

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação in vitro e in vivo da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e da (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB

Rebeca Oliveira de Souza

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação in vitro e in vivo da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e da (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Rebeca Oliveira de Souza

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 02/04/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Souza, Rebeca Oliveira

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB. Ribeirão Preto, 2015. 138 p.; 30cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira.

1. Antioxidantes. 2. *Byrsonima crassifolia. 3.* Catequina. 4. Radiação UV. 5. Fotoquimioproteção. 6. Queratinócitos. 7. Camundongos sem pelos. 8. Penetração cutânea.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rebeca Oliveira de Souza

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima* crassifolia e da (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

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

Banca Examinadora

Prof.Dr	
Instituição:	
Prof.Dr	
	Assinatura:
Prof.Dr	
	Assinatura:
Prof.Dr	
	Assinatura:
Prof.Dr	
Instituição:	

Dedico esta tese à minha mãe Clarice e ao meu namorado Guilherme, os quais confiaram em mim, apoiaram meus sonhos e deram toda força para enfrentar esta etapa de minha vida!

Primeiramente, agradeço a Deus, que me deu a vida e a possibilidade de viver tudo aquilo que vivo hoje.

À Professora Maria José Vieira Fonseca, por me acolher em seu laboratório. Pela contribuição científica ao longo deste trabalho, por tudo que aprendi durante este período de formação, tanto profissional quanto pessoal. Pela preciosa amizade, apoio e incentivo sempre. Muito Obrigada!

Ao querido amigo e Professor Hervé Rogez pelo fornecimento do extrato e da fração de *Byrsonima crassifolia* e dos kits de ELISA utilizados para realização deste trabalho. Pela confiança depositada, minha eterna gratidão "papito", pois sem o seu incentivo e apoio não teria vindo pra Ribeirão Preto.

Aos queridos colegas e amigos da pós-graduação Daniele, Dayane, Fabiana, Fernanda, Karini, Michele, Sônia, Yris, e em especial à Ana Luiza, Geórgia, Mirela, Vanessa, Tiago B., Silvia e Rodrigo pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e colaboração.

Ao técnico José Roberto Jabor pela colaboração e constante auxílio para realização deste trabalho.

Aos funcionários Ana Elisa e Ana Cristina pelo auxílio técnico prestado e aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica da FCFRP, por estarem sempre com as portas abertas para ajudar e ensinar, e por disponibilizarem equipamentos que foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério da FCFRP, em especial ao Reinaldo Batista, pela atenção e cuidado no manejo dos animais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FCFRP-USP, Rosana Florêncio, Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi, pela eficiência e dedicação nos serviços prestados.

Aos Professores Dr. Carlos Curti, Dr. Augusto César Cropanense Spadaro, Dr. Sérgio Akira Uyemura, Dra. Yara Maria Lucisano Valim e a todos os professores da Bioquímica por disponibilizar alguns equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

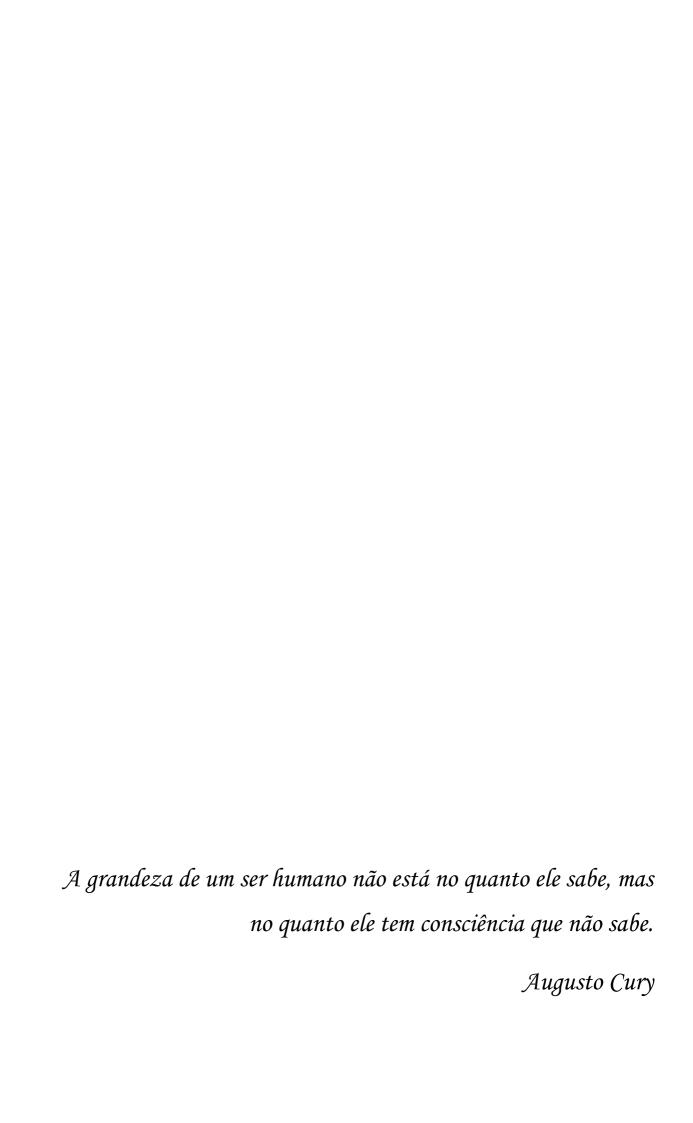
Ao Guilherme Pereira Costa, por todo amor, companheirismo, incentivo, dedicação e paciência. Muito obrigada por estar presente nesta etapa tão importante da minha vida, você foi essencial!

À minha família, meus irmãos, minha cunhada, meus sobrinhos Pedro e Júlia, aos meus pais, em especial à minha mãe Clarice, pela compreensão, apoio e incentivo durante todos estes anos em Ribeirão Preto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!



RESUMO

SOUZA, R. O. Avaliação in vitro e in vivo da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e da (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB. 2015. 140f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

A pele é o maior tecido do corpo humano e está constantemente exposta a inúmeros agentes nocivos, dentre os quais se destaca a radiação ultravioleta (RUV), que está relacionada aos fotodanos do DNA, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de mediadores do processo inflamatório. Nestas circunstâncias, mesmo possuindo um sistema de defesa antioxidante, a pele é submetida ao estresse oxidativo devido ao aumento da concentração de radicais livres, o que rompe o equilíbrio próoxidante/antioxidante. Neste contexto, as substâncias naturais tem sido frequentemente empregadas como ferramenta para enriquecer o sistema protetor cutâneo endógeno, reduzindo, dessa forma, os danos oxidativos causados pela RUV na pele. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fotoguimioprotetor in vitro e in vivo da fração de média polaridade de Byrsonima crassifolia (BC) e da (+) catequina (CAT), em cultura de queratinócitos humanos e em camundongos sem pelos submetidos à radiação UVB. Comparado ao extrato purificado, a fração de BC apresentou elevada atividade antioxidante in vitro e maiores teores de polifenóis totais e de compostos fenólicos: (+) categuina (255 ± 3,2mg/g de fração), (-) epigalocateguina-3-galato (26 ± 1,68mg/g de fração) e quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo (12 ± 0,09mg/g de fração). A formulação gel adicionada da fração de BC (1%) proporcionou maior liberação dos compostos fenólicos na pele de orelha de porco do que a formulação emulgel e a CAT foi o composto fenólico majoritário quantificado na epiderme viável da pele de orelha de porco $(21,72 \pm 5,2\mu\text{g/cm}^2)$. Dessa forma, a formulação gel (1%) adicionada da fração de BC ou CAT foi avaliada também quanto à penetração cutânea in vivo. Na epiderme viável da pele dos camundongos sem pelos detectou-se os compostos fenólicos da fração de BC, bem como a CAT. A avaliação fotoquimioprotetora da fração de BC e da CAT em cultura de queratinócitos demonstrou que ambas as amostras foram capazes de inibir a peroxidação lipídica, a secreção da IL-6 e a redução do NFκB/p65 no citoplasma induzidos pela radiação UVB. Em relação à atividade fotoquimioprotetora in vivo, a fração de BC e CAT foram capazes de evitar/diminuir a depleção dos níveis de GSH, o infiltrado inflamatório e a secreção das citocinas IL-1β e IL-6 induzidos pela radiação UVB. Por outro lado, somente a fração de BC foi capaz de inibir a atividade/secreção da metaloproteinase MMP-9, o que demonstra uma potente atividade fotoquimioprotetora e sugere que o efeito da fração vegetal pode ser superior ao do padrão (+) CAT, já que a fração é composta por uma mistura complexa de substâncias capazes de potenciar a ação dos polifenóis. Estes resultados são promissores e apontam para o uso da fração de BC e da CAT na prevenção/tratamento dos danos induzidos pela radiação UVB na pele.

