitos circulantes para o tecido é direcionada pela presença de um gradiente dessas substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. (FIGUEIREDO et al., 2014; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; CRUVINEL et al., 2010).

As quimiocinas constituem uma vasta família de citocinas de baixo peso molecular, responsáveis pela movimentação e recrutamento dos leucócitos para o local da inflamação. Para que isso ocorra, a ligação quimiocina-receptor inicia uma complexa cascata de sinalização que gera respostas quimiotáticas, liberação de EROs, degranulação e alteração na afinidade das integrinas na superfície celular. De acordo com o número e o espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, as quimiocinas são classificadas em quatro sub-famílias: CXC, CC, CX₃C e C (C significa cisteína e X representa aminoácido). A sub-família CXC, em especial, é caracterizada

principalmente pela ativação e recrutamento de neutrófilos para os tecidos durante o processo inflamatório. A quimiocina KC (CXCL1), por exemplo, derivada de queratinócitos e encontrada em camundongos (interleucina-8 (IL-8) correspondente em humanos), é a principal molécula quimioatraente de neutrófilos para o local da inflamação, sendo seu maior receptor o CXCR2 (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; VIEIRA et al., 2009; PHILLIPSON; KUBES, 2011; CRUVINEL et al., 2010; RAVIDRAN et al., 2013; MOURET et al., 2015).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) infiltrados, eosinófilos, basófilos e principalmente os neutrófilos, são constituídos por diferentes grânulos, os quais podem ser primários ou azurófilos, ricos em mieloperoxidase (MPO), β -glucuronidase, elastase, lisozima; secundários ou específicos, que apresentam componentes como lactoferrina e colagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13); e terciários com grânulos de gelatinase (MMP-2, MMP-9), leucolisina e catepsinas (MOLLINEDO, 2003; BORREGAARD; COWLAND, 1997; BEURDEN; HOFF, 2005; KUMAR; SHARMA, 2010).

A MPO, enzima da superfamília da heme peroxidase armazenada nos grânulos azurófilos, é a mais abundante dos neutrófilos, representando cerca de 5% de sua massa seca. Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de um haleto (cloreto, brometo, tiocianato), a MPO catalisa a formação de poderosos intermediários reativos, tais como: ácido hipocloroso, ácido bromoso, ácido hipotiocianos, radical tirosil e espécies reativas de nitrogênio, que causam lesões teciduais no local da inflamação. Desde que Bradley e colaboradores (1982) utilizaram esta enzima para avaliar a inflamação cutânea e quantificar a MPO epidermal, ela vem sendo considerada um biomarcador útil para medir e quantificar o influxo de PMNs na pele após exposição a agentes agressivos como, por exemplo, a radiação UV, ou em algum outro tecido que apresente um processo patológico acompanhado de inflamação (CROSS et al., 2003; JAIN et al., 2014; ODOBASIC et al., 2013; PULLI et al., 2013).

Paralelamente a esses eventos, a IL-1 e o TNF- α liberados no local da inflamação vão atuar em vias como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Figura 3) (SHAH; MAHAJAN, 2013; KWON; JUNG; YANG, 2013).

Figura 3: Vias de sinalização induzidas pela radiação UV. Ativação do NF-κB e MAPK, aumento nos níveis de diferentes receptores de fatores de crescimento com consequente aumento das MMPs, e regulação negativa do TGF-β, resultando na diminuição da síntese de colágeno. Modificada de Shah e Mahajan (2013).

O NF-κB é um complexo de proteínas capaz de regular a transcrição do DNA, que normalmente se encontra inativo no citoplasma por ligação com sua molécula inibidora (I-KB). Ao serem liberados, a IL-1 e o TNF-α causam a degradação da I-KB, deixando o NF-κB em sua forma livre. Uma vez em sua forma livre, o NF-κB regula a transcrição de genes envolvidos na produção de substâncias da resposta inflamatória, tais como, TNF-α, IL-1, interleucina-6 (IL-6), IL-8 e ICAM-1, além de regular a transcrição de genes que são responsáveis pela formação das metaloproteínas de matriz (MMPs), e de estimular o fator de crescimento de fibroblastos básicos da derme (bFGF) (BASU-MODAK; TYRRELL, 2001; SHAH; MAHAJAN, 2013).

Já a MAPK compreende um grande número de proteínas serina/treonina quinases que podem ser quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) ou então quinase p38, envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse oxidativo e apoptose. A ativação destas quinases pode ocorrer em queratinócitos, em resposta ao dano oxidativo causado pela radiação UV e por citocinas inflamatórias (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). As

citocinas IL-1 e o TNF- α , por exemplo, após serem produzidas e de se ligar ao seu receptor, é capaz de desencadear uma série de sinais e ações que vão resultar na ativação da molécula p38 através de sua fosforilação. A p38, por sua vez, é capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana, que após ser estabilizado por MAPK se dimeriza com c-Fos, expressando o ativador protéico 1 (AP-1), fator de transcrição altamente ativo que leva ao aumento da expressão das MMPs e à diminuição de pró-colágeno I (SHAH; MAHAJAN, 2013; RITTIÉ; FISHER, 2002).

A radiação UV também conduz a um aumento nos níveis de diferentes receptores de fatores de crescimento, tais como: epidérmico, de fibroblastos e derivado de plaquetas. Esses fatores, via ativação da p38 e aumento da expressão do AP-1, corroboram com a produção das MMPs. Por outro lado, o aumento da expressão do AP-1 ocasionado pela radiação UV, regula de forma negativa o fator de crescimento transformante β (TGF- β), interrompendo sua principal função que é a síntese de colágeno (SHAH; MAHAJAN, 2013).

As MMPs são enzimas de uma família de metaloenzimas de zinco, que clivam componentes protéicos da matriz extracelular, moléculas de superfície e outras proteínas pericelulares que não pertencem a matriz (EGEBLAD; WERB, 2002). Essas enzimas desempenham um papel chave no mecanismo patofisiológico do fotoenvelhecimento. O aumento da síntese das MMPs pela radiação solar ocorre em queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme. Pelo menos três MMPs são ativadas pela radiação UV: MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial) que pode degradar fibras de colágeno tipo I e III; MMP-3 (estromelisin 1), hidrolisa colágeno tipo IV da membrana basal e colágeno parcialmente degradado; e MMP-9 (gelatinase B), que pode digerir fragmentos de colágeno gerados pela MMP-1. Juntas, as MMPs possuem a capacidade de degradar muitas das proteínas da matriz extracelular, resultando no acúmulo de fibras de colágeno fragmentadas, prejudicando, assim, a integridade estrutural da matriz extracelular, conduzindo, logo, ao fotoenvelhecimento (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; KROLIKIEWICZ-RENIMEL et al., 2013; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011; FENG et al., 2014).

1.2. Extratos vegetais como agentes fotoquimioprotetores

Pela complexidade e severidade dos danos induzidos pela radiação solar UV sobre a pele, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda limitar o tempo de exposição ao sol, fazer uso de roupas e acessórios, como chapéu e óculos de sol e, principalmente, utilizar protetores solares com capacidade de proteção tanto para radiação UVB quanto para UVA.

A fotoproteção consiste no uso de protetores solares (HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011) constituídos por uma mistura de filtros UV orgânicos e/ou inorgânicos que refletem, dispersam ou absorvem a radiação UV em função da sua natureza química (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

No entanto, apesar do crescente consumo de protetores solares, a incidência de câncer de pele só vem aumentando. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2014 e 2015 é de 182 mil novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma, e de aproximadamente 6 mil para o tipo melanoma, sendo que este apresenta uma letalidade elevada (BRASIL, 2014). O pronunciado aumento pode ser resultado de uma série de fatores, tais como: uso incorreto do protetor solar, aumento do tempo de exposição ao sol e da incidência de radiação UVB sobre a Terra, aliado ao pouco conhecimento que se tem atualmente de substâncias capazes de absorver a radiação UVA, o que poderia aumentar a eficácia dos fotoprotetores. Ainda, alguns estudos apontam para um efeito nocivo à pele, provocado pelos constituintes dos protetores solares, como aumento dos níveis de EROs, por exemplo, após penetração de filtros solares químicos (3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila) e subsequente radiação UV (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007; HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Também já foi demonstrado em trabalhos na literatura, que os filtros solares sofrem processos de degradação induzidos pela radiação UV, o que leva a uma redução na capacidade de proteção da pele e a geração de espécies potencialmente tóxicas (SCALIA; MEZZENA, 2010).

Desta forma, uma segunda estratégia nas terapias de fotoproteção, é a fotoquimioproteção que consiste no uso de formulações tópicas adicionadas de substâncias/compostos naturais com propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias na prevenção ou reversão de danos causados à pele pela radiação UV. Pois, uma vez incorporadas em formulações, essas substâncias poderiam agir de forma isolada, sendo aplicadas antes dos protetores solares e da exposição ao sol, ou então poderiam ser utilizadas em associação com outros ativos, como os filtros solares, potencializando o efeito fotoprotetor.

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, das quais os compostos fenólicos (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas) são a principal classe, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e lipoxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante desses compostos deve-se às suas propriedades redutoras e estrutura química, pois desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de

transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo visto que a estrutura química permite a doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila da sua estrutura aromática e, ainda, estabiliza elétrons desemparelhados, devido à ressonância do anel aromático (SOUSA et al., 2007). Pesquisas já realizadas demonstram que extratos vegetais ricos em polifenóis com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênica, anticarcinogênese e imunomodulatória têm a capacidade de exercer efeitos inibitórios marcantes em diversos eventos celulares e moleculares induzidos pela radiação solar UV (CASAGRANDE et al., 2006; AFAQ, 2011; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SERAFINI et al., 2014).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides destacam-se por apresentarem diversas atividades biológicas, as quais estão relacionadas principalmente com suas propriedades antioxidantes. Quimicamente são definidos como substâncias compostas por 15 átomos de carbono arranjados em dois anéis fenil (A e B) ligados por um anel pirano (C), formando o núcleo flavano (Figura 4). O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C definem as classes de flavonóides e, dentro destas, o padrão de substituição nos anéis A e B determinam os compostos específicos. As características estruturais dos flavonóides estão intimamente ligadas ao seu potencial antioxidante. Uma maior atividade sequestradora do radical superóxido, por exemplo, é associada à presença de um grupo hidroxila no carbono 3 e três grupos hidroxilas no anel B de sua molécula (COOK; SAMMAN, 1996; PIETTA, 2000; COS et al., 1998).

Figura 4: Estrutura química básica dos flavonóides (núcleo flavano).

Diante disso, a aplicação de formulações tópicas, adicionadas de produtos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, vem sendo cada vez mais reconhecida por sua capacidade de proteger a pele contra os danos da radiação UV, tais como o

fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (YIN et al., 2013; CAMPANINI et al., 2013; HWANG et., 2014).

1.2.1. *Inga edulis* (Ingá)

A diversidade biológica existente na Floresta Amazônica é uma grande fonte de espécies vegetais potencialmente úteis para o desenvolvimento de medicamentos, alimentos funcionais e cosméticos. Diversas espécies ricas em compostos fenólicos com diferentes atividades biológicas são utilizadas popularmente para o tratamento de diferentes doenças. Dentre essas plantas destaca-se o ingazeiro, *Inga edulis* Martius (POMPEU et al., 2012; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

Inga edulis Martius é uma árvore frutífera, da família das Leguminosae: Mimosoideae, amplamente distribuída em florestas secundárias tropicais das Américas Central e do Sul. Popularmente, além de ser reconhecida pelos seus frutos comestíveis, esta árvore, através de suas folhas, é utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório e anti-diarréico (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; POMPEU et al., 2012). Silva, Rogez e Larondelle (2007) relataram que esta propriedade anti-inflamatória pode estar relacionada ao fato de as folhas serem ricas em compostos fenólicos, especialmente flavan-3-óis ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e flavonóis (miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo). Posteriormente, Dias, Souza e Rogez (2010), fracionando o extrato bruto concentrado proveniente da maceração das folhas de *Inga edulis* em acetona, água e ácido acético, por partição líquido-líquido com hexano e por coluna C₁₈, obtiveram uma fração aquosa com compostos de média polaridade. E esta fração aquosa, ao ser analisada, demonstrou altos teores de polifenóis totais (571,4 mg EAG/g de fração seca) sendo grande parte representada pelos flavonóis (107,9 mg EMR/g de fração seca), flavanóis (168,5 mg ECA/g de fração seca) e proantocianidinas (142,1 mg ECI/g de fração seca). Dentre esses compostos, os identificados foram miricetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo, procianidina B2, catequina, procianidina B1 e epicatequina, em ordem decrescente.

Recentemente, Silva (2012), trabalhando com a fração de média polaridade obtida da purificação do extrato hidroetanólico das folhas de *Inga edulis* em resinas macroporosas, quantificou polifenóis e flavonóides totais que foram de 412 mg EAG/g (grama em relação ao peso seco da fração) e 46 mg EQ/g, respectivamente. E em associação com a empresa Lychnoflora, identificou por LC-DAD-MS os compostos majoritários desta fração, de acordo com os dados de porcentagem das áreas dos picos, que foram a miricetina-3-*O*- α -

ramnopiranosídeo e a vicenina-2 identificada pela primeira vez. O teor de vicenina-2 encontrado por Silva (2012) foi de 10µg/mg de fração purificada. As atividades antioxidantes desta fração determinadas pela medida de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) e inibição da peroxidação lipídica apresentaram um valor de IC₅₀ de 4,88 ± 0,033 e 2,54 ± 0,391 µg da fração por mL de meio reacional, respectivamente (SILVA, 2012).

A Miricetina-3-*O*-α-ramnopiranosídeo, conhecida como miricitrina, é um flavonóide glicosilado pertencente ao subgrupo flavonol, encontrado naturalmente em várias plantas com propriedades medicinais. Sua estrutura química (Figura 5) é formada por dois grupos fenil (A e B) unidos por uma cadeia propiônica (C), na qual está ligada um açúcar, no caso a ramnose. O considerável potencial antioxidante demonstrado por este flavonóide provavelmente está relacionado a esta estrutura poli-hidroxi. Além desta capacidade antioxidante, já foi relatado que a miricitrina possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (MEOTTI et al., 2007; WU et al., 2008; SHIMOSAKI et al., 2011; SCHWANKE et al., 2013; SUN et al., 2013; CHEN et al., 2013; QIN et al., 2015).