Palavras-chave: Antioxidantes, *Byrsonima crassifolia*, Catequina, Radiação UV, Fotoquimioproteção, Queratinócitos, Camundongos sem pelos e Penetração cutânea.

ABSTRACT

SOUZA, R. O. *In vitro* and *in vivo* evaluation of photochemoprotective activity of *Byrsonima crassifolia* fraction and (+) catechin against the damages induced by UVB radiation. 2015. 140f. Thesis (Doctoral) Pharmaceutical Sciences School, University of São Paulo, 2015. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

The skin is the largest tissue of the human body and it is constantly exposed to several harmful agents, such as the ultraviolet radiation (UVR), which is related to the DNA photodamage, generation of reactive oxygen species (ROS) and activation of inflammatory mediators. In these circumstances, even having an antioxidant defense system, the skin is exposed to oxidative stress due to the increase of free radicals concentration, which changes the pro oxidant / antioxidant equilibrium. In this context, natural substances have frequently been employed as a tool to improve the skin's endogenous protective system, which ultimately decreases the oxidative damage caused by UVR on the skin. Therefore, this study aimed to evaluate in vitro and in vivo photochemoprotective effect of Byrsonima crassifolia (BC) fraction and (+) catechin (CAT) in human keratinocytes culture and hairless mouse against UVB radiation. If compared to the extract, BC fraction showed higher in vitro antioxidant activity and higher total polyphenols content and phenolic compounds: (+) catechin (255 \pm 3.2 mg/ g fraction), (-) epigallocatechin-3-gallate ($26 \pm 1.68 \text{ mg/g}$ of fraction) and quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (12 \pm 0.09 mg/g of fraction). The gel formulation containing to the BC fraction (1%) provided higher release of phenolic compounds on pig ear skin than the emulgel formulation. It was demonstrated that CAT was the major phenolic compound quantified in the viable epidermis $(21.72 \pm 5.2 \mu g / cm^2)$. Thus, BC fraction or CAT were incorporated the gel formulation (1%) and in vivo skin penetration was evaluated. On the viable epidermis of mice hairless it was detected the phenolic compounds of the BC fraction, as well as CAT compound. Photochemoprotector evaluation in keratinocytes cell culture showed that both BC fraction and CAT were able to inhibit lipid peroxidation and to decrease the secretion of IL-6 and NFkB / p65 transcription in the cytoplasm. Regarding the in vivo functional activity, BC fraction and CAT were able to prevent/reduce the depletion of GSH levels, the inflammatory infiltrate and IL-1\beta and IL-6 secretion induced by UVB radiation. On the other hand, only the BC fraction was able to inhibit the activity/secretion of matrix metalloproteinase MMP-9, which illustrate its strong photochemoprotector activity and suggests that the plant fraction effect can be superior to the standard. It can be explained by the fact that the fraction is a complex sample in which several substances are present and these substances can enhance the polyphenol activity. These results are promising and suggest the use of BC fraction and CAT in the prevention/treatment of the damages induced by UVB radiation in the skin.

Keywords: Antioxidants, *Byrsonima crassifolia*, Catechin, UV radiation, Keratinocytes, Topical formulation, Hairless mouse and skin penetration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Camadas da pele humana
Figura 2: Capacidade de penetração da radiação solar na pele humana em função do
comprimento de onda
Figura 3: Reação em cadeia da geração de Espécies Reativas de Oxigênio
Figura 4: Esquema simplificado das alterações bioquímicas e vias de sinalização
envolvidas na pele após exposição à radiação UV
Figura 5: Ação dos agentes fotoquimioprotetores na pele
Figura 6: Árvore e folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> .
Figura 7: Estrutura química da (+) catequina.
Figura 8: Mecanismos de penetração de ativos pelo estrato córneo
Figura 9: Célula de difusão de Franz tipo modificada
Figura 10: Esquema da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à
radiação UVB
Figura 11: Perfil cromatográfico do extrato e da fração das folhas de BC 44
Figura 12: Estrutura química básica dos flavonóis
Figura 13: Porcentagens de inibição da quimioluminescência calculadas para a fração
de média polaridade e para as formulações gel e emulgel submetidas ao teste de
estabilidade preliminar
Figura 14: Porcentagem de inibição da quimioluminescência dos componentes da
fração que penetraram na epiderme/derme da pele de orelha de porco
Figura 15: Porcentagem de inibição da quimioluminescência dos componentes da
fração e da CAT que penetraram na epiderme/derme da pele de camundongos sem pelo
64
Figura 16: Percentual de viabilidade dos queratinócitos tratados com concentrações
crescentes da fração de BC
Figura 17: Percentual da viabilidade celular dos queratinócitos da linhagem HaCaT
submetidos à crescentes doses de radiação UVB
Figura 18: Porcentagem de viabilidade celular dos queratinócitos da linhagem HaCaT
pré-tratados com soluções da fração de BC em diferentes concentrações sub-tóxicas e
submetidos à radiação UVB na presença dos compostos fenólicos
Figura 19: Porcentagem de MDA gerada em queratinócitos da linhagem HaCaT
expostos à radiação UVB na presença dos compostos antioxidantes

Figura 20: Medida das quantidades de IL-1β, IL-6 e NF-kB/65 em cultura de
queratinócitos expostos à radiação UVB tratados ou não com os compostos
antioxidantes
Figura 21: Interconversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada
(GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx), glutationa oxidase (GO) e
glutationa redutase (GR)
Figura 22: Medida da recuperação dos níveis de GSH depletados pela radiação UVB na
pele de camundongos sem pelos tratados com as formulações gel adicionadas da fração
de BC ou da CAT
Figura 23. Medida da atividade da MPO na pele dos camundongos sem pelos tratados
ou não com as formulações gel adicionadas da fração de BC ou da CAT 86
Figura 24: Medida das quantidades das citocinas IL-1β, IL-6 na pele dos camundongos
sem pelos tratados ou não com as formulações gel adicionadas da fração de BC ou da
CAT
Figura 25: Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina e
avaliação da eficácia in vivo pela medida da atividade da MPP-990

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente utilizado na eluição dos compostos do extrato e da fração de BC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
Tabela 2: Composição das formulações. 26
Tabela 3: Composição do tampão Hank's, pH 7,2
Tabela 4: Composição do tampão de lise. 35
Tabela 5: Equação da regressão linear, valores do coeficiente de determinação (R ²) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (%) obtidos para os padrões CAT, EC, EGCG e QG
Tabela 6: Precisão do método analítico cromatográfico para a quantificação dos compostos fenólicos CAT, EC, EGCG e QG presentes no extrato e na fração de BC, por CLAE
Tabela 7: Quantidades de polifenóis e flavonóis totais presentes no extrato e na fração de BC
Tabela 8: Valores de IC ₅₀ de inibição da luz emitida no sistema xantina/XOD/luminol encontrado para o extrato, fração de BC e para os compostos identificados por CLAE: AG, CAT, EC, EGCG e QG
Tabela 9: Dados de recuperação e porcentagem de inibição da quimioluminescência obtidas para a fração de BC (controle 100%) e para as amostras de epiderme/derme adicionadas da fração de BC e extraídas com os solventes extratores metanol 25%, 50% e 80%.
Tabela 10: Dados de recuperação e medidas da porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a fração (controle), para a pele sem adição da fração (branco) e para as amostras de epiderme/derme adicionadas de 200, 50 e 20 μg da fração de BC
Tabela 11: Quantidades determinadas por CLAE de compostos fenólicos identificados na fração de BC que penetraram na epiderme/derme da pele de orelha de porco 62
Tabela 12 : Quantidades determinadas por CLAE dos compostos fenólicos identificados na fração de BC que penetraram na epiderme/derme da pele de camundongo sem pelo tratada

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG Ácido gálico

ANOVA Análise de Variância
AP-1 Proteína ativadora-1
BC Byrsonima crassifolia

CaCl₂ Cloreto de cálcio

CAT (+) Catequina

CEUA Comissão de Ética na Utilização de Animais

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CNI Controle não irradiado

CI Controle irradiado
CO₂ Dióxido de carbono

CV Coeficiente de variação

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucleico

DPPH• Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

EAG Equivalente de ácido gálico

EC (-) Epicatequina

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid

EGCG (-) Epigalocatequina -3-galato

EGTA Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EQ Equivalente de quercetina