Figura 5: Estrutura química da Miricitrina.

O segundo composto majoritário desta fração purificada, a vicenina-2 (6,8-di-*C*-β-*D*-glicosilapigenina) também é um flavonóide glicosilado (Figura 6) que apresenta algumas propriedades já relatadas, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-glicação (GOBBO-NETO et al., 2005; MARRASSINI et al., 2011; ISLAM et al., 2014).

Figura 6: Estrutura química da Vicenina-2.

Nesse contexto, a proposta do trabalho consistiu em avaliar o potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada do extrato das folhas de *Inga edulis*, devido ao seu alto teor de polifenóis, potencial antioxidante e efeito anti-inflamatório observados em estudos anteriores (SOUZA et al., 2008; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial fotoprotetor *in vitro* e o potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração purificada de *Inga edulis* incorporada em formulação tópica.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar o potencial da fração purificada em inibir a quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina-oxidase/luminol (xantina/XOD/luminol).
- Determinar o coeficiente de partição dos compostos da fração purificada com atividade inibidora da quimioluminescência.
- Determinar *in vitro* a intensidade da fluorescência gerada pela diclorofluoresceína na presença ou ausência da fração purificada em cultura de célula.
- Preparar formulação de uso tópico, emulsão estabilizada por polímero hidrofílico, adicionada da fração purificada.
- Avaliar a penetração *in vivo* dos compostos antioxidantes da fração purificada incorporada à formulação.
- Investigar o potencial fotoprotetor *in vitro* da fração purificada de *Inga edulis* e da formulação adicionada da fração.
- Determinar o potencial fotoquimioprotetor *in vivo* dos compostos da fração purificada incorporados à formulação.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção da fração purificada de *Inga edulis*

A fração enriquecida com compostos de média polaridade de *Inga edulis* foi gentilmente fornecida pela empresa Amazon Dreams S.A., localizada em Belém – PA, incubada na Universidade Federal do Pará (UFPA).

Folhas de plantas adultas de *Inga edulis* foram colhidas em Igarapé-Açu (Pará, Brasil) e identificadas de acordo com sua exsicata por um profissional qualificado do Museu Emílio Golgi, fiel depositar para estes vegetais.

O processo de obtenção dessa fração, foi patenteado em co-titularidade pela UFPA e Amazon Dreams sob o nome “Processo de extração e purificação de compostos fenólicos de *Inga edulis* e *Byrsonima crassifolia* através de adsorção e eluição sobre resinas” (PI-0001 de 03/01/2008).

Após serem transportadas até a empresa, as folhas foram selecionadas (eliminando aquelas que apresentavam qualquer forma de praga), lavadas duas vezes com água corrente para remoção de poeira e material estranho e secas em estufa industrial com circulação de ar forçada a 60°C por 8 horas. Foram depois moídas em moinho industrial para alcançar partículas com granulometria de 0,3 a 1,0 mm. A matéria-prima foi então guardada no abrigo da luz e à temperatura de 4°C por uma noite (SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

No dia seguinte, as folhas em pó foram submetidas a um processo de extração hidroalcóolica utilizando bioetanol a 70°GL na proporção 1:3 (m/m). Em seguida, ocorreu uma etapa de filtração, em que foi separada a borra e minimizados alguns compostos indesejáveis como açúcar, gordura, terpenos e pigmentos. O filtrado foi encaminhado para um concentrador a vácuo, originando o extrato bruto, após recuperação da totalidade do álcool.

Este extrato bruto foi então submetido a um processo de purificação parcial, empregando resinas macroporosas sintéticas do tipo SDVB (Estireno Di Vinil Benzeno) (SILVA et al., 2007), adsorvendo o extrato aquoso em condições específicas de vazão e temperatura, desorvendo o extrato com bioetanol e concentrando novamente o dessorbato sob vácuo em concentrador industrial.

Posteriormente, seguiu-se para um enriquecimento parcial do extrato re-adsorvendo parte do extrato purificado sobre outra resina macroporosa (do tipo acrílica) até atingir sua saturação, e utilizando um gradiente de polaridade decrescente na sua dessorção (com quantidades crescentes de bioetanol), com soluções hidroalcólicas de 0, 32, 64 e 96° GL. A fração de interesse para este estudo compreende os dessorbados obtidos após eluições nas

concentrações de 32 a 64^oGL, na qual estariam presentes os compostos fenólicos de polaridade intermediária. O solvente da fração foi evaporado no concentrador industrial.

A fração purificada de média polaridade foi congelada a -40°C por uma noite, liofilizada por 48 horas em liofilizador semi-industrial até secar quase completa e acondicionada em recipientes opacos de 10, 20 e 30 g. A liofilização foi feita para minimizar a degradação dos compostos fenólicos até seu uso nas dependências da FCFRP.

3.2. Quantificação dos compostos majoritários presentes na fração purificada de *Inga edulis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análise cromatográfica, utilizou-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu, modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS (SPD-10A), integrador (C-R6A) e injetor Rheodyne[®] (7725i) com loop de 20µL.

A separação cromatográfica dos compostos majoritários da fração purificada foi realizada em uma coluna Hypersil Gold[®] C18 (Thermo SCIENTIFIC), de dimensões 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 3,0 µm, acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária, mas de dimensões 10 x 4 mm. Para a eluição dos compostos, utilizou-se um gradiente por estepe (Tabela 1) em que as fases móveis constituiu-se de água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com vazão de 0,8 mL/minuto. A detecção dos picos foi realizada no comprimento de onda de 280 nm e os picos cromatográficos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões autênticos: vicenina-2 (HWI Analytik GMBH[®] pharma solutions) e miricitrina (Sigma Aldrich[®]). Os padrões e as amostras foram preparados em etanol 50%.

Tabela 1: Gradiente por estepe utilizado na eluição dos compostos majoritários da fração purificada de *Inga edulis* por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo	% Fase móvel B
0	5
6	5
12	9
17	10
21	11
26	12
30	13
43	15
83	28
90	5
91	Stop

3.3. Caracterização funcional da atividade antioxidante e físico-química da fração purificada de *Inga edulis*

3.3.1. Avaliação da atividade antioxidante da fração purificada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina-oxidase/luminol (xantina/XOD/luminol)

3.3.1.1. Preparo das amostras

A fração purificada foi pesada e solubilizada em etanol 50% (v/v) a fim de obter uma solução-mãe na concentração de 1,0 mg/mL. Assim, volumes conhecidos da solução-mãe foram transferidos para balões volumétricos e o volume completado com tampão glicina (0,1M; pH 9,4), com o intuito de obter amostras da fração purificada nas concentrações de 10,0; 7,5; 5,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,5 µg/mL.

3.3.1.2. Procedimento do ensaio

Para a determinação da atividade antioxidante da fração purificada pelo sistema xantina/XOD/luminol, foram pipetados para cada tubo de ensaio 400 µL de uma solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1mM) em tampão glicina (0,1M) pH 9,4, 150 µL de xantina (6mM), 10 µL de amostra da fração purificada e 10 µL da solução de luminol (0,6 mM). A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de solução recém preparada de xantina-

oxidase (20 mU/mL) (mantida resfriada no gelo). A medida da quimioluminescência foi realizada em luminômetro Autolumat LB953 (EG&G Berthold) durante 5 minutos a 25°C (GIROTTI et al., 2000). A porcentagem de inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida da área sob a curva (ASC), através da seguinte fórmula: % inibição = $100 - [(ASC \text{ da amostra}) / ASC \text{ do controle positivo}] \times 100$, considerando como controle positivo o meio reacional isento da solução da fração purificada (GEORGETTI et al., 2003).

3.3.2. Determinação do coeficiente de partição octanol/água da fração purificada

O coeficiente de partição octanol/água é uma medida para determinação da lipofilicidade de um composto, e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, no caso, octanol (fase orgânica) e água (SILVA; FERREIRA, 2003). Para saturação dos solventes empregados, uma mistura de octanol/água na proporção de 1:1 (v/v) foi colocada em um funil de separação, agitada manualmente por 3 minutos e mantida em repouso por 2 horas, sendo as fases separadas após este tempo. Após a saturação dos solventes, 20 mg da fração purificada foram pesados e transferidos para 50 mL de fase aquosa saturada. A seguir, foram adicionados 50 mL da fase orgânica saturada à mistura que permaneceu 18 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após a agitação, a mistura foi transferida para um funil de separação, ficando em repouso para separação das fases, sendo posteriormente eluídas cada qual em um frasco. Para medida da inibição da quimioluminescência, a fase aquosa (FA) particionada foi diluída 200 vezes em tampão glicina (0,1M; pH 9,4) e alíquotas de 10 µL da amostra diluída foram ensaiadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.1.2. Para preparo da amostra controle (C1), 20 mg da fração purificada foram adicionados a 50 mL da fase aquosa saturada, observando-se completa solubilização da fração. Esta amostra foi diluída e ensaiada conforme descrito acima. As massas encontradas da fração purificada na fase aquosa saturada não particionada (C1) e na particionada (C2) foram utilizadas no cálculo do coeficiente de partição octanol/água, determinado pela seguinte equação: $Ko/a = (C1 - C2) / C2$.

3.3.3. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante da fração purificada por medida da intensidade da fluorescência gerada pela diclorofluoresceína em cultura de célula

3.3.3.1. Linhagem e cultivo celular

As células, fibroblastos de camundongos da linhagem L929, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL), e incubadas (Thermo Electron Corporation- HEPA Class 100) a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). As células foram sub-cultivadas a cada 2-3 dias, utilizando solução salina 0,9% para lavá-las e tripsina 0,25% para desagregá-las do frasco.

3.3.3.2. Preparo das amostras

Soluções da fração purificada 10 vezes mais concentradas que as concentrações desejáveis para realização do ensaio (concentração no meio reacional) foram preparadas a partir de uma solução-mãe (1mg/mL) da fração purificada solubilizada em tampão fosfato salina (PBS (pH 7,4)).

As concentrações da fração purificada utilizadas nos poços (2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) foram escolhidas por não serem citotóxicas, conforme os resultados de citotoxicidade realizado com esta fração, em cultura de células da linhagem L929, utilizando vermelho neutro como marcador da viabilidade celular apresentados por Silva (2012).

3.3.3.3. Procedimento do ensaio

Para realização do ensaio, as células de fibroblastos da linhagem L929 foram cultivadas em microplacas de 96 poços com uma confluência de $0,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Vinte e quatro horas depois, o meio de cultivo foi eliminado e 100 µL de uma solução de diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (5 µM) foi adicionada em cada poço. Após 30 minutos de incubação, a solução foi descartada e uma solução de PBS com glicose foi adicionada em cada poço. Posteriormente, as amostras da fração purificada (20 µL/poço) em diferentes concentrações foram adicionadas, com exceção dos poços controles, permanecendo 30 minutos na incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Decorrido este tempo, parte das microplacas foram submetidas a 20 J/cm² de radiação UVA,

enquanto nas outras microplacas foram adicionados 20 μL de uma solução de H_2O_2 (100 mM), excluindo os controles negativos, que permaneceram incubadas por 1 hora na estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Todas as microplacas, irradiadas e tratadas com peróxido de hidrogênio, foram lidas em fluorímetro (BioTek Synergy 2, USA), utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. (WANG; JOSEPH, 1999).

3.4. Preparo de emulsão estabilizada por polímero hidrofílico adicionada da fração purificada de *Inga edulis*

A formulação para uso tópico foi preparada a partir 6% de uma base auto-emulsionante (Hostacerin[®] SAF) composta por Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (doador de viscosidade), pelos emulsionantes Repeseed Oil Sorbitol Esters (origem vegetal com base em óleo de canola) e Trilaureth-4 Phosphate (triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, que possui grande afinidade pelos fosfolipídios da pele, proporcionando uma maior retenção de água) e pelos emolientes mineral oil e isopropyl palmitate (PHARMASPECIAL, 2015); 5% de propylene glycol; 0,05% dos conservantes chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolinone (Nipaguard[®] CG); 1% da fração purificada de *Inga edulis* e de água purificada (q.s.p.). A fração purificada foi previamente solubilizada em solução de propilenoglicol e água na proporção de 1:1 (p/p) e então incorporada à formulação (fase aquosa) durante seu preparo a frio (temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$), sob agitação a 300 rpm em agitador mecânico (Fisatom, modelo 713D) por aproximadamente 15 minutos. Foi preparado também a formulação placebo, que consiste nesta mesma fórmula isenta da adição de 1 % da fração purificada. As formulações foram acondicionadas em potes de plástico opacos brancos, com capacidade para 50g.

3.5. Avaliação da penetração/retenção cutânea *in vivo* dos compostos antioxidantes da fração purificada incorporada à formulação

3.5.1. Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos com camundongos sem pelos (*hairless*), machos ou fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 30g, da linhagem HRS/J laboratório Jackson (Bar Harbor). Os animais foram criados no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, mantidos a uma temperatura entre 20 e 25°C , com livre acesso a água e

comida, 4 trocas de ar/hora e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Certificado 13.1.525.53.1).