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

FDA Food and Drug Administration

FPS Fator de Proteção Solar

GSH Glutationa reduzida

GR Glutationa-redutase

GSSG Glutationa oxidada

GPx Glutationa peroxidase

H• Hidrogênio radicalar

HClO Ácido hipocloroso

HTAB Hexadecyltrimethylammonium Bromide

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ Ácido fosfórico

IBC Irradiado tratado com a formulação contendo fração de BC

ICAT Irradiado tratado com a formulação contendo a catequina

IC₅₀ Concentração que inibe 50%

ICH International Conference on Harmonisation

IL Interleucina

IκB Proteína inibitória kappa B

IKK Complexo IkB quinase

JNK Quinase c –Jun amino-terminal

IP Irradiado tratado com a formulação placebo

IV Infravermelho

J/cm² Joules por centímetro quadrado

KCl Cloreto de potássio

K₂HPO₄ Fosfato de Potássio dibásico

MDA Malondialdeído

MMP Metaloproteinase da matriz

MPO Mieloperoxidase

MS Mass Spectroscopic

NaCl Cloreto de Sódio

Na₂CO₃ Carbonato de Sódio

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NaH₂PO₄ Fosfato de Sódio monobásico

NaOH Hidróxido de sódio

NBC Não irradiado tratado com a formulação contendo a fração de BC

NIP Não irradiado tratado com a formulação placebo

NF-kβ Factor Nuclear *kappa Beta*

QG Quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo

O₂ Oxigênio singlete

OH⁻ Radical hidroxila

O2- Superóxido

OPT o-Ftalaldeído

PBS Phosphate-Buffered Saline

PMN Polimorfonucleares

PMSF Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

pH Potencial hidrogeniônico

R Coeficiente de correlação linear

RMN¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RO° Alcoxila ROO° Peroxila

ROOH Hidroperóxidos

RUV Radiação ultravioleta

SBF Soro bovino fetal

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de

sódio

SOD Superóxido dismutase
TBA Ácido tiobarbitúrico

TEMED Tetrametiletilenodiamina

TNF-α Tumor Necrosis Factor alpha

Tris-HCl Tris-ácido clorídrico
UV A/B/C Ultravioleta A/B/C

VN Vermelho Neutro
v/v Volume/volume
XOD Xantina oxidase

SUMÁRIO

R	lesumo.	i
A	bstract	ii
L	ista de	figurasiii
L	ista de	tabelasv
L	ista de	abreviatura e siglasvi
1	INT	RODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA1
	1.1	Características da Pele
	1.2	A radiação ultravioleta e os danos causados à pele
	1.3 catequi	Compostos fenólicos extraídos das folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> e a (+) ina como agentes fotoquimioprotetores
	1.4	Estudo de penetração cutânea
2	OBJ	ETIVOS
	2.1	Objetivo geral
	2.2	Objetivos específicos
3	MA	FERIAIS E MÉTODOS 19
	3.1	Obtenção do extrato e da fração de <i>Byrsonima crassifolia</i>
	3.2 folhas	Caracterização físico-química e funcional do extrato e da fração obtidos das de <i>Byrsonima crassifolia</i>
	3.3 adicion	Preparo e estudo de estabilidade preliminar de formulações tópicas nadas da fração de média polaridade de BC
	3.4 às form	Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i> dos componentes da fração incorporada nulações gel e emulgel
	3.5 de BC	Estudo de penetração cutânea <i>in vivo</i> da formulação gel adicionada da fração ou da CAT
	3.6 formul	Avaliação da fotoestabilidade da fração de BC em propilenoglicol 50% e da ação gel adicionada da fração
	3.7	Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vitro da fração de BC e CAT. 32
	3.8 CAT a	Avaliação do potencial fotoquimioprotetor <i>in vivo</i> da fração de BC ou da dicionados à formulação gel
	3.9	Análise estatística dos resultados
4	RES	SULTADOS E DISCUSSÃO41
	4.1 folhas	Caracterização físico-química e funcional do extrato e da fração obtidos das de <i>Byrsonima crassifolia</i>

7	ANEXO 11	8
6	REFERÊNCIAS9	8
5	CONCLUSÕES9	5
	4.6 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor <i>in vivo</i> da fração de BC ou o CAT adicionados à formulação gel	
	4.5 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor <i>in vitro</i> da fração de BC e da CA em cultura de queratinócitos humanos	
	4.4 Fotoestabilidade da fração de BC em propilenoglicol 50% e da formulação go adicionada da fração	
	4.3 Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos componentes da fração incorporada às formulações tópicas	
	4.2 Preparação e estudo de estabilidade preliminar de formulações tópica adicionadas da fração de média polaridade de BC	

Introdução e Revisão da Literatura 1

1.1 Características da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e dispõe de uma área superficial de aproximadamente 1,5 - 2,0 m², atuando como uma barreira eficaz contra os efeitos nocivos de agentes ambientais e regulando a perda de água, além de proteger os órgãos internos do corpo. Anatomicamente, a pele humana é composta por três camadas: uma camada superior, a epiderme, uma intermediária, a derme e uma mais profunda, a hipoderme, como mostra a figura 1(Nichols e Katiyar, 2010; Wertz, 2013; Natarajan et al., 2014).

A epiderme consiste de um epitélio estratificado, queratinizado e escamoso, no qual 80% das células são queratinócitos, principais células responsáveis pela produção de citocinas epidérmicas (Grone, 2002). Outros tipos de células incluem melanócitos (síntese do pigmento), células de Langerhans (função imunológica) e células de Merkel (função de receptor). A epiderme humana é constituída por cinco camadas distintas sendo elas, da mais interna para a mais externa (Svobodova e Vostalova, 2010) (figura 1):

- Camada basal da epiderme é a camada mais interna e é responsável pela renovação contínua da epiderme, sendo formada por células jovens que separam a epiderme da derme. Após as células basais sofrerem mitose, novos queratinócitos são gerados, os quais migram para cima empurrando as células existentes para a superfície externa;
- Camada espinhosa é formada por células que apresentam projeções citoplasmáticas (desmossomos e filamentos de queratina) e ancoram as células umas às outras, dando resistência ao atrito:
- Camada **granulosa** é composta por células poligonais achatadas e têm grânulos de querato-hialina em seu citoplasma, que são precursores da queratina do estrato córneo;
- Camada lúcida é mais evidente na pele espessa (palma das mãos e planta dos pés) e é constituída por uma delgada camada de células achatadas e translúcidas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e desapareceram.
- Camada córnea ou estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, funciona como barreira física e química, sendo composta de células queratinizadas mortas desprovidas de núcleos. Estas células são chamadas de corneócitos e são o produto final dos queratinócitos. Dentro dos corneócitos são encontradas substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular como aminoácidos, açúcares e queratina, que fornecem resistência a estas células. Cada corneócito do estrato córneo é envolto por um envelope protéico e entre eles está presente a maioria do material lipídico na forma de lipídeos neutros. As células queratinizadas são embebidas em uma matriz lipídica organizada em bicamadas ricas em ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres.

A derme é um tecido conjuntivo denso que apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. A derme e epiderme são interligadas por papilas dérmicas e epidérmicas, compostas principalmente por fibras de colágeno e elastina, que conferem elasticidade à pele. As principais células da derme são os fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, adipócitos e células plasmáticas. O tecido está entrelaçado com fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos que alimentam a epiderme. Os fibroblastos são células fusiformes ou estreladas que sintetizam as fibras dérmicas. As fibras dérmicas conferem resistência mecânica à pele, e são constituídas, em sua maioria por colágeno intersticial, principalmente de tipos I e III, porém outros tipos de colágenos são encontrados na derme como os colágenos do tipo IV e VII (Kanitakis, 2002). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como reserva energética, proteção contra choques mecânicos e isolamento térmico (Junqueira e Carneiro, 2004).