3.5.2. Procedimento do ensaio

Este experimento foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade da formulação em permitir a penetração na epiderme de compostos da fração purificada com capacidade antioxidante. Assim, o ensaio foi realizado com 3 grupos de 3 animais cada: grupo controle (não tratado), grupo placebo (tratados com a formulação isenta da fração purificada) e grupo formulação (tratados com a formulação adicionada da fração purificada). Aproximadamente 300 mg da formulação placebo e da formulação adicionada da fração purificada, foram aplicadas no dorso de cada animal, com exceção dos animais do grupo controle. Após 2 horas da aplicação, os animais foram sacrificados e a área da pele removida. Uma área de 1,77 cm² de pele foi submetida ao procedimento de *tape stripping* para retirada do estrato córneo. Em seguida, a pele remanescente (epiderme+derme) foi picotada e homogeneizada com 2,5 mL do solvente extrator metanol/água 80% (v/v), por ser eficiente na extração de compostos antioxidantes da fração purificada e por demonstrar baixa capacidade de extrair compostos antioxidantes inerentes da pele (conforme procedimentos realizados por Silva (2012)), sonicada por 30 minutos em banho de ultra-som (Thornton T50), agitada em vórtex (Phoenix AP56) por 1 minuto e centrifugada (Eppendorf AG/centrifuge 5810R) durante 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL e no precipitado remanescente foi novamente adicionado 2,5 mL de metanol 80%, repetindo-se o processo de extração descrito acima. O sobrenadante obtido foi transferido e adicionado ao sobrenadante da primeira extração no balão volumétrico de 5 mL (o volume do balão foi completado com metanol 80%). Para verificar a quantidade de compostos antioxidantes que penetraram na pele, as amostras obtidas foram secas em fluxo de ar, ressuspensas com etanol 50% e submetidas aos ensaios de quimioluminescência pelo sistema xantina/XOD/luminol, como descrito no item 3.3.1.2., e CLAE, conforme parâmetros apresentados no item 3.2.

3.6. Avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro* da fração purificada de *Inga edulis* e da formulação adicionada da fração

3.6.1. Amostras

As amostras analisadas foram 2 protetores solares comerciais da mesma marca, um com fator de proteção solar (FPS) 15 e outro com FPS 30; soluções da fração purificada nas concentrações de 25 e 50 mg/mL (propilenoglicol e água 1:1(v/v)); formulação placebo (isenta da fração purificada) e formulação contendo 1% da fração purificada de *Inga edulis*. Cada amostra foi aplicada em triplicata.

3.6.2. Cultivo celular e irradiação UVA

As células, fibroblastos da linhagem L929, foram cultivadas conforme item 3.3.3.1., semeadas em placas de 6 poços com uma densidade inicial de 8×10^5 células/poço e incubadas a 37°C com 5% de CO₂, por 24h. Decorrido este tempo, o meio de cultivo foi descartado, as placas foram lavadas com solução de salina 0,9% e uma solução de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) 5 µM (2mL/poço) foi adicionada. As placas foram novamente incubadas por 30 minutos, nas mesmas condições descritas acima. Após 30 minutos, a solução de DCFH-DA foi substituída por tampão Hank's (2 mL/poço) e as placas de 6 poços foram cobertas por uma placa de quartzo onde as amostras foram aplicadas a uma concentração de 2 mg/cm², segundo preconizado pela Associação Comercial Européia de Cosméticos (COLIPA). Em seguida, o conjunto (placa de 6 poços/placa de quartzo) foi levado para o simulador solar (Vilmer Lourmat, Mame-La-Vallée, França) onde foi exposto a uma dose de 10 J/cm² de radiação UVA (Figura 7). Ao término da radiação, as placas de 6 poços foram lidas em fluorímetro (BioTek Synergy 2, USA) em excitação de 485 nm e emissão de 528 nm (CAYROL et al., 1999; CHRÉTIEN; HEAFEY; SCAIANO, 2010; FIGUEIREDO et al., 2014). O efeito fotoprotetor foi avaliado pela quantidade de EROs formadas. A leitura obtida para o grupo de células expostas à radiação sem qualquer tipo de proteção (controle irradiado), corresponde a 100% destas EROs.

Figura 7. Delineamento experimental usado no estudo de fotoproteção. Células de fibroblastos da linhagem L929 foram semeadas em placas de 6 poços com uma densidade inicial 8×10^5 células/poço. A placa de quartzo com as mesmas dimensões foi colocada sobre a placa de 6 poços, cobrindo as amostras. O conjunto de placas foi exposto à radiação. Retirada de Figueiredo et al. (2014).

3.6.3. Cultivo celular e irradiação UVB

Células, fibroblasto da linhagem L929, foram cultivadas e semeadas conforme item 3.6.2.

Após 24 horas das células semeadas, o meio de cultivo foi substituído por tampão Hank's (2 mL/poço) e as placas de 6 poços foram cobertas por uma placa de quartzo onde as amostras foram aplicadas a uma concentração de 2 mg/cm^2 , conforme preconizado pela COLIPA. Em seguida, o conjunto (placa de 6 poços/placa de quartzo) foi levado para o simulador solar em que foi exposto a uma dose de $0,180 \text{ J/cm}^2$ de radiação UVB (Figura 7). Ao término da radiação, o tampão Hank's contido nas placas de 6 poços foi removido e substituído por meio de cultivo DMEM suplementado com soro bovino fetal a 2%. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 , por 48 horas (CAYROL et al., 1999; CHRÉTIEN; HEAFEY; SCAIANO, 2010; FIGUEIREDO et al., 2014).

Transcorrido as 48 horas, o meio de cultivo DMEM foi descartado, as placas foram lavadas com solução salina (0,9%) e uma solução de resazurina (0,0001%) em meio de cultivo DMEM suplementado foi adicionada (2 mL/poço). Novamente as placas foram incubadas por 4 horas nas mesmas condições descritas acima. Após as 4 horas, as placas foram lidas em fluorímetro em excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. (FIGUEIREDO et al., 2014). O efeito fotoprotetor foi avaliado pela viabilidade celular. A leitura obtida para o

grupo de células não expostas à radiação (controle não irradiado) corresponde a 100% desta viabilidade.

3.7. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração purificada incorporada à formulação

Para realização dos experimentos *in vivo* (Certificado Comitê de Ética: 13.1.525.53.1) os animais (item 3.5.1.) foram divididos em seis grupos de cinco: controle não irradiado (CNI) - animais não tratados e que não receberam radiação; controle irradiado (CI) - animais não tratados e irradiados; não irradiado placebo (NIP) - animais tratados com formulação placebo e não irradiados; irradiado placebo (IP) – animais tratados com formulação placebo e irradiados; não irradiado formulação (NIF) – animais tratados com formulação adicionada de 1% da fração purificada e não irradiados; irradiados formulação (IF) – animais tratados com formulação adicionada de 1% da fração purificada e irradiados. O tratamento consistiu na aplicação tópica de 300 mg do placebo ou formulação adicionada da fração no dorso de cada animal, 2 horas antes do início da irradiação.

Os animais foram irradiados dentro de um compartimento de madeira desenvolvido com condições padronizadas para esse tipo de experimento (indução de estresse oxidativo), no qual foi instalada uma lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL40W/12 (Medical, Holanda). Das seis repartições existentes no compartimento, foram utilizadas apenas as quatro repartições centrais para serem colocadas as caixas plásticas com diferentes grupos de animais, a fim de evitar variações de radiação (Figura 8). Os animais podiam se movimentar livremente na caixa, sendo a região dorsal de cada um diretamente exposta à radiação UVB, mas para evitar a saída dos animais, as caixas foram cobertas por uma tela metálica. Nessas condições, os animais permaneceram expostos a uma dose de radiação de $2,87 \text{ J/cm}^2$, aproximadamente 45 minutos. Após três ou seis horas do término da irradiação, os animais de todos os grupos foram sacrificados por inalação de CO_2 . O tecido cutâneo do dorso dos animais foram limpos com solução de NaCl 0,9% (p/v), coletados, lavados com a mesma solução e então armazenados a -80°C (CASAGRANDE, 2005; MARQUELE-OLIVEIRA, 2007; ROSA, 2002; CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2008).

Figura 8: Esquema da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB. (1) Tampa superior; (2) lâmpada UVB; (3) tampa frontal; (4) repartições para colocar as caixas plásticas com os animais; (5) orifício de ventilação; (6) acionamento da lâmpada. Retirada de Forte (2012).

3.7.1. Eficácia *in vivo* da formulação contendo a fração purificada na proteção do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)

Para quantificação da GSH, as amostras de pele retiradas dos animais sacrificados, após 6 horas do término da radiação, foram descongeladas, picotadas em tampão RIPA (Tris 50 mM/L; EDTA 1,3 mM/L; deoxicolato de sódio 20 mM/L; cloreto de sódio (NaCl) 150 mM/L; dodecil sulfato de sódio (SDS) 3,5 mM/L; Triton-X 16 mM/L; pH 7,5), homogeneizadas em Turrax[®], sonificadas (2 ciclos de 10 segundos) e centrifugadas.

Realizou-se a quantificação protéica das amostras pelo método de Bradford (ZAIA D.; ZAIA C.; LICHTIG, 1998) e, em seguida, a quantificação da GSH. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 2 mL de tampão de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) (0,1M; pH 8,0) contendo ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA) (5μM); volume do sobrenadante da amostra correspondente a 100 μg de proteína e 100 μL de o-ftalaldeído (OPT) (1mg/mL em metanol). Após agitação em vórtex e transcorrido 15 minutos (sob proteção da luz), a fluorescência das amostras foi determinada em 350 nm e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, utilizando fluorímetro (F-4500 Fluorescence Spectrophotometer Hitachi Ltda, Tokyo, Japão) (HISSIN; HILF, 1976). Para determinação dos níveis de GSH nas amostras, foi utilizada a equação de regressão linear da curva de calibração de μM de GSH padrão (Sigma-Aldrich[®]) *versus* unidade de fluorescência.

3.7.2. Avaliação da eficácia da formulação contendo a fração purificada em diminuir a atividade da mieloperoxidase (MPO)

As amostras de pele retiradas dos animais, após 3 horas do término da radiação, foram descongeladas, picotadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de

HTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio) na concentração de 50 mg/mL, homogeneizadas em Turrax[®] e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para uma placa de 96 poços (60 µL/poço) e, em seguida, foi adicionado 200 µL de uma solução reveladora de o-dianisidina, preparada com tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) sem HTAB, e com H₂O₂. A leitura foi realizada após 15 minutos em 450 nm, utilizando espectrofotômetro de placas (Bio-Rad, iMarkTM, USA). Para cálculo da atividade da MPO, levou-se em consideração a definição de que uma unidade de atividade de MPO é aquela capaz de degradar um µmol de H₂O₂ por minuto e que corresponde a uma variação de 0,0113 unidades de absorbância (BRADLEY et al., 1982; CASAGRANDE et al., 2006).

3.7.2.1. Avaliação *in vitro* da presença de MPO na amostra de pele exposta à radiação UVB

Para avaliar a presença da MPO nas amostras de pele dos animais expostos à radiação UVB (2,87 J/cm²) na ausência de formulação (CI), utilizou-se a solução de um inibidor específico para esta enzima, o ácido 4-aminobenzóico hidrazida (50 µM). Assim, o ensaio seguiu-se com a análise destas amostras de pele em presença ou ausência do inibidor, conforme o procedimento reacional descrito no item 3.7.2.

3.7.2.2. Avaliação *in vitro* da capacidade de inibição da MPO pelos compostos da fração purificada

Para realização do ensaio, foi preparada uma solução da fração purificada na concentração de 70 µg/mL e uma solução do ácido 4-aminobenzóico hidrazida na concentração de 12 µg/mL, ambas em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0). Em seguida, adicionou-se em tubos de ensaio 50 µL de cada amostra e 25 µL da enzima MPO (Sigma-Aldrich[®]) diluída (1:5) no mesmo tampão utilizado no preparo das soluções. As amostras permaneceram incubadas em banho-maria (Fanem modelo 100) por 15 minutos a 37°C. O controle do ensaio foi composto de 50 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) e 25 µL da enzima diluída, correspondente a 100% de atividade de MPO. Após o tempo de incubação, as amostras foram reveladas e os resultados apresentados conforme descrito no item 3.7.2.

3.7.3. Avaliação da eficácia da formulação adicionada da fração purificada em inibir a atividade/secreção das metaloproteinases (MMPs)

Para avaliar a ação da radiação UVB no aumento de metaloproteinases na pele dos camundongos sem pelos, foi empregado o método de zimografia em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina, o qual é extremamente sensível para detecção de MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatina-B) que nos permite verificar alterações na atividade destas enzimas na pele (BEURDEN; HOFF, 2005). A imagem do gel foi analisada com o *software* ImageJ[®] com o objetivo de quantificar as bandas translúcidas através da contagem de pixels.

As amostras de pele (retirada dos animais após 6 horas do término da radiação) descongeladas, foram picotadas e homogeneizadas em tampão Tris/HCl (50 mM) com cloreto de cálcio (10 mM) pH 7,4 adicionado de 1% da mistura inibidora de proteinases (Sigma-Aldrich[®]) com o auxílio do agitador Turrax[®] a 21500 rpm por 2 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Aliquotas de 50 µL do sobrenadante de cada amostra foram adicionadas a 10 µL de tampão não redutor (Tris/HCl 0,1M, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,001%; pH 6,8). Após homogeneização da mistura, 10 µL de cada amostra foram aplicados em uma placa de gel de acrilamida contendo SDS e gelatina e submetidos à eletroforese, conforme o método descrito por Vicentini e colaboradores (2008). Ao término da eletroforese, o gel foi lavado, corado com Comassie Blue R350 e a atividade proteolítica foi então observada após a descoloração do gel pela formação de bandas translúcidas relativas à degradação da gelatina pelas metaloproteinases.

3.7.4. Quantificação das citocinas IL-1 β e TNF- α e quimiocina KC/CXCL1

A quantificação das citocinas de IL-1 β e TNF- α e quimiocina KC foram determinadas por ensaio imuno-enzimático (ELISA), utilizando as amostras de pele retirada dos animais após 3 horas do término da radiação e armazenadas no -80°C. As amostras foram processadas e homogeneizadas no equipamento Polytron[®] PT 3100, com tampão PBS contendo 0,2% de Tween 20 e inibidores de proteases, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante obtido da centrifugação foi coletado e os níveis teciduais de IL-1 β , TNF- α e KC/CXCL1 foram quantificados por ensaio colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (R&D System; Quantikine[®] Elisa (Mouse IL-1 β ; TNF- α ; CXCL1/KC Immunoassay)).

3.8. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPad Prism[®] (versão 5.01, 2007). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (EPM), comparando os diferentes grupos, de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Quantificação dos compostos majoritários presentes na fração purificada de *Inga edulis* por CLAE

A fração purificada já foi caracterizada quimicamente por Silva (2012) em associação com a empresa Lychnoflora, por análises cromatográficas de LC-DAD-MS, confirmando a composição da fração purificada apresentada por Dias, Souza e Rogez (2010) e identificando pela primeira vez, a vicenina-2 na fração purificada de *Inga edulis*.

Neste estudo, a partir do perfil cromatográfico da fração purificada de *Inga edulis* obtido por CLAE (Figura 9), os teores de vicenina-2 e miricitrina calculados, levando em consideração as curvas de calibração obtidas através do uso dos padrões, foram de 14 e 146 $\mu\text{g}/\text{mg}$ da fração purificada, respectivamente, enquanto que o teor de vicenina-2 encontrado por Silva (2012) foi de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ da fração, nas mesmas condições cromatográficas. Silva (2012) não determinou a quantidade de miricitrina na fração. Assim, os resultados demonstraram que a fração purificada contém cerca de dez vezes mais miricitrina do que vicenina-2.

Figura 9: Perfil Cromatográfico da fração purificada de *Inga edulis* obtido por CLAE. Compostos majoritários identificados, miricitrina (MRT) e vicenina-2 (VCN).

4.2. Caracterização funcional da atividade antioxidante e físico-química da fração purificada de *Inga edulis*

4.2.1. Avaliação da atividade antioxidante da fração purificada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol e determinação do coeficiente de partição octanol/água da fração purificada

A atividade antioxidante da fração purificada foi avaliada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol, por apresentar sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade e, também, por ser empregada para avaliação do potencial antioxidante de compostos solúveis em água, visto que o meio reacional é aquoso, tampão glicina pH 9,4. Ainda, o pH 9,4 do meio reacional é favorável a desprotonação das hidroxilas e a hidrossolubilidade dos polifenóis (GIROTTI et al., 2000). O princípio deste ensaio está baseado na luminescência gerada pelo luminol oxidado. A reação xantina/xantina oxidase produz o radical superóxido, e o luminol na presença deste radical sofre oxidação gerando intermediários eletronicamente excitados que quando retorna ao seu estado basal emite fótons que são quantificados como quimioluminescência. Logo, a diminuição da luminescência pode ser reduzida pela ação de compostos sequestradores de radicais superóxidos e/ou do radical luminol (FERREIRA; ROSSI, 2002).

Soluções da fração purificada de *Inga edulis* em diferentes concentrações adicionadas ao meio reacional inibiram a quimioluminescência de forma concentração dependente (Figura 10). A amostra na concentração de 0,071 µg da fração purificada por mL do meio reacional inibiu em 50% a quimioluminescência gerada pela oxidação do luminol (IC₅₀ 0,071 µg/mL). Esse valor foi cerca de 160 vezes menor que o valor de IC₅₀ obtido para quercetina (11,3 µg/mL), nas mesmas condições de ensaio. Em adição, a atividade inibidora da quimioluminescência da fração de *Inga edulis* foi menor que aquelas quantificadas para o extrato de calêndula (IC₅₀ 4,4 µg/mL), extrato fluído e seco de própolis verde (IC₅₀ 4,1 µg/mL e 5,4 µg/mL, respectivamente), extratos do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (IC₅₀ 4,5 µg/mL) e de *Protium heptaphyllum*, também determinadas nas mesmas condições deste ensaio (IC₅₀ 0,232 µg/mL) (FONSECA et al., 2010; FONSECA, 2007; FIGUEIREDO et al., 2014; FORTE, 2012).

A Figura 10(A) mostra que existe uma relação linear entre a concentração da fração purificada de *Inga edulis* e a porcentagem de inibição da quimioluminescência. Os dados

foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de regressão, a equação da reta e o coeficiente de correlação r estão apresentados na Figura 10 B.

Figura 10. (A) Curva da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol, em função das concentrações da fração purificada ($n=3$); (B) Curva de calibração entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência e a massa da fração purificada no meio reacional.

Empregando a curva de calibração apresentada na figura 10(B), calculou-se que uma massa de 0,020 µg da fração purificada deveria ser adicionada ao meio reacional para proporcionar a inibição de 33,6% da quimioluminescência do luminol oxidado. Com este dado foi possível à determinação do coeficiente de partição octanol/água dos compostos da fração purificada inibidores da quimioluminescência. Conforme descrito no item 3.3.2., 20 mg da fração foram particionadas na mistura binária, octanol:água (50:50). No final do experimento, foi considerado que toda a massa da fração purificada adicionada estaria na fase aquosa. Esta fase foi então diluída 200 vezes de modo que a massa de 0,02 µg da fração purificada era esperada de ser encontrada no meio reacional. Os dados da inibição da quimioluminescência da amostra controle (massa de 20 mg adicionada em 50 mL de fase aquosa saturada, não submetida à partição) e da amostra particionada, e as respectivas massas teóricas e a encontrada estão apresentadas na Tabela 2. Os dados da tabela 2 e o coeficiente de partição octanol/água de 0 ($n=3$) calculado conforme item 3.3.2., mostram que 100% da massa da fração purificada submetida à partição foi recuperada na fase aquosa, sugerindo que todos os compostos antioxidantes da fração purificada são hidrossolúveis.

Tabela 2: Dados obtidos da porcentagem de inibição da quimioluminescência e das massas encontradas da fração purificada na fase aquosa das amostras controle e particionada na mistura binária octanol/água.

Amostras	Massa adicionada na FA (mg)	Inibição da Quimioluminescência (%)		Massa no meio reacional (µg)		Massa na FA encontrada (mg)
		Teórica	Encontrada	Teórica	Encontrada	
Controle (C1)	20	33,6	31,2	0,02	0, 0182	18,2
Amostra (C2)	20	33,6	33,7	0,02	0, 0200	20,0

Cálculos realizados a partir da relação linear da % de inibição da quimioluminescência em função da massa da fração purificada no meio reacional (Figura 10B).

4.2.2. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante da fração purificada por medida da intensidade da fluorescência gerada pela diclorofluoresceína em cultura de células

O DCFH-DA é uma sonda não fluorescente, apolar e não iônica que facilmente se difunde através das membranas celulares, onde é enzimaticamente desacetilado por esterases intracelulares à 2',7' - diclorodihidrofluoresceína (DCFH), composto polar, não fluorescente e estável dentro da célula por algumas horas. Na presença intracelular de EROs, tais como, H₂O₂, hidroperóxidos lipídicos, peroxinitrito, a DCFH é oxidado à diclorofluoresceína (DCF) que é fluorescente (JIMÉNEZ, 2004). Esta oxidação da DCFH pode ser amplificada pela reação entre H₂O₂ com Fe²⁺, pois resulta na geração do radical hidroxila. A DCFH também pode ser oxidada via ânions superóxidos, pois em sistemas biológicos a superóxido dismutase (SOD) transforma ânions superóxidos em H₂O₂, os quais oxidam a DCFH (ZHU et. al., 1994).

Na figura 11(A), em que as células foram incubadas por 30 minutos com DCFH-DA, lavadas, pré-tratadas com soluções da fração purificada em concentrações crescentes, novamente incubadas nas mesmas condições e, em seguida, tratadas com H₂O₂, os resultados demonstraram um comportamento bifásico na curva dose-resposta (fração purificada em diferentes concentrações *versus* intensidade da fluorescência) obtida. Na primeira fase, a fração purificada diminuiu a oxidação do DCFH induzida pelo H₂O₂ de maneira dose dependente na faixa de 2 a 20 µg/mL. Já na segunda fase, observa-se um aumento da

oxidação do DCFH induzido pelo H_2O_2 na presença de soluções da fração purificada em concentrações acima de $20\ \mu\text{g/mL}$, embora ainda este aumento da intensidade de fluorescência do DCF seja menor que aquele proporcionado pelo grupo de células controle positivo (células não tratadas com soluções da fração purificada). A solução da fração purificada na concentração de $2\ \mu\text{g/mL}$ diminuiu em 60,5% a intensidade da fluorescência no meio intracelular, enquanto que na concentração de $20\ \mu\text{g/mL}$ a diminuição da intensidade foi de em 81,2%, em relação ao grupo controle positivo (Figura 11 B).

Figura 11: (A) Medida da intensidade da fluorescência gerada pela DCF em cultura de células de fibroblastos L929 tratadas ou não com soluções da fração purificada em diferentes concentrações, usando como agente oxidante o peróxido de hidrogênio. (B) Diminuição da intensidade da fluorescência (%) gerada pela DCF em cultura de células de fibroblastos L929 na presença de soluções da fração purificada em diferentes concentrações, em relação ao controle positivo. Os resultados representam a média de 6 determinações realizadas com a mesma amostra ($n=1$ com repetibilidade de $6 \pm \text{EPM}$, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

O efeito antioxidante da fração purificada também foi avaliado em cultura de células de fibroblastos L929, utilizando como agente oxidante a radiação UVA. Quando as células foram irradiadas (controle positivo) com uma dose de $20\ \text{J/cm}^2$, observou-se que houve um aumento da fluorescência do DCF em relação ao grupo controle negativo (células não irradiadas), indicando a oxidação do DCFH por EROs ou substâncias oxidantes geradas nas células pela radiação (Figura 12 A). No entanto, quando as células, após incubação com DCFH-DA por 30 minutos, foram tratadas com soluções da fração purificada em diferentes concentrações e irradiadas nas mesmas condições acima, observou-se uma diminuição da fluorescência gerada pelo DCF. Na concentração de $2\ \mu\text{g/mL}$, houve uma diminuição de 47,2% da intensidade da fluorescência quando comparadas ao grupo de células do controle

positivo. Esta diminuição é estatisticamente menor que a encontrada para as demais concentrações da fração purificada (5-100 µg/mL estatisticamente iguais ($p < 0,05$)), que diminuíram a fluorescência em torno de 78%, conforme apresentado na Figura 12 (B).

Figura 12. (A) Medida da intensidade da fluorescência gerada pela DCF em cultura de células de fibroblastos L929 tratadas ou não com soluções da fração purificada em diferentes concentrações, usando como agente oxidante a radiação UVA (20J/cm²). **(B)** Diminuição da intensidade da fluorescência (%) gerada pela DCF em cultura de células de fibroblastos L929 na presença de soluções da fração purificada em diferentes concentrações, em relação ao controle positivo. Os resultados representam a média de 6 determinações realizadas com a mesma amostra (n=1 com repetibilidade de 6) ± EPM, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.3. Avaliação da penetração/retenção cutânea *in vivo* dos compostos antioxidantes da fração purificada incorporada à formulação

Para que a formulação tópica adicionada da fração purificada de *Inga edulis* apresente um efeito fotoquimioprotetor é necessário que a mesma permita a penetração e a retenção dos compostos antioxidantes na pele. Assim, estes compostos devem ser liberados do veículo, penetrados através do estrato córneo e retidos na epiderme e derme (GETIE et al., 2002). Dessa forma, os estudos de penetração e retenção cutânea são importantes para a escolha da formulação capaz de permitir a maior biodisponibilidade de ativos na pele (WESTER; MALBACH, 1990).

A penetração cutânea *in vivo*, utilizando o organismo do animal como um todo, possibilita observar a influência de vários parâmetros na absorção do ativo, como o metabolismo cutâneo e a presença da circulação sanguínea (MOSER et al., 2001).

A formulação descrita no item 3.4., emulsão estabilizada por polímero hidrofílico, é uma base hidratante constituída pela associação de doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes, que conferem à emulsão um caráter aniônico. O componente éster fosfórico presente na formulação (triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado), por apresentar grande afinidade pelos fosfolipídios da pele, poderia facilitar a penetração de ativos. Por ser preparada a frio, esta formulação permitiu que a fração purificada de *Inga edulis* fosse incorporada na fase aquosa, proporcionando segurança na homogeneidade de seus compostos hidrofílicos.

A mesma formulação, quando estudada por Silva (2012), demonstrou estabilidade física no teste de centrifugação após ciclos de 24 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 dias, e estabilidade da atividade antioxidante, avaliada pelos ensaios de medida da absorbância do radical DPPH[•] e inibição da quimioluminescência pelo sistema xantina/XOD/luminol. Em seus estudos, Silva (2012) constatou que esta formulação, dentre outras avaliadas, foi a que permitiu a maior penetração de compostos antioxidantes da fração purificada na pele de orelha de porco, pelo método de Célula de Franz, sendo a vicenina-2 um destes compostos. Logo, estes resultados justificam a escolha desta formulação para realização de estudos *in vivo*.

A capacidade da formulação em proporcionar a penetração de compostos da fração purificada na epiderme/derme foi avaliada *in vivo* na pele do dorso de camundongos sem pelos. E a quantidade penetrada foi calculada pela medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol e por CLAE.

4.3.1. Quantificação da fração purificada penetrada na pele por medida da inibição da quimioluminescência

Para quantificação dos compostos penetrados, a pele do dorso dos animais não tratados (grupo controle), tratados com a formulação placebo (grupo placebo), e tratados com a formulação adicionada de 1% da fração purificada (grupo formulação), foram submetidas ao processo de extração (item 3.5.2.), e as amostras obtidas foram secas e ressuspensas em etanol 50%, a fim de determinar sua capacidade antioxidante por medida da área sob a curva da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol.

Os dados das Figuras 13 mostram que a pele do camundongo sem pelos é provida de um sistema antioxidante endógeno, pois as amostras de pele dos animais do grupo controle reduziram em 22,7%, a quimioluminescência total gerada no sistema, representada pelo

branco da reação em que a amostra da pele foi substituída por tampão. Devido ao fato da quimioluminescência gerada pelas amostras da pele tratadas com a formulação placebo não apresentarem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) daquelas encontradas no grupo controle, constatou-se que os componentes da formulação base (placebo) não foram capazes de interferir nas reações enzimáticas e químicas envolvidas neste ensaio. Nas amostras da pele dos animais que foram tratadas por 2 horas com a formulação adicionada da fração purificada, observou-se uma redução na quimioluminescência (área sob a curva) de 37,8% (Figura 13 B), em relação ao branco da reação, sendo esta 15% maior que a encontrada no grupo controle (22,7%). Isso comprova que a formulação permitiu a penetração de compostos antioxidantes da fração purificada na pele dos animais. Os compostos penetrados contribuíram para o aumento do potencial antioxidante endógeno da pele, pela capacidade de sequestrar o ânion superóxido formado na reação ou, então, de reduzir o luminol oxidado, diminuindo, assim, a quimioluminescência gerada pelo luminol.