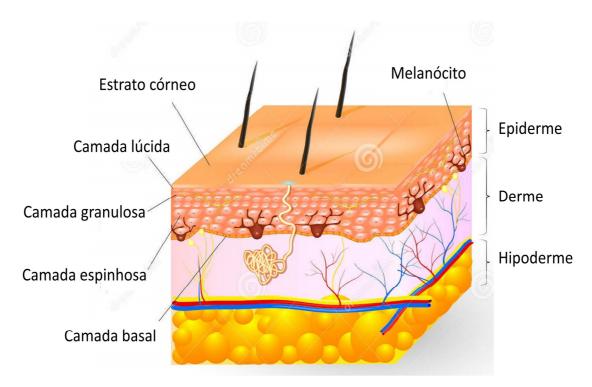


Figura 1: Camadas da pele humana: epiderme (estrato córneo, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal), derme e hipoderme. Adaptado de imagem disponível em http://www.skin-remedies.com/skin.html. Acesso em Janeiro de 2015.

A pele apresenta interações celulares e moleculares reguladas, que governam de modo preciso muitas das agressões provindas do meio ambiente. Ela oferece um sistema de defesa antioxidante endógeno, constituído por antioxidantes não enzimáticos e os enzimáticos. O grupo dos antioxidantes não enzimáticos inclui os carotenóides, a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (α-tocoferol), ubiquinol-10 (coenzima Q10) e outras substâncias como cisteína, ácido úrico e glutationa reduzida (GSH), além de substâncias quelantes de íons metálicos. Os antioxidantes enzimáticos incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), mieloperoxidase (MPO), a glutationa redutase e a glutationa peroxidase que detoxificam os radicais peróxidos, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Entre estas enzimas, a SOD e a CAT são as principais enzimas antioxidantes que protegem a epiderme. A SOD converte ânions superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), enquanto a CAT degrada H₂O₂ em água e oxigênio (Shindo, Witt e Packer, 1993; Sander et al., 2002; F'guyer, Afaq e Mukhtar, 2003; Sander et al., 2004; Peres et al., 2011).

Estes sistemas de defesa antioxidante estão em maior concentração na epiderme, indicando ser esta mais susceptível do que a derme ao estresse oxidativo (Shindo et al., 1994). Desta forma, torna-se relevante a utilização de células presentes na epiderme, como queratinócitos, para estudos que objetivam avaliar o estresse oxidativo na pele.

A radiação ultravioleta e os danos causados à pele

O sol emite principalmente luz visível e radiação infravermelha, mas também emite radiação ultravioleta (UV), a qual será o foco do presente trabalho. A exposição excessiva à radiação UV é capaz de limitar a capacidade natural dos sistemas de defesa da pele, propiciando a iniciação de várias perturbações à pele, tais como fotoenvelhecimento, imunossupressão sistêmica, inflamação aguda e em última fase o câncer de pele. A radiação UV é dividida em três faixas dependendo do comprimento de onda: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm), e UVA (320-400 nm) (Mukhtar e Elmets, 1996; Xu e Fisher, 2005; Guaratini, Medeiros e Colepicolo, 2007)

A forma de radiação ultravioleta mais energética é a UVC, que não chega à superfície terrestre, pois é absorvida pela camada de ozônio. A radiação UVB representa 5% da radiação ultravioleta que alcança a superfície terrestre e a radiação UVA 95% (Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006). A radiação UVB é o componente mais prejudicial da radiação solar que atinge a superfície da terra, pois é capaz de induzir uma série de danos à pele humana, sendo menos penetrante e mais genotóxica e mutagênica do que a radiação UVA e atuando principalmente na camada epidérmica da pele. Embora a radiação UVA seja menos energética, é a que mais atinge a Terra e possui o maior potencial penetrante, sendo que o seu principal modo de ação se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs); por outro lado, a radiação UVA estimula a formação da melanina e protege a pele de queimaduras imediatas (figura 2) (Abu Zaid et al., 2007; Maverakis et al., 2010).

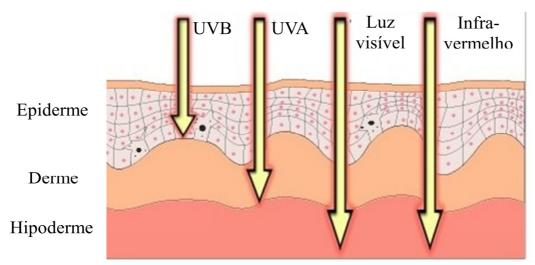


Figura 2: Capacidade de penetração da radiação solar na pele humana em função do comprimento onda. Adaptado de:. Acesso em: janeiro de 2015.

O efeito mais específico da exposição da pele humana à radiação UVB é representado por danos no DNA, devido à interação da radiação com as bases heterocíclicas, o que induz a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e fotoprodutos pirimidina-pirimidona (6-4). Os danos são causados pela ligação errônea de duas pirimidinas na mesma fita de DNA. Em vez de ocorrer o pareamento clássico (Adenina-Timina) AT ou GC (Guanina-Citosina), as bases podem ligar-se por meio de CC, TT ou CT (Heck et al., 2004; Cadet, Sage e Douki, 2005).

Para manter a integridade das células após danos no DNA várias respostas celulares são induzidas, como a ativação transcricional do gene p53, que desempenha papel direto no reparo do DNA ou indução da apoptose (Levine, 1997; Smith e Fornace, 1997; Kamijo et al., 1998; Lu et al., 1999). A proteína p53 é ativada por fosforilação devido ao aumento da transcrição do gene supressor de tumor p53 (Matsumura e Ananthaswamy, 2004). Desta forma, o aumento do nível da proteína p53 após o dano ao DNA está associada com um aumento da apoptose. Assim, mutações neste gene, o insucesso no reparo dos danos ao DNA ou a falha no processo de morte celular programada perpetua e amplifica as mutações nas células epidérmicas o que pode levar ao processo de carcinogênese na pele (Zambetti e Levine, 1993; White, 1996; Claerhout et al., 2006).

Há fortes evidências de que a radiação UVB seja o principal fator de risco ambiental que proporciona o desenvolvimento de carcinoma basocelular e carcinoma celular escamoso (cânceres do tipo não melanoma). Já o desenvolvimento de melanoma cutâneo maligno é causado pela ação conjunta das radiações UVB e UVA e está diretamente relacionado à indução de danos oxidativos na pele provocado pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Wittgen e Van Kempen, 2007).

Para manifestar seus efeitos nas células, a radiação UV é absorvida por cromóforos celulares, como os aminoácidos aromáticos, principalmente triptofano e tirosina, proteínas, DNA, RNA, lipídios e melanina, que são capazes de absorver essa energia e convertê-la em energia química. Esses cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs. As EROs podem ser de dois tipos: radicais livres (radicais hidroxila, peroxila e alcoxila, o ânion superóxido) e aquelas que não são radicais livres, mas são moléculas de oxigênio reativas capazes de iniciar reações oxidativas e gerar espécies de radicais livres em organismos vivos (oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, peróxido nitrito, ácido hipocloroso) (Pinnell, 2003; Cadet, Sage e Douki, 2005; Xu e Fisher, 2005; Verschooten et al., 2006; Guaratini, Medeiros e Colepicolo, 2007; Shah e Rawal Mahajan, 2013).

As EROs interagem facilmente com as células do tecido humano e possuem grande potencial destrutivo. O oxigênio molecular (O2) tem sua reatividade aumentada através da adição de um elétron ou por meio da transferência de energia, sendo por sua vez, convertido em oxigênio singlete (¹O₂) ou ânion superóxido (O₂[•]) (figura 3). O O₂[•] é extremamente instável e pode ser ainda convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espontaneamente ou enzimaticamente pela superóxido dismutase (SOD). Além disso, o O2° gera alguns produtos tóxicos e muito reativos, como o ácido hipocloroso e o peroxinitrito (Scandalios, 1993; Valko et al., 2007; Chen, Hu e Wang, 2012).

O H₂O₂ é mais estável do que o O₂ e pode permear através das membranas lipídicas celulares. Adicionalmente, o H₂O₂ também pode ser convertido no radical hidroxila (•OH) na presença do íon ferro (Fe²⁺) ou cobre (Cu²⁺) através da reação de Fenton (Fe²⁺+ H₂O₂-> Fe³⁺+OH+íon hidroxil) (Chen, Hu e Wang, 2012). Os íons metálicos de transição, ferro e cobre, também catalisam a reação entre O2 e H2O2, gerando OH (reação de Haber-Weiss) (Dizdaroglu e Jaruga, 2012).

O H₂O₂ pode ser eliminado pela ação da glutationa peroxidase presente no citosol, na mitocôndria ou no meio extracelular, e sua ação é converter o H2O2 em H2O e os hidroperóxidos lipídicos oriundos das membranas em álcoois estáveis. Essa enzima catalisa a reação de oxidação da glutationa reduzida (GSH) para a sua forma oxidada (GSSG) através da doação de elétrons. A GSH poderá ser regenerada com o auxílio da glutationa redutase (GR), com transferência do hidrogênio da nicotinamida adenina nucleotídeo reduzido (NADPH).

Outra via de neutralização do H₂O₂ seria sua conversão em ácido hipocloroso (HClO) pela enzima mieloperoxidase (MPO), uma heme peroxidase abundantemente encontrada nos lisossomos dos neutrófilos (Comhair e Erzurum, 2005; Day, 2009; Dickinson e Chang, 2011).

O radical 'OH é uma das EROs mais instáveis que existe no sistema biológico, pois é capaz de reagir com diversas biomoléculas capazes de ceder elétrons, como DNA, enzimas, proteínas e aminoácidos. Esse radical também pode reagir com fosfolipídeos de membrana, promovendo a sua desorganização, formando radicais alcoxila (LO*), radicais peroxila (LOO*) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), precursores da peroxidação lipídica (Valko et al., 2007; Chen, Hu e Wang, 2012). Um resumo da reação em cadeia da geração de EROs está apresentado na figura 3.

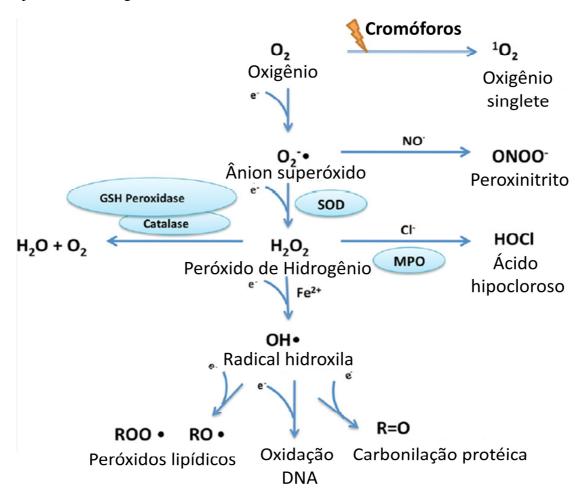


Figura 3: Reação em cadeia da geração de Espécies Reativas de Oxigênio. Adaptado por Chen, Hu e Wang (2012).

A superprodução de EROs sobrecarrega a capacidade de defesa do sistema antioxidante endógeno, levando ao estresse oxidativo e fotolesões em macromoléculas da pele, tais como proteínas e lipídeos. Sob circunstâncias que promovem o estresse oxidativo, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, alterando a homeostasia cutânea (Sierens et al., 2001). Assim, ocorre uma série de efeitos prejudiciais às células da pele humana. A figura 4 mostra o esquema simplificado das alterações bioquímicas e vias de sinalização envolvidas na pele após exposição à radiação UV.

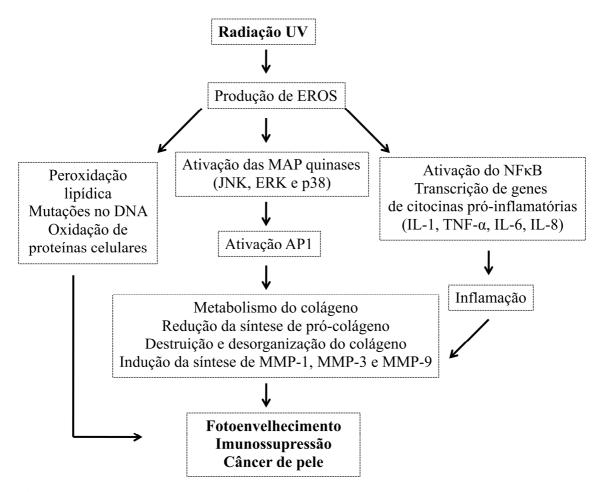


Figura 4: Esquema simplificado das alterações bioquímicas e vias de sinalização envolvidas na pele após exposição à radiação UV. Adaptado por Zouboulis e Makrantonaki (2011) e Chen, Hu e Wang (2012).

O excesso de EROs podem desencadear uma incontrolável reação em cadeia de peroxidação lipídica (LPO), um processo prejudicial consequente da exposição a radiação UV e que gera produtos pro-inflamatórios (Girotti et al., 2000). A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, conduzindo a uma desorganização da membrana celular e liberação de fosfolipídios. Estes fosfolipídios quando associados ao aumento de atividade da fosfolipase A₂ e da ciclooxigenase-2 (COX-2), superexpressas devido à radiação UV, resultam em elevados níveis de produção de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂), que induzem inflamação na pele. As alterações nas membranas desenvolvem transtornos na permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na

perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, além de promover alterações no DNA, oxidação da LDL (colesterol de baixa densidade) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (Halliday, 2005; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Zhou et al., 2012).

O processo inflamatório resultante da radiação UV sobre a pele induz alterações que incluem eritema, infiltrado de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos e alterações na produção de citocinas a partir de queratinócitos e melanócitos na epiderme e de fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e outras células inflamatórias presentes na derme (Kondo, 2000; Coussens e Werb, 2001; Sander et al., 2004).

A liberação da citocina inflamatória interleucina (IL) -1 ocorre a partir do estrato córneo e por conseguinte iniciam-se as reações inflamatórias nas diferentes camadas da pele (Kupper e Groves, 1995; Wood et al., 1996). Além disso, a radiação UV estimula a síntese e liberação do fator de necrose tumoral- α (TNF-α) de queratinócitos para a corrente sanguínea, sugerindo que citocinas derivadas de células epidérmicas podem mediar reações inflamatórias sistêmicas. A ativação da síntese do TNF-α se dá parcialmente pela IL-1 e parcialmente pelas EROs. Estas duas citocinas "primárias" IL-1 e TNF-α auto-induzem sua produção pelos queratinócitos e estimulam a produção de outra citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, que por sua vez elevam a produção de EROS e aumentam o estresse oxidativo, que se permanecer não reparado pode iniciar a fotocarcinogênese (Kock et al., 1990; Corsini et al., 1995; Pillai, Oresajo e Hayward, 2005; Thomas-Ahner et al., 2007; Poquet, Clifford e Williamson, 2008; Sivamani e Maibach, 2009).

As citocinas atuam principalmente através de duas vias: por estimulação dos níveis do fator nuclear - kappa B (NF-kB) no citoplasma (Adhami, Afaq e Ahmad, 2003; Tanaka et al., 2005; 2007) ou por estimulação dos níveis das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) na célula (Mittelstadt *et al.*, 2005).

O NF-kB é um complexo de proteínas que controla a transcrição do DNA, que normalmente é retido no citoplasma como um complexo inativo ligado a uma molécula inibidora, denominada IkB. Com a exposição da pele aos raios UV, há a secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF-α, os quais atuam como estimuladores e promovem a degradação do complexo NF-kB/IkB. Então o NF-kB é translocado para o núcleo, acarretando a ativação de genes envolvidos na produção de substâncias próinflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF-α) e levando à formação de metaloproteinases (Bond, Baker e Newby, 1999; Sun, Malacinski e Yokota, 2002; Chung, 2003; Shah e Rawal Mahajan, 2013).

As MAP quinases são mediadores na transdução do sinal da superfície celular para o núcleo e são de grande importância no processo de ativação e controle da expressão gênica (Fisher et al., 1998). A família das MAP quinases é composta por três membros: proteínas quinases ativadas por estresse (quinase c- Jun N-terminal (JNK) e quinase p38) e a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK). A ERK é ativada em resposta a fatores de crescimento e estimula a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular tendo papel importante também na promoção de tumores, principalmente estimulados pelo estado oxidativo (Kallunki et al., 1994). A JNK e p38 são principalmente ativadas por estressores ambientais como a exposição RUV, citocinas inflamatórias, choque térmico e agentes causadores de danos de DNA. A fosforilação destas proteínas tem papel importante na diferenciação celular e resposta inflamatória. O balanço dinâmico na ativação das diversas vias das MAP quinases é importante para sobrevivência celular, de modo que estas atuam nas células controlando a resposta aos diversos sinais do meio (Chung, 2003; Melnikova e Ananthaswamy, 2005; Mantena e Katiyar, 2006).

A ativação da família das MAP quinases resulta no aumento da expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana, que juntamente com o fator de transcrição constitutivamente expresso, c-Fos, formam o complexo AP-1, um fator de transcrição altamente ativo. A atividade aumentada de AP-1 é necessária para a indução de membros chave da família das metaloproteinases (MMPs), as quais são responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas na pele (Kim, Lee, et al., 2005; Xu e Fisher, 2005).