A quantidade de fração purificada penetrada na epiderme/derme foi 0,006 μg em 10 μL da amostra obtida da extração de 1,77 cm^2 de pele, calculada pela substituição da variável dependente da curva de calibração apresentada na Figura 10(B) por 15%, correspondente à porcentagem de redução da quimioluminescência proporcionada pelos compostos antioxidantes da fração penetrados na pele, já desconsiderando a redução proporcionada pelos antioxidantes endógenos da pele, representada no grupo controle. A quantidade total penetrada na área de 1,77 cm^2 de pele (volume total de amostra) foi de 3,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele.

Figura 13: Redução da quimioluminescência (área sob a curva) (A) e redução da quimioluminescência (%) em relação ao Branco (100% de quimioluminescência) (B) gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol obtidas no estudo de penetração *in vivo* com a formulação adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis* após 2 horas da aplicação. Grupo Controle: animais não

tratados com formulação. Grupo Placebo: animais tratados com a formulação isenta da fração purificada. Grupo Formulação: animais tratados com a formulação adicionada de 1% da fração purificada. A porcentagem de redução da quimioluminescência de cada grupo foi calculada levando em consideração a quimioluminescência total gerada no sistema, representada pelo branco. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo $\pm$ EPM, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.3.2. Quantificação dos compostos majoritários penetrados na pele por CLAE

Para quantificação dos compostos majoritários da fração purificada penetrados na pele dos animais, as mesmas amostras mencionadas no item 4.3.1. foram analisadas por CLAE, nas mesmas condições estabelecidas para a separação cromatográfica dos compostos da fração purificada em solução (item 3.2.).

A figura 14 demonstra a separação dos compostos penetrados e extraídos da pele dos camundongos sem pelos, tratados com a formulação placebo (cromatograma A) e com a formulação adicionada da fração purificada (cromatograma B). Conforme o perfil cromatográfico B, os polifenóis vicenina-2 (tempo de retenção de 31,7 minutos) e miricitrina (tempo de retenção de 45,87 minutos) foram identificados dentre os compostos da fração purificada que penetraram na pele do dorso dos animais, após tratamento com a formulação contendo a fração. Estes compostos correspondem aos determinados como majoritários da fração purificada no experimento 4.1. As quantidades de vicenina-2 e miricitrina penetradas foram de 0,05 e 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele, respectivamente, calculadas com base nas curvas de calibração dos padrões destes polifenóis. A área do pico de miricitrina está dentro da parte linear da curva de calibração obtida com seu padrão.

Figura 14: Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, das amostras de pele dos animais sem pelos tratadas com a formulação placebo (**A**) e com a formulação adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis*, após 2 horas da aplicação e identificação dos compostos miricitrina (MRT) e vicenina-2 (VCN) penetrados (**B**).

4.4. Avaliação do potencial fotoprotetor *in vitro* da fração purificada de *Inga edulis* e da formulação adicionada da fração

O extrato metanol/água das folhas de *Inga edulis* é constituído de alguns flavonóides, da classe dos flavonóis, que estão envolvidos em várias funções fisiológicas em plantas superiores (SOUZA et. al., 2007; HARBONE; WILLIAMS, 2000). Algumas linhas de evidências sugerem um papel fotoprotetor destes compostos contra os danos induzidos pela exposição excessiva a radiações UV e visível (LIAKOURA; BORNEAN; KARABOURNIOTIS, 2003). Merzlyak et al. (2005) mostraram a capacidade de refletância da luz solar na faixa do UV de 300 a 400 nm dos flavonóis de plantas livres de antocianinas. Assim, a fração purificada de *Inga edulis* pode ter um efeito fotoprotetor devido ao seu conteúdo de flavonóis, e um efeito fotoquimioprotetor devido ao potencial antioxidante e sequestrador de radicais livres de seus compostos polifenólicos.

O potencial fotoprotetor da fração purificada em solução e incorporada à formulação foi avaliada *in vitro*, usando cultura de células em que fibroblastos da linhagem L929 foram expostas à radiação UVA (10 J/cm²) e UVB (0,180 J/cm²).

Os resultados foram expressos considerando que a máxima produção de EROs (100%) ocorreu no grupo de células expostas à radiação UVA sem qualquer tipo de proteção, grupo controle irradiado (CI) (Figura 15A). Assim, observou-se nas células protegidas pelos protetores solares comerciais com FPS 15 e FPS 30 aplicados na placa de quartzo durante a radiação, uma redução de 58 e 75%, respectivamente, de EROs formadas (Figura 15B), em relação ao CI, indicando que os produtos comerciais foram capazes de absorver ou refletir a radiação UVA. Já nas células protegidas pelas soluções da fração purificada nas concentrações de 25 e 50 mg/mL durante à radiação, este efeito fotoprotetor foi menor, de 26,5 e 33% respectivamente, em relação ao CI, os quais apresentaram-se estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem que os compostos que absorvem a radiação UVA devem estar presentes em baixa quantidade na fração purificada, pois quando 1% desta fração foi adicionada à formulação, o efeito fotoprotetor observado foi semelhante à formulação placebo. Logo, a formulação adicionada de 1% da fração purificada não foi capaz de absorver a radiação UVA.

Figura 15: Quantidade de EROs formada (A) e proteção contra a radiação UVA (B) em porcentagem, levando em consideração a produção máxima de EROs (100%) no grupo CI, observada para as células, fibroblastos da linhagem L929, expostas ou não a 10 J/cm² de radiação UVA. CNI (controle não irradiado) = células não expostas à radiação; CI (controle irradiado) = células não protegidas e expostas à radiação; FPS 15 e FPS 30 = células protegidas pelos protetores solares comerciais de FPS 15 e FPS 30 e expostas à radiação; 25 mg/mL e 50 mg/mL = células protegidas por soluções da fração purificada de *Inga edulis* nas concentrações de 25 e 50 mg/mL e expostas à radiação; Placebo = células protegidas com a formulação placebo e expostas à radiação; Formulação = células protegidas pela formulação adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis* e expostas à radiação. Os resultados representam a média de 3 determinações por grupo $\pm$ EPM, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Por outro lado, nos ensaios de fotoproteção realizados com a radiação UVB na dose de 0,180 J/cm², os resultados foram expressos em função da viabilidade celular após exposição à esta radiação, pois os raios UVB possuem mais energia por fóton em relação aos raios UVA, e, por isso, são capazes de reagirem diretamente com o DNA, ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (HALLIDAY et al., 2008; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006). Portanto, a radiação UVB é mais citotóxica e mutagênica que a UVA.

A radiação UVB induziu a perda de 47,6% da viabilidade das células expostas a esta radiação (CI) (Figura 16) em relação às células não expostas (controle não irradiado (CNI)). Por outro lado, quando as células foram expostas à radiação UVB, mas protegidas pelos protetores solares comerciais de FPS 15 e FPS 30 aplicados sob a placa de quartzo, não observou-se perda da viabilidade das células, sugerindo que os produtos comerciais foram capazes de prevenir a morte das células em uma exposição a esta radiação. As soluções da fração purificada nas concentrações de 25 e 50 mg/mL protegeram em 68,5% e 88,3% respectivamente, a viabilidade das células, em relação ao CNI. Estes dados indicam que a

viabilidade das células irradiadas sob proteção das soluções da fração purificada foi aumentada em 30 e 68% respectivamente, em relação ao CI. Este resultado sugere, como observado para a radiação UVA, que a fração purificada possui compostos capazes de absorver a radiação UVB, mas que estes estão presentes em pequena quantidade, uma vez que as concentrações da fração purificada são de 25 e 50 mg/mL, consideravelmente altas. Quando a fração purificada foi incorporada à formulação na concentração de 1%, e 20 mg desta formulação (200 µg da fração purificada) e da formulação placebo foram aplicadas à área de 9,6 cm² da placa de quartzo (diâmetro do poço), a viabilidade das células foram mantidas em 56 e 67% respectivamente, em relação ao CNI. Como não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o placebo e a formulação adicionada da fração, sugere-se que a fotoproteção observada foi devido aos componentes da formulação placebo e não aos compostos da fração purificada adicionada.

Assim, pelos resultados obtidos para as radiações UVA e UVB, pode-se concluir que os compostos da fração purificada incorporada à formulação na concentração de 1%, não foram capazes de absorverem 10 J/cm² de radiação UVA e 0,180 J/cm² de radiação UVB.

Figura 16: Viabilidade, em porcentagem, das células de fibroblastos da linhagem L929 expostas (CI) ou não (CNI) a 0,180 J/cm² de radiação UVB. CNI (controle não irradiado) = células não expostas à radiação; CI (controle irradiado) = células não protegidas e expostas à radiação; FPS 15 e FPS 30 = células protegidas pelos protetores solares comerciais de FPS 15 e FPS 30 e expostas à radiação; 25 mg/mL e 50 mg/mL = células protegidas por soluções da fração purificada de *Inga edulis* nas concentrações de 25 e 50 mg/mL e expostas à radiação; Placebo = células protegidas com a formulação placebo e expostas à radiação; Formulação = células protegidas pela formulação adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis* e expostas à radiação. Os resultados representam a média de 3 determinações por grupo $\pm$ EPM, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.5. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração purificada incorporada à formulação

A avaliação *in vivo* do potencial fotoquimioprotetor da fração purificada incorporada à formulação foi realizada em pele de camundongos sem pelos, tratada previamente duas horas antes da radiação UVB, com formulação placebo ou adicionada da fração purificada. As peles retiradas dos animais, após terem sido sacrificados, foram submetidas aos ensaios de medida da quantidade da glutathiona reduzida, de atividades enzimáticas da mieloperoxidase e das metaloproteinases 2 e 9, e de quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α e da quimiocina KC/CXCL1.

4.5.1. Eficácia *in vivo* da formulação contendo a fração purificada na proteção do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)

No presente estudo, os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que houve uma depleção nos níveis de GSH de aproximadamente 27% nos grupos de animais que foram irradiados com 2,87 J/cm² de radiação UVB e não tratados (CI), tratados com a formulação placebo (IP) e tratados com a formulação adicionada da fração purificada (IF). Entretanto, observou-se também uma depleção de aproximadamente 17% nos níveis de GSH nos grupos de animais tratados com a formulação placebo (NIP) e adicionada da fração purificada (NIF), mas que não foram irradiados. Como não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos NIP e NIF, estes resultados sugerem que os componentes da formulação podem ter interferido na reação entre o GSH e o reagente OPT. Em adição, como não se observou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle, placebo e formulação irradiados (CI, IP e IF), constatou-se que a formulação adicionada de 1% da fração purificada não foi capaz de impedir a depleção de GSH induzida pela radiação UVB.

Figura 17: Quantidade de GSH em $\mu\text{M}/100\mu\text{g}$ de proteína determinada em amostras de pele de camundongo sem pelo, não irradiadas ou sob $2,87\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UVB. CNI = controle não irradiado (animais não tratados com formulação e não irradiados), NIP = não irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e não irradiados), NIF = não irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e não irradiados), CI = controle irradiado (animais não tratados com formulação e irradiados), IP = irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e irradiados), IF = irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e irradiados). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), utilizando ANOVA de uma via, seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.5.2. Avaliação da eficácia da formulação contendo a fração purificada em diminuir a atividade da mieloperoxidase (MPO)

A radiação solar quando em contato com a pele, desencadeia uma cascata de eventos complexos, como a migração de neutrófilos para a área exposta, devido ao processo inflamatório instalado no local. Estes neutrófilos, quando recrutados, liberam mieloperoxidase no meio extracelular e, assim, a atividade desta enzima pode ser quantificada *in vitro* através do sobrenadante obtido de uma amostra de pele, tendo como substrato o H_2O_2 . Pois, a MPO catalisa a reação de óxido-redução com o H_2O_2 resultando na formação de uma molécula de água e uma do ânion superóxido, que, por sua vez, causa a oxidação da o-dianisidina à um produto de coloração marrom.

No presente estudo (Figura 18), a radiação UVB de $2,87\text{ J}/\text{cm}^2$ provocou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de 247 e 195% na atividade da MPO da pele dos animais dos grupos controle irradiado (CI) e irradiado placebo (IP) respectivamente, em relação ao grupo de animais não irradiados (CNI). No entanto, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre estas porcentagens de aumento da atividade da MPO encontrada

nos grupos CI e IP. Por outro lado, na amostra de pele de animais tratados com a formulação adicionada da fração purificada (IF) por duas horas, seguida de irradiação UVB, observou-se uma diminuição de 48% da atividade da MPO em relação ao grupo de animais não tratados e irradiados (CI). Quanto aos grupos não irradiados (CNI, NIP e NIF), não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre eles, evidenciando que os componentes da formulação placebo (isenta da fração purificada) não interferiram com o método de quantificação de atividade enzimática.

Figura 18: Quantificação da atividade da mieloperoxidase em Unidade de MPO/mg de pele de camundongos sem pelo expostas ou não a 2,87J/cm² de radiação UVB. CNI = controle não irradiado (animais não tratados com formulação e não irradiados), NIP = não irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e não irradiados), NIF = não irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e não irradiados), CI = controle irradiado (animais não tratados com formulação e irradiados), IP = irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e irradiados), IF = irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e irradiados). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), utilizando ANOVA de uma via, seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

A diminuição da atividade da MPO no grupo de animais tratados com a formulação adicionada da fração purificada e expostos à radiação UVB, pode ser explicada pela inibição da migração de neutrófilos para a área irradiada ou, então, pela inibição da atividade desta enzima pelos compostos da fração purificada que penetraram na pele.

Além da MPO, outras peroxidases podem estar presentes na pele, como a catalase e a glutathione peroxidase. Dessa forma, com intuito de certificar-se de que houve um aumento de MPO nas peles exposta a 2,87 J/cm² de radiação UVB, e não de outra peroxidase inespecífica, realizou-se um ensaio em que a atividade da MPO da pele irradiada e não tratada com a formulação foi medida na ausência e na presença do inibidor desta enzima, o ácido 4-

aminobenzóico hidrazida. Os dados da Figura 19 demonstram que o meio reacional na ausência da amostra da pele (branco) não apresenta nenhuma atividade enzimática. Por outro lado, a amostra de pele irradiada apresentou uma atividade enzimática capaz de degradar 3,55 μM de H_2O_2 / minuto. Porém, quando esta amostra de pele irradiada foi incubada com 50 μM do ácido 4-aminobenzóico hidrazida, houve uma redução de 93% da atividade da MPO da pele. Logo, estes resultados confirmam a presença e o aumento da atividade da MPO nas amostras de pele irradiadas.