A radiação UV induz aumento da atividade enzimática de pelo menos três MMPs. São elas: MMP-1, que degrada fibras de colágeno tipo I e III; MMP-3 (estromelisina-1) que degrada colágeno tipo IV; e MMP-9 (gelatinase-B) que degrada fragmentos de colágeno gerados por MMP-1. Juntas, estas MMPs têm a capacidade de degradar a maior parte das proteínas estruturais que compõe o tecido conjuntivo dérmico (Fisher et al., 2001; Xu e Fisher, 2005).

Os fibroblastos estão presentes na derme e são responsáveis principalmente pela produção de fibras de colágeno tipo I e III, as quais fornecem força e resistência à pele. O colágeno tipo I é o mais abundante na pele, produzido a partir do pró-colágeno tipo I. Um dos principais danos causados pela exposição à radiação UVB é a degradação das fibras elásticas, do colágeno e das glicosaminoglicanas da matriz extracelular da derme, o que acarreta a perda de elasticidade e contribui para a formação de rugas e fotoenvelhecimento da pele (Shah e Rawal Mahajan, 2013).

1.3 Compostos fenólicos extraídos das folhas de Byrsonima crassifolia e a (+) catequina como agentes fotoquimioprotetores

Para limitar os danos induzidos pela radiação UV é recomendado o uso de protetor solar com um fator de proteção solar igual ou superior a 15. No entanto, o aumento do uso de protetores solar tem coincidido com o aumento do câncer de pele, estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostram que quando os filtros solares benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila penetram na epiderme viável da pele, o nível de EROs aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob irradiação.

Assim, a fotoquimioproteção tem sido apreciada como uma maneira viável em reduzir a ocorrência de uma variedade de desordens de pele. A ação dos agentes fotoquimioprotetores pode ser alcançada tanto pela prevenção, quanto pela correção dos danos que a radiação UV (principalmente UVB) causa na pele, devido a diversos fatores como resumidos na figura 5 (F'guyer, Afaq e Mukhtar, 2003; Afaq, Adhami e Mukhtar, 2005).

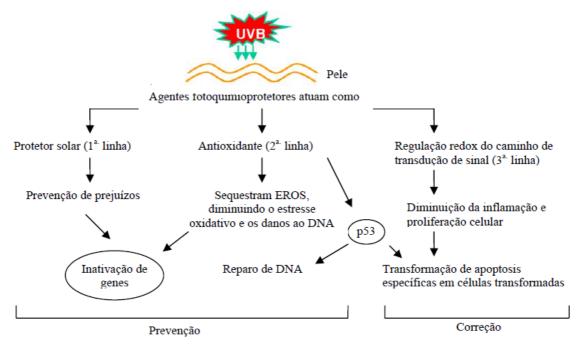


Figura 5: Ação dos agentes fotoquimioprotetores na pele. Adaptado por Afaq, Adhami e Mukhtar (2005).

Os compostos antioxidantes são considerados substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas por inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia ocasionada pelas EROs (Al-Mamary, Al-Meeri

e Al-Habori, 2002; Moreira et al., 2002; Chanwitheesuk, Teerawutgulrag e Rakariyatham, 2005; Wu et al., 2005; Lima et al., 2006). Uma ampla variedade de estudos tem mostrado que compostos antioxidantes naturais como o licopeno, carotenóides, catequinas do chá verde (epigalocatequina galato), vitamina E, vitamina A e quercetina poderiam ser usados em produtos tópicos para o tratamento ou prevenção dos efeitos causados pela radiação UV (Casagrande et al., 2006; Wright, Spencer e Flowers, 2006; Di Mambro e Fonseca, 2007; Filip et al., 2011).

Há, portanto, um crescente interesse pelo uso oral ou tópico de antioxidantes provenientes de fontes naturais, com propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e imunomodulatórias para prevenção dos danos induzidos pela radiação UV, incluindo câncer de pele (Baliga e Katiyar, 2006). Assim, a aplicação tópica desses agentes, sozinhos ou em formulações, representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado pela radiação UV (Guaratini, Medeiros e Colepicolo, 2007).

Sendo assim, a (+) catequina (CAT) e o extrato ou a fração de folhas de Byrsonima crassifolia (BC) podem ser considerados fortes candidatos a serem veiculados em formulações tópicas fotoquimioprotetoras para prevenção e/ou tratamento dos danos causados pela radiação UV à pele. Os efeitos benéficos do extrato e da fração de BC podem ser relacionados ao elevado conteúdo de compostos fenólicos e a CAT quanto à capacidade de sequestro de radicais livres (Morel et al., 1993; Lotito e Fraga, 1998; Nakao, Takio e Ono, 1998; Silva et al., 2007; Souza et al., 2008).

A árvore da Byrsonima crassifolia (L) H.B.K (murucizeiro) é uma espécie tropical da família das Malpighiaceae amplamente distribuída na América Central e do Sul. As folhas e cascas são utilizadas medicinalmente pelos povos nativos para tratar tosses, problemas gastrointestinais, infecções cutâneas e mordidas de cobras (Bejar e Malone, 1993; Bejar et al., 1995; MartíNez-Vázquez et al., 1999) (Figura 6).



Árvore Figura folhas de Byrsonima crassifolia. Reproduzido http://www.acguanacaste.ac.cr/loras_acg/aratinga.html e http://herbario.unellez.edu. ve/>. Acesso em: janeiro de 2015.

Estudos experimentais com folhas e casca desta espécie demonstraram efeito espasmogênico (Bejar et al., 1995), atividade antiprotozoários (Peraza-Sanchez et al., 2007) e antiinflamatória (Maldini et al., 2009). Estudos realizados por Silva et al., (2007) relatam significante capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de BC, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos, entre eles estão: ácido gálico, (+) catequina; (-) epicatequina; epigalocatequina; epigalocatequina-3-galato, quercetina-3-O-L-α-Larabinopiranosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-O-[6-galoil]galactosídeo, entre outros (Bejar e Malone, 1993; Bejar et al., 1995; Souza, 2007). Dentre os compostos identificados em extratos das folhas de BC, um dos majoritários é a (+) catequina (CAT). Assim, por este motivo, e devido à ausência de estudos deste polifenol contra os danos induzidos pela radiação UV e pelo baixo custo, a CAT foi escolhida como padrão de estudo no presente trabalho.

A CAT (figura 7) é um flavonóide da classe dos flavanóis e está presente nos chás, em sementes de frutas tais como maçã e uva, no vinho tinto e no chocolate. A CAT é um potente antioxidante que elimina de forma eficiente uma variedade de radicais livres. Estudos mostram que a CAT quela metais de transição e inibe a peroxidação lipídica. No entanto, apesar da CAT ser barata e abundante em inúmeras fontes vegetais, pouca atenção tem sido dada para avaliação da sua atividade biológica em sistemas in vitro e in vivo (Morel et al., 1993; Lotito e Fraga, 1998; Nakao, Takio e Ono, 1998; Arts, Hollman e Kromhout, 1999; Jeon et al., 2003; Wu et al., 2006).

Figura 7: Estrutura química da (+) catequina.

Estudo de penetração cutânea 1.4

A pele está envolvida em numerosos processos físicos e bioquímicos, sendo o mais importante deles a função protetora, prevenindo tanto a passagem de substâncias exógenas estranhas como a perda de líquidos do corpo (Elias, 2005; Herrling, Jung e Fuchs, 2006; Rubio et al., 2011). Para que o princípio ativo apresente potencial fotoquimioprotetor contra os danos oxidativos induzidos pela radiação UV na pele, é necessário que este seja liberado da formulação na qual foi incorporado e alcance as camadas da pele onde são geradas as EROs, modulando a função barreira da pele (Vicentini et al., 2009). Mas o que representa uma proteção ao ser humano se torna um fator limitante na ação das substâncias de atividade antioxidante e terapêutica aplicadas topicamente (Hadgraft, 2004).

A penetração de substâncias ativas na pele depende de dois passos consecutivos: a liberação desta substância pela formulação e, sua subsequente penetração cutânea. A penetração de substâncias através da pele, em condições normais pode ocorrer por três rotas possíveis (Figura 8). O primeiro e o segundo são através das rotas inter e transcelulares e o terceiro é via apêndices, folículos pilosos e ductos de glândulas (Potts e Guy, 1992; Abraham, Chadha e Mitchell, 1995). O caminho intercelular envolve a passagem somente pelos domínios lipídicos intercelulares, já o caminho transcelular, o princípio ativo atravessa as células e os espaços intercelulares (Illel, 1997; Moser et al., 2001).