Figura 19: Quantificação da atividade da mieloperoxidase (U/min) em amostra da pele exposta a 2,87 J/cm^2 de radiação UVB, na ausência e na presença do inibidor ácido 4-aminobenzóico hidrazida.

Em adição, para avaliar se a atividade da MPO poderia ser inibida pelos compostos da fração purificada que penetraram na pele, determinou-se *in vitro* a atividade enzimática da MPO da Sigma-Aldrich®, na ausência e na presença da solução da fração purificada na concentração de 3,5 μg em 75 μL de meio reacional e na presença de 50 μM do inibidor enzimático, ácido 4-aminobenzóico hidrazida. A escolha da concentração de 3,5 μg da fração purificada em 75 μL de meio reacional foi baseada na quantidade de fração purificada penetrada na pele (item 4.3.1).

Os dados da Figura 20 demonstram que a atividade da mieloperoxidase diminuiu em 96,5% quando incubada com 50 μM do ácido 4-aminobenzóico hidrazida, enquanto que a adição de 3,5 μg da fração purificada proporcionou uma diminuição de 11% da atividade da MPO da Sigma. Esta diminuição pode ter ocorrido devido a uma inibição enzimática pelos compostos da fração purificada, mas não pode ser descartada a possibilidade de que essa diminuição seja devido a variações do método analítico, pois o ensaio não foi executado com

número suficiente de amostras para que fosse realizada uma análise estatística ou mesmo uma avaliação da precisão do método por medida do coeficiente de variância. Assim, a diminuição de 48% da atividade da MPO observada nas amostras de pele tratadas com a formulação adicionada da fração purificada e irradiada (IF), em relação à amostra de pele só irradiada (CI) (Figura 18), pode não ser devido à inibição da atividade da enzima pelos compostos da fração purificada.

Figura 20: Quantificação da atividade da mieloperoxidase da Sigma-Aldrich® (U/min.) na ausência e na presença de 50 µM de ácido 4-aminobenzóico hidrazida ou de 3,5µg da fração purificada.

4.5.3. Avaliação da eficácia da formulação adicionada da fração purificada em inibir a atividade/secreção das metaloproteinases (MMPs)

A exposição da pele à radiação UVB provoca um aumento da atividade/secreção das MMPs, as quais pertencem à família de enzimas proteolíticas que contribuem para o fotoenvelhecimento cutâneo e com a proliferação de células metastática no câncer de pele (CARINI et.al., 2000).

O efeito da formulação adicionada da fração purificada sobre a indução do aumento da atividade enzimática das MMP-9 e MMP-2 pela radiação UVB na pele dos animais foi avaliada qualitativamente, pela visualização das bandas translúcidas (Figura 21A) formadas pela atividade proteolítica em gel de poliacrilamida contendo gelatina.

A análise qualitativa das MMPs na pele dos animais tratados ou não com a formulação adicionada da fração purificada de *Inga edulis*, e expostas ou não à radiação UVB, mostrou que os compostos da fração purificada (IF) não protegeram a pele dos animais do aumento da MMP-9 induzida pela radiação (Figura 21 A). Pela medida das áreas das bandas de atividade

(Figura 21 B), observou-se um aumento de 193% da atividade da MMP-9 na amostra de pele dos animais irradiados (CI) em relação ao grupo de animais não irradiados (CNI). Nas amostras de pele dos animais tratados com a formulação adicionada da fração e irradiados (IF), a área da banda de atividade da MMP-9 foi apenas 12,8% menor em relação à área da banda da atividade da MMP-9 dos animais do grupo CI. Logo, esta diferença de porcentagem não pode ser atribuída à ação dos compostos da fração purificada penetrados na pele.

Por outro lado, a MMP-2 praticamente se manteve inalterada, corroborando com dados encontrados na literatura, que mostram que a radiação UV induz a expressão dos genes MMP-1, MMP-3 e MMP-9 *in vivo* (RITTIÊ; FISHER, 2002).

(A)

(B)

Figura 21: Visualização das bandas de atividade proteolítica das metaloproteinases MMP-9 e MMP-2 em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina (A) e quantificação das áreas das bandas de atividade da MMP-9, pelo *software* ImageJ®, presentes nas amostras de pele dos animais não irradiados e dos expostos a 2,87J/cm² de radiação UVB (B). CNI = controle não irradiado (animais não tratados com formulação e não irradiados), NIP = não irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e não irradiados), NIF = não irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e não irradiados), CI = controle irradiado (animais não tratados com formulação e irradiados), IP = irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e irradiados), IF = irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e irradiados). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ EPM.

4.5.4. Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α e quimiocina KC/CXCL1

O processo inflamatório cutâneo, desencadeado pela exposição da pele à radiação UVB, induz uma cascata de eventos que envolvem o influxo de neutrófilos para a área lesada, o aumento da produção de prostaglandinas decorrente da peroxidação lipídica, liberação de TNF- α , citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) e quimiocina, como a KC/CXCL1 (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

Neste ensaio (Figura 22), a radiação UVB proporcionou na pele dos animais irradiados e não tratados com formulação (CI) um aumento de aproximadamente 532, 26 e 1064% nos níveis de IL-1 β , TNF- α e KC, respectivamente, em relação ao grupo de animais não irradiados e não tratados (CNI). A quantidade de TNF- α determinada no grupo CNI foi mais que o dobro das quantidades encontradas nos grupos de animais tratados com a formulação placebo e adicionada da fração purificada, mas não irradiados (NIP e NIF respectivamente). Essa diferença encontrada entre os grupos de animais não irradiados pode estar relacionada com um processo inflamatório ou outra alteração no organismo dos animais do grupo CNI, que possa estar gerando uma resposta imunológica. Levando em consideração a média dos resultados dos grupos NIP e NIF, o aumento de TNF- α proporcionado pela radiação UVB foi de 130%, enquanto que no grupo de animais irradiados que receberam tratamento prévio com a formulação contendo a fração purificada (IF), observou-se uma redução de, aproximadamente, 37, 32 e 52% nos níveis de IL-1 β , TNF- α e KC, quando comparados ao grupo de animais CI. Porém, na quantificação da IL-1 β , a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo irradiado formulação (IF) para o grupo irradiado placebo (IP), sugerindo que os níveis de IL-1 β possam ter reduzido pelos componentes da formulação placebo e não pelos compostos da fração purificada adicionada à formulação. Por outro lado, sugere-se que os níveis de TNF- α e KC foram reduzidos pelos compostos da fração purificada incorporada à formulação.

Figura 22: Quantificação das citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) e da quimiocina KC/CXCL1 (C) em pele de camundongos sem pelo não irradiados ou expostos a 2,87J/cm² de radiação UVB. CNI = controle não irradiado (animais não tratados com formulação e não irradiados), NIP = não irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e não irradiados), NIF = não irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e não irradiados), CI = controle irradiado (animais não tratados com formulação e irradiados), IP = irradiado placebo (animais tratados com formulação placebo e irradiados), IF = irradiado formulação (animais tratados com formulação adicionada da fração purificada e irradiados). Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ EPM, com $p < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, seguindo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

5. Discussão

O interesse por plantas ou produtos naturais com valiosas e variadas propriedades medicinais vem aumentando consideravelmente desde a última década, devido aos efeitos benéficos sobre o organismo. Considerando os danos e o estresse oxidativo causados pela radiação UV sobre a pele, após uma exposição prolongada, aliada ao fato de que o uso de protetores solares não é completamente efetivo na prevenção dos malefícios ocasionados por esta radiação UV, a fotoquimioproteção, que consiste no uso de produtos naturais com diferentes propriedades, tais como antioxidantes e anti-inflamatórias incorporados em formulações tópicas, aparece como uma importante alternativa nas terapias de fotoproteção.

No Brasil, especificamente na Região Amazônica, encontra-se uma variedade de plantas medicinais com atividade antioxidante e anti-inflamatória, dentre elas o *Inga edulis* Martius (SOUZA et al., 2008), cujas folhas são ricas em compostos fenólicos, como catequina, epicatequina, miricitrina e quercetina (SOUZA et al., 2007). Neste trabalho, a fração purificada obtida do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Inga edulis* apresentou como compostos majoritários a miricitrina e a vicenina-2, confirmando a composição obtida por Silva (2012) para esta fração, nas mesmas condições experimentais. Os compostos majoritários da fração purificada foram quantificados neste estudo por CLAE, sendo os teores de vicenina-2 e miricitrina de 14 e 146 µg/mg da fração purificada, respectivamente (Figura 9).

A atividade antioxidante desta fração foi avaliada por Silva (2012), por medida da capacidade da fração purificada em reduzir o radical DPPH[•] e de inibir a peroxidação lipídica, cujos valores de IC₅₀ foram de 4,88 µg/mL e 2,54 µg da fração por mL do meio reacional, respectivamente. Nesta pesquisa, esta atividade foi avaliada pela medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol, em que o IC₅₀ foi de 0,071 µg da fração purificada por mL do meio reacional. Devido ao fato da fração purificada ter apresentado maior atividade antioxidante no ensaio de quimioluminescência, sugeriu-se que os compostos antioxidantes da fração purificada fossem hidrossolúveis, pois este ensaio ocorre em meio aquoso.

O coeficiente de partição octanol/água dos compostos antioxidantes da fração purificada foi determinado por medida da inibição da quimioluminescência. O coeficiente octanol/água calculado foi de 0, confirmando, assim, a hidrossolubilidade de todos os compostos antioxidantes presentes nesta fração. A quercetina, que é considerada um composto lipofílico, apresenta um coeficiente de partição octanol/água de 2,80 (CASAGRANDE et al., 2006).

Em decorrência da hidrossolubilidade dos compostos antioxidantes da fração purificada, avaliou-se o potencial antioxidante desta fração, em cultura de células, fibroblastos da linhagem L929, utilizando como agente oxidante o H_2O_2 e a radiação UVA na dose de 20 J/cm^2 . As células permaneceram em contato com soluções em diferentes concentrações da fração purificada durante o estresse oxidativo (não houve lavagem das células entre a adição das soluções da fração e do agente oxidante). Os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12, mostram que os compostos da fração purificada diminuíram a fluorescência como consequência de uma menor oxidação da DCFH pelas EROs no meio intracelular.

Em relação ao oxidante H_2O_2 , pressupondo que os compostos antioxidantes da fração purificada não penetraram nas células, devido a sua característica hidrofílica, a diminuição da fluorescência pode ter ocorrido em função do sequestro do agente oxidante pelos compostos da fração fora da célula. Conforme estudos realizados por Domitrovic et al. (2015), a miricitrina mostrou atividade sequestradora de H_2O_2 em ensaios *in vitro* com método de quantificação do agente oxidante a medida da absorbância em 230 nm, em que o valor de IC_{50} foi de $28,46 \pm 0,67 \text{ } \mu\text{g}$ de miricitrina por mL de meio reacional. Dessa forma, este dado indica que a miricitrina presente na fração purificada pode ter sequestrado o H_2O_2 adicionado, pois a quantidade de $20 \text{ } \mu\text{g}$ de fração purificada, que contém $2,92 \text{ } \mu\text{g}$ de miricitrina no meio reacional, proporcionou a diminuição de 81,2% da fluorescência. O valor de IC_{50} calculado para a inibição deste agente oxidante pela fração purificada na cultura de célula foi de $0,849 \text{ } \mu\text{g}$ por mL de meio reacional.

Já em relação ao oxidante radiação UVA, ao qual as células permaneceram expostas na presença da fração purificada por aproximadamente 2 horas, entende-se que as células permitiram a penetração dos compostos antioxidantes desta fração, de modo que sequestrassem os radicais gerados, reduzindo, assim, a quantidade de EROs e, portanto, a oxidação da DCFH e a fluorescência. Essa explicação se sustenta em trabalhos da literatura, tais como de Jiang et al. (2006) quando afirma que a radiação UV é capaz de aumentar a fluidez dos lipídeos e levar a uma desorganização da membrana celular, prejudicando a função barreira e aumentando a penetração de compostos na célula. O valor de IC_{50} calculado para a inibição deste agente oxidante foi de $2,3 \text{ } \mu\text{g}$ por mL de meio reacional.

O valor de $2,3 \text{ } \mu\text{g} / \text{mL}$ encontrado no experimento realizado com a radiação UVA foi 2,7 vezes maior que o IC_{50} obtido para o H_2O_2 . Estes dados sugerem que o contato direto dos compostos da fração purificada com o H_2O_2 facilitou o sequestro de radicais. Todavia, para esta redução ocorrer no experimento realizado com a radiação UVA, houve a necessidade de

penetração dos compostos antioxidantes da fração na célula, podendo esta não ser tão efetiva, exigindo uma quantidade maior de fração para reduzir em 50% a oxidação da DCFH e, conseqüentemente, a fluorescência.

Pela considerável atividade antioxidante da fração purificada de *Inga edulis* apresentada em estudos *in vitro*, a fração foi incorporada na concentração de 1% em uma formulação de forma emulsão estabilizada por polímero hidrofílico. Estudos de penetração e retenção *in vitro* (Célula de Franz) realizados por Silva (2012) com esta mesma formulação demonstraram que ela permitiu a penetração de compostos desta fração na pele de orelha de porco.

Assim, neste trabalho, seguiu-se utilizando a mesma formulação, só que em estudo de penetração/retenção cutânea *in vivo* em pele de camundongos sem pelos. A quantidade de compostos antioxidantes penetrados foram avaliados após duas horas de aplicação da formulação na pele do dorso dos animais, por medida da inibição da quimioluminescência (sistema/XOD/luminol), e por CLAE para identificação e quantificação dos compostos majoritários da fração retidos na pele. Conforme os resultados obtidos, os compostos majoritários identificados neste trabalho e por Silva (2012) foram miricitrina e vicenina-2. A quantidade de vicenina-2 penetrada na pele de porco, após 12 horas de aplicação, foi de 0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, quantidade 6,6 vezes maior que aquela encontrada na pele do camundongo (0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Esta maior quantidade de vicenina-2 penetrada pode estar relacionada ao maior tempo de penetração do estudo *in vitro* que foi 6 vezes superior ao do estudo *in vivo*. Já a quantidade de miricitrina penetrada neste estudo *in vivo* foi de 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele. A miricitrina não foi quantificada nos estudos *in vitro* (SILVA, 2012).