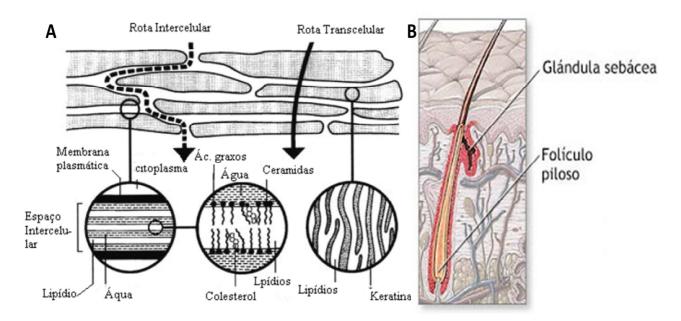


Figura 8: Mecanismos de penetração de ativos pelo estrato córneo. (A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular), Reproduzido de Moser et al. (2001) e (B) através dos apêndices cutâneos, reproduzido de:http://draangelicapimenta.blogspot.co m.br/2010 11 01 archive.html>. Acesso em: Janeiro de 2015.

A penetração de substâncias através da pele, em condições normais, ocorre principalmente através dos espaços intercelulares (Hadgraft, 2004). O espaço intercelular possui lipídios estruturados e a molécula em difusão tem que passar por uma variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos antes de atingir a junção entre o estrato córneo e a epiderme viável (Abraham, Chadha e Mitchell, 1995; Hadgraft, 2004).

No que diz respeito às propriedades de absorção e penetração cutânea das substâncias na pele, metodologias in vitro e in vivo são adequadas. Normalmente são realizados estudos utilizando pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia ou pele de orelha de porco, que é considerado o melhor modelo de pele, pois além de possuir maior disponibilidade, possui propriedades histológicas e fisiológicas similares a da pele humana (Pagliara et al., 1999).

A capacidade de uma molécula penetrar o estrato córneo depende de muitos parâmetros físicos-químicos, tais como peso molecular, lipofilicidade, polaridade, capacidade para formar ligações de hidrogênio, solubilidade, e para ácidos ou bases, o valor de pKa (Potts, 1997). De acordo com a primeira Lei de Fick, o fluxo máximo de penetração através da pele, o qual pode ser alcançado após a aplicação de um veículo saturado, é basicamente determinado por quatro fatores: a difusão no estrato córneo, a espessura do estrato córneo, a lipofilicidade da substância em termos de coeficiente de partição entre a pele e o veículo e a solubilidade do princípio ativo no veículo (Varvaresou, 2006).

Para determinar as quantidades de substâncias capazes de penetrar na pele é utilizado o método de difusão em células de Franz, que é constituído por dois compartimentos separados por um disco de pele humana ou de porco. O compartimento inferior é constituído de um fluido receptor que simula a circulação sanguínea. A substância teste é colocada sobre o disco de pele e a quantidade retida é medida pela análise das camadas da pele trituradas (Varvaresou, 2006).

Para realização dos estudos de penetração cutânea de uma formulação, a(s) substância(s) ativa(s) é/são quantificada(s) por metodologia analítica. Normalmente a quantidade de substância ativa detectada é muito pequena e desta forma somente métodos analíticos muito sensíveis como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são utilizados. Sabe-se que extratos vegetais são amostras complexas formadas por vários constituintes, então a atividade esperada pode ser devido à ação sinérgica de vários compostos que estão presentes no extrato ou fração. Assim, uma alternativa para poder avaliar a real atividade desempenhada pelo extrato seria determinar a atividade antioxidante na pele triturada e extraída após o estudo de penetração cutânea. Desta forma, a determinação da atividade antioxidante é uma alternativa que representa de forma adequada a penetração cutânea do extrato ou da fração de BC incorporados em formulações tópicas fotoquimioprotetoras.

Além de penetrar na epiderme/derme, agentes fotoquimioprotetores devem ser fotoestáveis, uma vez que a degradação de compostos induzida pela luz pode resultar em uma diminuição da eficiência e também em efeito adverso após a administração pela geração de metabólitos indesejáveis (Vicentini et al., 2007). Estes metabólitos podem causar reações alérgicas, uma vez que eles podem interagir com adjuvantes da formulação ou componentes da pele, como o sebo, podendo levar à formação de moléculas com propriedades tóxicas (Gaspar e Maia Campos, 2006).

Assim, em colaboração com a empresa Amazon Dreams S.A. (localizada em Belém do Pará e incubada na UFPA), que gentilmente cedeu o extrato e a fração de média polaridade de Byrsonima crassifolia, este trabalho avaliou o potencial fotoquimioprotetor in vitro e in vivo da fração de BC e da CAT, com o objetivo de preparar formulações adicionadas destes ativos, que sejam estáveis física e quimicamente e que promovam uma maior penetração de compostos antioxidantes na pele. É importante ressaltar que extrato e/ou fração de BC nunca haviam sido incorporados em formulações tópicas, nem tão pouco

Introdução e Revisão da Literatura 17

haviam estudos direcionados para avaliar o potencial fotoquimioprotetor, o que ressalta a importância científica do trabalho realizado.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial fotoquimioprotetor da fração de *Byrsonima crassifolia* e do padrão (+) catequina em cultura de queratinócitos humanos frente à radiação UVB. Objetivou-se também investigar a eficácia fotoquimioproterora da fração e do padrão adicionados a uma formulação tópica em camundongos sem pelos submetidos à radiação UVB.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o extrato e a fração de BC físico-quimicamente e funcionalmente;
- Preparar e avaliar a estabilidade preliminar de formulações tópicas contendo a fração de média polaridade de BC;
- Avaliar a penetração in vitro das formulações adicionadas da fração de BC;
- Avaliar a penetração in vivo da fração de BC e da CAT incorporadas na formulação que promoveu maior penetração dos compostos no estudo de penetração in vitro;
- Avaliar a fotoestabilidade da fração de BC em propilenoglicol 50% ou incorporada na formulação gel;
- Avaliar o potencial fotoquimioprotetor in vitro da fração de BC e da CAT em cultura de células de queratinócitos humanos;
- Avaliar o potencial fotoquimioprotetor in vivo da fração de BC e da CAT adicionados à formulação gel em camundongos sem pelos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção do extrato e da fração de Byrsonima crassifolia

3.1.1 Identificação e coleta das matrizes

O extrato etanólico de *Byrsonima crassifolia* (BC) e sua fração enriquecida em compostos de média polaridade foram gentilmente cedidos pela empresa Amazon Dreams S.A., localizada em Belém –PA, incubada na Universidade Federal do Pará.

Folhas de plantas adultas de BC foram colhidas em Igarapé- Açú (Pará, Brasil) e identificadas de acordo com sua exsicata por um profissional qualificado do Museu Emílio Golgi, fiel depositor para estes vegetais (MG 130939).

3.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato e da fração

Este processo foi patenteado em regime de 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) e não pode, por motivos de propriedade intelectual, ser detalhado além daquilo que nos foi repassado.

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 forçado a 60 °C por 8 horas. Posteriormente foram 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 a temperatura de 4°C por uma noite (Silva, Rogez e 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, onde foi separada a borra e minimizados alguns compostos indesejáveis como açúcar, gordura, terpenos e pigmentos. O filtrado foi encaminhado para um concentrador a vácuo (o qual funciona exatamente nas mesmas condições que um rotavapor), 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) e adsorvendo o extrato aquoso em condições específicas de vazão e temperatura, e desorvendo o extrato com bioetanol e concentrando novamente o dessorbato sob vácuo em concentrador industrial.

Por fim, foi feito 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), utilizando soluções hidroalcoólicas de 0, 32, 64 e 96° GL. A fração de interesse para este estudo compreende os dessorbatos obtidos após eluições nas concentrações de 32 a 64°GL, na qual estariam presentes os compostos fenólicos de polaridade intermediária. O solvente da fração foi evaporado no concentrado industrial.

O extrato hidroalcoólico purificado e a fração intermediária foram finalmente congelados a -40°C por uma noite e liofilizados por 48 horas em liofilizador semi-industrial até secura quase completa e acondicionamento 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-USP.