A medida da atividade antioxidante realizada nas amostras de pele dos estudos de penetração/retenção *in vivo*, após tratamento com a formulação adicionada de 1% da fração purificada, mostrou um aumento de 15% da atividade antioxidante. Este aumento foi proporcionado pela penetração de 0,006 μg da fração purificada contida em 10 μL da amostra obtida da extração de 1,77 cm^2 de pele. A massa total de fração purificada penetrada nessa área de pele foi de 3,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele.

Devido à natureza lipofílica do estrato córneo, à concentração de 1% da fração purificada incorporada à formulação, bem como à quantidade de miricitrina presente na fração (apenas 14% do total), a retenção deste polifenol hidrossolúvel na pele foi 11 vezes menor que a quantidade de 5,63 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ da quercetina, composto lipossolúvel, com um Ko/a de 2,80 quando adicionada na concentração de 0,3% à propilenoglicol, com tempo de penetração *in*

vivo de 6 horas (VICENTINI et al., 2008). Além da diferença de lipofilicidade entre os polifenóis, a concentração utilizada de propilenoglicol de 5% na formulação adicionada da fração purificada, e de 99,7% na solubilização da quercetina pode também ter influenciado nas quantidades penetrada de miricitrina e quercetina. Isso se explica porque o propilenoglicol possui uma ação promotora de penetração, visto que altera a estrutura da pele, modificando a absorção percutânea, por meio da capacidade de solvatação da alfa queratina presente no estrato córneo e ocupação de locais da proteína com pontes de hidrogênio, resultando em uma menor afinidade do ativo com o tecido, favorecendo sua penetração (WALKER; SMITH, 1996; LARRUCEA et al., 2001; WILLIAMS; BARRY, 2004).

A capacidade de absorção da radiação UVA e UVB pelos compostos da fração purificada em solução ou incorporados à formulação foram avaliados *in vitro* em cultura de células, fibroblastos da linhagem L929, sendo o efeito fotoprotetor avaliado pelas EROs formadas e por viabilidade celular, respectivamente. Os resultados mostraram que a fração purificada na concentração de 50 mg/mL teve um efeito fotoprotetor para a radiação UVB estatisticamente comparável ao efeito proporcionado pelos fotoprotetores comerciais de FPS 15 e FPS 30. Entretanto, quando a fração purificada foi adicionada à formulação na concentração de 1%, não apresentou efeito fotoprotetor contra as radiações.

Já a capacidade fotoquimioprotetora, efeito antioxidante e anti-inflamatório da formulação adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis*, foi avaliada *in vivo* em camundongos sem pelos, os quais foram ou não submetidos a 2,87 J/cm² de radiação UVB. A partir deste ensaio foi possível avaliar a capacidade dos compostos fenólicos da fração purificada incorporados à formulação, em especial da miricitrina e vicenina-2, em impedir a depleção de GSH endógeno, em diminuir o processo inflamatório determinado pela quantificação da MPO e pelas citocinas IL-1 β , TNF- α e quimiocina KC/CXCL1, como também pela inibição da atividade/secreção das MMPs 2 e 9.

O estrato córneo é o maior alvo da radiação UV, principalmente a UVB, por causa da sua localização na interface entre o corpo e o meio externo. Essa camada é constituída de corneócitos (células anucleadas) embebidas em uma matriz intercelular rica de lipídios. Estudos conduzidos por Weber e colaboradores (1999) mostraram que a concentração dos antioxidantes endógenos de baixa massa molecular, ácido úrico, GSH e vitamina C diminuem das camadas mais internas do estrato córneo para a camada mais superficial. Godic e colaboradores (2014) relataram que a concentração de antioxidantes é maior na epiderme do que na derme. Contudo, este gradiente de antioxidantes na pele é rompido com a sua

exposição à radiação UV, ocorrendo danos oxidativos aos lipídios e proteínas do estrato córneo pelas EROs formadas.

A GSH é o antioxidante endógeno hidrossolúvel mais abundante no citosol presente em vários tecidos, inclusive na pele, onde está distribuída no estrato córneo, na epiderme e na derme. Esta pode atuar como sequestrador direto de radicais livres, protegendo, assim, a pele das EROs geradas em decorrência de uma exposição à radiação UVB (TYRREL; KEYSE; MORAES, 1991).

Os resultados da figura 17 mostraram que a formulação adicionada da fração purificada não foi capaz de proteger a pele da depleção da GSH induzido pela radiação UVB, apesar da fração purificada ter demonstrado *in vitro* atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres por diferentes ensaios, e da miricitrina, composto majoritário da fração purificada, ter apresentado atividade antioxidante e sequestradora dos radicais DPPH[•], NO e do H₂O₂, conforme demonstrados por Domitravic e colaboradores (2015). No entanto, a ausência de proteção da depleção do GSH pela formulação poderia ser explicada pela hidrossolubilidade dos compostos antioxidantes da fração purificada, pois estes poderiam não penetrar para o interior da célula, permanecendo na matriz extracelular. Casagrande e colaboradores (2006) mostraram que a formulação creme adicionada de 1% de quercetina protegeu a depleção de GSH induzida pela radiação UVB na dose de 2,46 J/cm². A lipofilicidade da quercetina pode facilitar sua penetração na célula, como também sua interação com a membrana celular, evitando a peroxidação lipídica da membrana, diminuindo consequentemente, a captação de peróxidos lipídicos, principalmente de peróxido de colesterol, e o estresse oxidativo intracelular e protegendo a GSH (VILA; KORYTOWSKI; GIROTTI, 2000).

A radiação solar UV rompe o balanço oxidante/antioxidante da pele, conduzindo ao estresse oxidativo, o qual é acompanhado pela progressão das desordens inflamatórias. Ambas as radiações UVA e UVB induzem a expressão da COX-2 e da NOS. O NO produzido pela NOS, atua como mensageiro secundário, modulando a formação de EROs endógenos, que juntamente com as PGE₂, sintetizada pela ação da COX-2, com as citocinas pró-inflamatórias liberadas (IL-1 β e TNF- α) e as quimiocinas, orquestram a resposta inflamatória. Em adição, a radiação UVB direta e as EROs geradas por esta radiação e pela radiação UVA ativam algumas cascatas de sinalizações que levam à ativação do NF- κ B e MAPK que medeiam a expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

O início e a manutenção da resposta inflamatória aguda está associada à ativação e recrutamento de neutrófilos ao tecido injuriado. A migração de neutrófilos do lúmen vascular à área inflamada envolve um processo complexo e dinâmico. O neutrófilo precisa reconhecer as moléculas de adesão apropriada sobre a superfície do endotélio ativado, penetrar a monocamada da célula endotelial e a membrana basal, e seguir sinais quimiotáticos até o tecido lesado (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005). Recentes evidências sugerem que a enzima MPO, uma heme peroxidase, cuja expressão ocorre em neutrófilos e monócitos, é uma determinante crítica do processo inflamatório. A MPO que catalisa via H_2O_2 e um haleto, como o cloreto, a produção de intermediários altamente reativos, por exemplo, o ácido hipocloroso, que lesionam o tecido inflamado.

O aumento, observado neste trabalho, da atividade da MPO na pele dos animais após exposição à radiação UVB, está de acordo com os dados da literatura. Por outro lado, conforme a Figura 18, a atividade da MPO da pele tratada com a formulação adicionada da fração purificada e então irradiada foi diminuída em 48%. Esta diminuição pode ser devido à inibição da atividade desta enzima pelos compostos da fração purificada penetrados na pele dos camundongos sem pelos, ou então, pela diminuição do recrutamento de neutrófilos para o tecido.

Os ensaios *in vitro* de medida da atividade da MPO comercial na presença ou ausência do seu inibidor específico, ácido 4-aminobenzóico hidrazida, e da fração purificada, mostraram que 3,5 µg da fração purificada no meio reacional (75µL) inibiram em 11% a atividade da enzima. Meotti et al. (2008) mostraram que a miricitrina nas concentrações de 1,5; 10 e 100 µM inibiu em aproximadamente 14, 30 e 51% a atividade da MPO respectivamente. Como nos ensaios *in vitro* realizados, a concentração de miricitrina, presente em 3,5 µg da fração purificada, era de 14,7 µM, a inibição de 11% da atividade desta enzima observada na Figura 20 poderia ser atribuída ao seu efeito inibitório.

No entanto, nos ensaios de MPO *in vivo*, considerando que a quantidade média de pele empregada foi de 173,2 mg, que 1,77 cm² de pele corresponde a 720 mg, e os dados de penetração, a concentração de miricitrina no meio reacional foi de 0,03 µM. Dessa forma, a quantidade penetrada de miricitrina e de outros compostos da fração (baseado nos testes *in vitro*) não poderiam explicar a redução de 48% da atividade desta enzima nos animais tratados com a formulação adicionada da fração.

Estudos têm mostrado que as principais citocinas liberadas pelas células da pele após uma exposição à radiação solar UV, incluem as interleucinas 1 e 6, TNF- α , e a quimiocina IL-8 (MÜLLER; MEINEKE, 2007).

A IL-8 difere de todas as outras quimiocinas pela sua habilidade em mediar a quimiotaxia de neutrófilos que são seu alvo primário. Entretanto, os neutrófilos, além de alvos, são sintetizadores desta quimiocina. Dois receptores para IL-8 são expressos na superfície de neutrófilos, CXCR1 e CXCR2 (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1994; MURPHY, 1997). Uma vez recrutados para o foco inflamatório, os neutrófilos exibem uma habilidade alterada (usualmente up-regulada) para expressão/produção de quimiocinas, contribuindo, dessa maneira, com a regulação do acúmulo de leucócitos (CASSATELLA, 1999).

Os dados da figura 22 (C) mostram uma redução de 52% da quantidade da quimiocina KC/CXCL1 (correspondente a IL-8 em humanos) na pele de camundongos sem pelos, tratada com a formulação adicionada de 1% da fração purificada e irradiada. Considerando os dados experimentais deste ensaio, bem como os resultados encontrados no estudo de penetração *in vivo*, a quantidade de fração purificada encontrada na amostra de pele destes animais foi de 0,16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de pele/mL de meio reacional. Nestes 0,16 μg de fração purificada continha 0,023 μg de miricitrina, correspondente a uma concentração de 0,05 μM . Logo, a diminuição de 52% da quantidade de KC na pele de camundongos tratados e irradiados, só pode ser explicada por um efeito muito específico, por exemplo, em receptores, pois a concentração de miricitrina por mg de pele calculada foi de apenas 0,05 μM . Nesse sentido, a miricitrina pode ter interagido com receptores expressos em neutrófilos e ter inibido a interação da quimiocina KC com seu receptor. Em decorrência, a inibição ocasionada pela miricitrina poderia impedir a síntese/secreção das quimiocinas pelos neutrófilos infiltrados, diminuindo o recrutamento de mais neutrófilos para a área e, conseqüentemente, a atividade da MPO, como também o processo inflamatório.

Recentes investigações têm mostrado que os neutrófilos estimulados podem expressar uma variedade de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β (KWON; JUNG; YANG, 2013). Dessa forma, a diminuição do recrutamento de neutrófilos à área pela interação da miricitrina ou de outro composto presente na fração purificada aos receptores da quimiocina, KC/CXCL1, expressos nos neutrófilos, poderia explicar também a diminuição dos níveis da citocina TNF- α , na pele de camundongos tratados com a formulação adicionada da fração purificada e expostos à radiação UVB. A menor produção destas citocinas conduziria a uma redução da

expressão de moléculas de adesão e, assim, a uma menor quantidade de neutrófilos infiltrados (MÜLLER; MEINEKE, 2007; LEMBO et al., 2014). Entretanto esse menor recrutamento de neutrófilos não poderia explicar a diminuição dos níveis de IL-1 β no grupo de animais tratados com a formulação adicionada da fração purificada, uma vez que este resultado foi igual ao observado no grupo de animais tratados com a formulação placebo.

Os neutrófilos, quando recrutados para o local da inflamação, são capazes também de aumentar os níveis das MMPs, através do extravasamento de seus grânulos de gelatina (terciários) no tecido. As MMPs são enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular, particularmente de estrutura protéica, tais como o colágeno e a fibronectina. Em virtude disso, estas enzimas estão intimamente ligadas ao processo de fotoenvelhecimento, caracterizado pelo aparecimento de rugas (KROLIKIEWICZ-RENIMEL et al., 2013).

A radiação UV pode proporcionar o aumento dos níveis destas MMPs por indução das vias NK-kB, MAPK e por ativação dos receptores de fatores de crescimento. Estas vias, que por uma série de sinalizações, induzem à ativação da molécula p38, resultando no aumento da expressão do AP-1 e,consequentemente, no aumento dos níveis de MMPs (PILLAI et al, 2005; SHAH; MAHAJAN, 2013).

Neste estudo, a radiação UVB sobre a pele do dorso dos animais, claramente induziu a um aumento da MMP-9 (Figura 21) mesmo no grupo de animais tratados previamente com a formulação adicionada de 1% da fração purificada. Considerando que os níveis de MMPs se elevam após secreção pelos grânulos dos neutrófilos ou via AP-1, e o fato de que os compostos da fração purificada reduziram os níveis da quimiocina KC e, assim, dos neutrófilos infiltrados, sugere-se que o aumento encontrado para MMP-9 ocorreu via AP-1. Isso pode estar relacionado com a característica dos compostos da fração purificada, adicionados na concentração de 1% à formulação, de não serem capazes de absorver a radiação UVB e, ainda, de não agirem intracelularmente, devido à hidrossolubilidade destes.

6. Conclusões

Diante dos resultados obtidos e de sua discussão, conclui-se que:

Os teores dos compostos majoritários da fração purificada de *Inga edulis*, vicianina-2 e miricitrina, quantificados por CLAE, foram de 14 e 146 $\mu\text{g}/\text{mg}$ da fração purificada, respectivamente.

A fração purificada demonstrou uma considerável atividade antioxidante *in vitro* no ensaio de quimioluminescência (sistema xantina/XOD/luminol), apresentando um IC_{50} de 0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio reacional.

Os compostos da fração purificada com atividade antioxidante são hidrossolúveis, conforme coeficiente de partição octanol/água realizado.

Soluções da fração purificada com diferentes concentrações, em contato com as células, fibroblastos (L929), proporcionaram uma menor oxidação do DCFH no meio intracelular, diminuindo significativamente a intensidade da fluorescência gerada pela DCF, após estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 e pela radiação UVA.

A formulação, emulsão estabilizada por polímero hidrofílico, adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis*, permitiu a penetração de 3,4 μg da fração purificada por cm^2 de pele dos animais, após duas horas da aplicação, que ocasionou um aumento do potencial antioxidante endógeno da pele. A quantidade penetrada de vicianina-2 e miricitrina foram de 0,05 e 0,5 μg da fração/ cm^2 de pele, respectivamente.

A fração purificada nas concentrações de 25 e 50 mg/mL apresentou um efeito fotoprotetor para as radiações UVA e UVB, em cultura de células, fibroblastos (L929). Porém, este efeito não foi observado quando a fração purificada foi incorporada à formulação na concentração de 1%.

Os estudos de eficácia fotoquimioprotetora *in vivo* demonstraram que a fração purificada incorporada à formulação proporciona um efeito anti-inflamatório na pele dos animais após exposição à radiação UVB, por ser capaz de:

- Diminuir a atividade da MPO em 48% em decorrência de uma diminuição da migração dos neutrófilos para o tecido e não por inibição de atividade enzimática pelos compostos da fração purificada.
- Reduzir em 52% os níveis da quimiocina KC/CXCL1, devido à interação da miricitrina com receptores expressos em neutrófilos, o que resulta em uma menor síntese/secreção desta quimiocina, e em um menor recrutamento destes leucócitos.

- Reduzir os níveis da citocina TNF- α em 32%, como consequência de um menor recrutamento de neutrófilos e, logo, uma menor produção desta citocina por neutrófilos.

A formulação adicionada da fração purificada aplicada na pele dos animais expostos à radiação UVB não foi capaz de:

- Impedir a depleção do antioxidante endógeno GSH, devido à hidrossolubilidade dos compostos da fração purificada que não penetraram nas células.
- Evitar o aumento da MMP-9 via AP-1, visto que os compostos da fração purificada incorporada à formulação não absorvem a radiação UVB e não agem intracelularmente.
- Diminuir os níveis da citocina IL-1 β , pois a diminuição observada no grupo de animais tratados com a formulação adicionada da fração purificada foi igual à observada no grupo de animais tratados com a formulação placebo.

A fração purificada de *Inga edulis*, rica em compostos fenólicos, incorporada em formulação tópica, aparece como uma alternativa para prevenção das alterações provocadas na pele após exposição à radiação UVB, devido suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

7. Referências

- AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 571(1-2): 153-173, 2005.
- AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects os solar radiation on cutaneous detoxication pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63: 61-69, 2001.
- AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 508(2): 144-151, 2011.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, 55: 97-179, 1994.
- BASU-MODAK, S.; TYRRELL, R.M. Modulation of gene expression by solar ultraviolet radiation. In: GIACOMONI, P.U. **Sun Protection in Man**, 1st ed, vol. 3, Amsterdam: The Netherlands; vol.3, cap.15, pag. 303-320, 2001.
- BAYIR, H.M.D. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, 33(12): S498-S501, 2005.
- BEURDEN, P.A.M.S.; HOFF, J.W.V. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, 38: 73-83, 2005.
- BOLFA, P. et al. Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. **Food and Chemical Toxicology**, 62: 329-342, 2013.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 125: 811-826, 2004.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Bood**, 89(10): 3503-3521, 1997.
- BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, 78: 206-209, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2014. 124p.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, 52: 302-310, 1978.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research**, 571: 3-17, 2005.

CAMPANINI, M.Z. et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 127: 153-160, 2013.

CARINI, M., et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco** v. 55, p. 526-534, 2000.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 84 (1): 21-27, 2006.

CASSATELLA, M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Advances in Immunology**, 73: 369-509, 1999.

CAYROL, et al. A mineral sunscreen affords genomic protection against ultraviolet (UV) B and UVA radiation: in vitro and in situ assays. **British Journal of Dermatology** v. 141, n. 2, p. 250-258, 1999.

CHEN, W. et al. Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. **BioMed Research International**, 2013: 1-7, 2013.

CHRÉTIEN, M. N.; HEAFEY, E.; SCAIANO, J. C. Reducing Adverse Effects from UV Sunscreens by Zeolite Encapsulation: Comparison of Oxybenzone in Solution and in Zeolites. **Photochemistry and Photobiology** v. 86, p. 153-161, 2010.

CHU, D.H. Development and Structure of Skin. In: GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFELL, D.J.; WOLFF, K. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**, 8th ed., New York: McGraw-Hill; cap.17,p.57-73, 2012.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 7(2): 66-76, 1996.

- COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, 61(1): 71-76, 1998.
- CROSS, A.S. et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (6): 4112-4120, 2003.
- CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário Parte I – Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 50(4): 434-461, 2010.
- DIAS, A.L.S.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 33(1): 38-42, 2010.
- DOMITROVIĆ, R. et al. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**, 230: 21-29, 2015.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews. Cancer.**, 2(3): 161-174, 2002.
- FENG, X.-X. et al. Effects of topical application of patchouli alcohol on the UV-induced skin photoaging in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 63: 113-123, 2014.
- FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, 25(6): 1003-1011, 2002.
- FIGUEIREDO, S.A. et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 131: 65-73, 2014.
- FONSECA, Y.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- FONSECA, Y.M. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, 127: 596-601, 2010.

FORTE, A.L.S.A. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

GEORGETTI, S.R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescent method. **AAPS PharmSci**, 5: 210-214, 2003.

GETIE, M. et al. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, 57: 320-322, 2002.

GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, 51: 685-692, 2000.

GOBBO-NETO, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, 71 (1): 3-6, 2005.

GODIC, A. et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014: 1-6, 2014.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, 30: 206-213, 2007.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As quimiocinas e os seus receptores – Características e Funções Fisiológicas. **Acta Médica Portuguesa**, 24: 967-976, 2011.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 1205-1212, 2006.

HALLIDAY, G.M. et al. The effects of sunlight on the skin. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms/Common skin conditions and disorders**, 5(2): e201-e209, 2008.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55: 481-504, 2000.

- HECK, D.E. et al. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 195: 288-297, 2004.
- HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 74: 214-226, 1976.
- HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International Journal of Pharmaceutics**, 408(1-2): 27-38, 2011.
- HRUZA, L.L.; PENTLAND, A.P. Mechanisms of UV-induced inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, 100: 35S-41S, 1993.
- HWANG, E. et al. Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. **Phytotherapy Research**, 28: 1778-1788, 2014.
- INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, 305: 75-80, 2001.
- ISLAM, M.N. et al. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaries* exhibited potent anti-glycation properties. **Food and Chemical Toxicology**, 69: 55-62, 2014.
- JAIN, A. K. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates nitrogen mustard-induced skin injuries. **Toxicology**, 320: 25-33, 2014.
- JIANG, S.J. et al. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. **Journal of Dermatological Science**, 44: 29-36, 2006.
- JIMÉNEZ, M.F.M. **Efecto protector de fraxetol y miricetina frente a la neurotoxicidad inducida por rotenona em células de neuroblastoma**. Tesis inédita de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Madrid, 2004.
- KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, 148: 149-157, 2000.
- KRYSTON, T.B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 711: 193 – 201, 2011.

- KROLIKIEWICZ-RENIMEL, I. et al. Protective effect a *Butea monosperma* (Lam.) Taub. flowers extract against skin inflammation: Antioxidant, anti-inflammatory and matrix metalloproteinases inhibitory activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 148: 537-543, 2013.
- KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. **Internacional Immunopharmacology**, 10: 1325-1334, 2010.
- KWON, O.S.; JUNG, S.H.; YANG, B.S. Topical Administration of Manuka Oil Prevents UV-B Irradiation-Induced Cutaneous Photoaging in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013: 1-10, 2013.
- LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 52: 113-119, 2001.
- LEMBO, S. et al. The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells. **BioMed Research Internation**, 2014: 1-8, 2014
- LIAKOURA, V.; BORNEAN, J.F.; KARABOURNIOTIS, G. The ability of abaxial and adaxial epiderms of sun and shade leaves to attenuate UV-A and UV-B radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, 122: 117-125, 2003.
- LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, 6(12): 1182-1190, 2005.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicos fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo.** 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- MARRASSINI, C. et al. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis*. **Journal of Natural Products**, 74(6): 1503-1507, 2011.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 195: 298-308, 2004.

- MEOTTI, F.C. et al. Involvement of p38^{MAPK} on the antinociceptive action of myricitrin mice. **Biochemical Pharmacology**, 74: 924-931, 2007.
- MEOTTI, F.C. et al. Myricitrin as a substrate and inhibitor of mieloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 44: 109-120, 2008.
- MERZLYAK; M.N. et al. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. **Journal of Plant Physiology**, 162: 151-160, 2005.
- MOLLINEDO, F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. **Inmunología**, 22(4): 340-358, 2003.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84(3): 263-269, 2009.
- MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 54 (2): 103-112, 2001.
- MOURET, S. et al. Time course of skin features and inflammatory biomarker after liquid sulfur mustard exposure in SKH-1 hairless mice. **Toxicology Letters**, 232: 68-78, 2015.
- MÜLLER,K.; MEINEKE, V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. **Experimental Hematology**, 35: 96-104, 2007.
- MURPHY; P.M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Seminars in Hematology**, 34(4): 311-318, 1997.
- NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRATT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, 69: 249-256, 2011.
- NICHOLS, J.A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, 302: 71-83, 2010.
- ODOBASIC, D. et al. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. **Blood**, 121(20): 4195 – 4204, 2013.

- PANDEL, R. et al. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Notices Dermatology**, 2013:1-11, 2013.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63(7): 1035-1042, 2000.
- PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, 27: 17-34, 2005.
- PHARMASPECIAL. Informativo Técnico: Literatura Hostacerin® SAF. Disponível em: http://pharmaspecial.com.br/media/produtos/_lit_hostacerin_saf.pdf. Acesso em 18 de Janeiro de 2015.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, 17(11): 1381-1390, 2011.
- POMPEU, D.R. et al. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazônica**, 42(1): 165-172, 2012.
- PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **Plos One**, 8(7): 1-10, 2013.
- QIN, M. et al. Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3/Akt activation and STAT3 signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, 1-12, 2015.
- RAMPAUL, A.; PARKIN, I.P.; CRAMER, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, p. 138–148, 2007.
- RAVANAT, J.-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63: 88-102, 2001.
- RAVINDRAN, A. et al. Chemokine CXCL1 dimer is a potent agonist for the CXCR2 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 288(17): 12244-12252, 2013.
- RITTIÊ, L.; FISHER, G.J. UV- light- induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, 1: 705-720, 2002.

ROSA, F.S. **Influência de protetor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 273-278, 2010.

SCHWANKE, R.C. et al. Oral administration of the flavonoid myricitrin prevents dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice through modulation of PI3K/Akt signaling pathway. **Molecular Nutrition & Food Research**, 57 (11): 1938-1949, 2013.

SERAFINI, M.R. et al. UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing *Morinda citrifolia* extract. **Biomed Research International**, 2014: 1-10, 2014.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, 360(3): 794-802, 2007.

SHAH, H.; MAHAJAN, S.R. Photoaging: new insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**, 3(3): 161-169, 2013.

SHIMOSAKI, S. et al. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extract *in vitro* and *in vivo*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 25(4): 374-380, 2011.

SILVA, D.F. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico-químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SILVA, E.M. et al. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. **Separation and Purification Technology**, 53: 274-280, 2007.

SILVA, E.M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007.

- SILVA, L.R.; FERREIRA, M.M.C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, 26 (3): 312-318, 2003.
- SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 20(2): 351-355, 2007.
- SOUZA, J.N.S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, 106: 331-339, 2008.
- SOUZA, J.N.S. et al. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18(6): 1276-1280, 2007.
- SUN, G. et al. inhibitory effects of myricitrin on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 271(1): 114-126, 2013.
- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, 150(1): 25-38, 2006.
- TAKAHASHI, M. et al. Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. **The Plant Journal**, 66: 433-442, 2011.
- TYRREL, R.M.; KEYSE, S.M.; MORAES, E.C. Cellular defense against UVA (320-380 nm) and UVB (290-320 nm) radiations. **Photobiology**, 861-871, 1991.
- VICENTINI, F. T. M. C., et al. Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 69, n. 3, p. 948-957, 2008.
- VIEIRA, S.M. et al. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British Journal of Pharmacology**, 158: 779-789, 2009.
- VILA, A.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A.W. Dissemination of peroxidative stress via intermembrane transfer of lipid hydroperoxides: model studies with cholesterol hydroperoxides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 380(1): 208-218, 2000.

- WALKER, R.B.; SMITH, E.W. The role of percutaneous penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 18: 295-301, 1996.
- WANG, H.; JOSEPH, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplatereader. **Free Radical Biology & Medicine**, 27: 612-616, 1999.
- WEBER, S.U. et al. Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. **The Journal of Investigative Dermatology**, 113(6): 1128-1132, 1999.
- WESTER, C.R.; MAIBACH, H.L. In vitro testing of topical pharmaceutical formulations In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**. New York: Marcel Dekker, 213-220, 1990.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56: 603-618, 2004.
- WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 5(2): 215-237, 2005.
- WU, J-H. et al. Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2): 328-332, 2008.
- YIN, Y. et al. Quercetin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 269:89-99, 2013.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6): 787-793, 1998.
- ZHU, H. et al. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-diclorofluorescein. **Archives of Toxicology**, 68: 582-587, 1994.