3.2 Caracterização físico-química e funcional do extrato e da fração obtidos das folhas de *Byrsonima crassifolia*

3.2.1 Análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato e da fração de BC

O extrato e a fração de média polaridade de BC foram analisados por CLAE. Para análise cromatográfica utilizou-se o cromatógrafo a líquido Shimadzu, modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador, modelo C-R6A, onde as amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne com um loop de 20 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. A separação cromatográfica foi feita através de eluição por gradiente (Tabela 1) em coluna C18 Hypersil GOLD (3µm), 4,6 x 250 mm acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel constituiu-se de água (A) e acetonitrila (B), ambas adicionadas de ácido fórmico 1%, a vazão utilizada foi de 1 mL/min.

Tabela 1: Gradiente utilizado na eluição dos compostos do extrato e da fração de BC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tempo (minutos)	Fase móvel B (%)
0	7
7	15
25	20
37	20
42	35
45	7
50	7

Amostras de 10 mg do extrato ou da fração de BC foram solubilizadas em 10 mL de álcool metílico 80%. Em seguida, 125 µL destas soluções foram novamente diluídas em balão

volumétrico de 1 mL com água milli Q (125 μ g/mL). Então, a última solução foi filtrada em filtro tipo milex 0,45 μ m e analisada por CLAE.

3.2.1.1 Validação do método analítico para a determinação do teor de CAT, EGCG e OG no extrato e na fração de BC

Os parâmetros avaliados foram realizados de acordo com as especificações do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL. ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

A) Linearidade

Neste ensaio observou-se o intervalo linear frente a diferentes concentrações de (+) catequina (CAT), (-) epigalocatequina-3- galato (EGCG) e quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo (QG) (Sigma[®], St Louis, MO, USA). As concentrações dos padrões seguiram uma faixa de 1 μg/mL a 20 μg/mL. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada concentração, seguindo as condições analíticas descritas no item 3.2.1.

B) Precisão

A precisão foi avaliada pela determinação do teor de CAT, EGCG e QG no extrato e na fração de BC em 5 análises, por 5 dias consecutivos, utilizando mesmo analista e mesma instrumentação. Foi avaliada a precisão interdia. Foi estabelecido o coeficiente de variação dos fatores de respostas obtidos entre as análises. Desta forma, 125 μg/mL do extrato ou da fração foram injetados em cromatógrafo líquido, seguindo as condições analíticas descritas no item 3.2.1.

3.2.2 Determinação do teor de polifenóis do extrato e da fração de BC

O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão de referência para a construção da curva analítica.

As amostras foram preparadas diluindo o extrato, a fração e o padrão de ácido gálico em solução hidroalcóolica 50%. Foram adicionados a 500 μL das amostras, 500μL do reagente Folin-Ciocalteu e 500μL da solução de Na₂CO₃ (10%). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 760nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de amostra foi substituída pela mesma quantidade de

água deionizada. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato ou fração (Kumazawa, Hamasaka e Nakayama, 2004).

3.2.3 Determinação do teor de flavonóis do extrato e da fração de BC

Para determinação do teor de flavonóis totais do extrato e da fração de BC, a quercetina foi empregada como padrão de referência para a construção da curva analítica.

As amostras foram preparadas diluindo o extrato e a fração em solução hidroalcóolica 50% e o padrão de quercetina em metanol PA. Foram adicionados a 500μL das amostras, 500μL de solução hidroalcóolica 50% (v/v) de cloreto de alumínio a 2% (p/v). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de cloreto de alumínio (2%) foi substituída pela mesma quantidade de solução hidroetanólica 50% (v/v). O conteúdo de flavonóides totais foi expresso como mg de equivalente de quercetina (EQ) por g de extrato ou fração (Kumazawa, Hamasaka e Nakayama, 2004).

3.2.4 Medida da atividade antioxidante in vitro do extrato e da fração de BC

A atividade antioxidante do extrato e da fração de BC foi avaliada por diferentes métodos que simulam a formação de diferentes EROs. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição em função da concentração de extrato ou da fração no meio reacional, sendo a porcentagem de inibição determinada pela fórmula:

% inibição =
$$\frac{\text{Resposta da amostra X 100}}{\text{Resposta do grupo controle}}$$
 - 100

Desta forma foi possível obter uma curva concentração-resposta e estimar a concentração de extrato ou fração que inibe o processo oxidativo em 50% (IC₅₀) utilizando uma curva hiperbólica. A determinação do IC₅₀ é um parâmetro muito utilizado para medir a atividade antioxidante, sendo que quanto menor o IC₅₀, maior será a atividade antioxidante (Parejo *et al.*, 2000).

3.2.4.1 Medida da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH[•]

A atividade antioxidante do extrato e da fração de BC foi avaliada pela diminuição da absorbância da solução alcoólica de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH[•]), utilizando o método descrito por Blois (1958).

Para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe do extrato e da fração a 1000 μg/mL em solução hidroalcóolica 50%. Em seguida, foram feitas diluições seriadas utilizando o tampão empregado no meio reacional. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1mL de tampão acetato de sódio (0,1M) pH 5,5, 1mL de solução hidroalcóolica (95%), 50μL de amostra e 500μL de solução alcoólica de DPPH[•] (200μM). O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1mL de tampão acetato 0,1M pH 5,5 e 1,5mL de solução hidroalcóolica. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura da absorbância em 517 nm, em espectrofotômetro (Hitaschi U2001). A variação da absorbância, proporcionada pelas amostras do extrato e da fração de BC, foi comparada à absorbância do controle positivo (apenas DPPH[•]), que corresponde à absorbância máxima (100%).

3.2.4.2 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A medida da inibição da peroxidação lipídica pelo extrato e fração de BC foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica (Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1979).

Assim, para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe do extrato e da fração a 1000 μg/mL em solução hidroalcóolica 50%, e posteriormente foram preparadas diluições subsequentes em meio reacional contendo KCl (130 mM) e Tris-HCl (10 mM), pH 7,4. Em 1mL de meio reacional contendo tampão KCl (130 mM) e Tris-HCl (10 mM) pH 7,4, foram adicionados 10 µL de citrato de sódio (200 mM), 10µL de amostra teste, suspensão de mitocôndria (1 mg de proteína) e 10 μL sulfato ferroso amoniacal (50 μM). A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos (Rodrigues et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1%) (TBA) preparado em NaOH (50 mM), 100 μL NaOH (10 M) e 500 μL de H₃PO₄ (20%) foram adicionados, seguido por incubação de 20 minutos a 85 °C (Ohkawa, Ohishi e Yagi, 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com nbutanol, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 535 nm em espectrofotômetro (Hitaschi U2001) (Buege e Aust, 1978). Concomitantemente, foram feitos o branco (ausência de mitocôndrias), o controle positivo (ausência de amostra), o controle do solvente (solução hidroalcóolica 50% com ausência de amostra) e o controle negativo (ausência de ferro). As mitocôndrias utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo (FCFRP – USP).

3.2.4.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol

A medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol foi realizada pelo método descrito por Hirayama *et al.* (1997). Para essa determinação, preparou-se uma solução-mãe de extrato, da fração e dos padrões (AG, CAT, EC, EGCG e QG) a 1000 μg/mL em solução hidroalcóolica 50%, e posteriormente foram preparadas diluições subseqüentes em solução tampão glicina (0,1 M), pH 9,4.

Em tubos próprios para luminômetro, foram pipetados 400μL de solução preparada acrescentando EDTA (1mM) ao tampão glicina (0,1M) pH 9,4. Então, foram adicionados 150μL de xantina (6mM), 10μL de amostra teste e 10μL da solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 100μL de solução recém preparada de xantina oxidase (20mUN/mL) mantida resfriada no gelo. A medida da quimioluminescência foi realizada em luminômetro Autolumat LB953 durante 5 minutos a 25°C.

Também foi realizado um experimento de forma modificada para comprovar se a enzima mantinha sua atividade inalterada na presença do extrato e da fração de BC. Assim, a alíquota de enzima foi incubada com a alíquota de extrato por 15 minutos antes de ser adicionada ao meio reacional.

Após estudo de caracterização físico-química e funcional do extrato e da fração de BC, a fração de BC foi escolhida para os futuros testes, e assim, alcançar o objetivo proposto do trabalho.

3.3 Preparo e estudo de estabilidade preliminar de formulações tópicas adicionadas da fração de média polaridade de BC

Foram desenvolvidas duas formulações de uso tópico, visando obter maior penetração dos compostos antioxidantes da fração de BC na pele. As formulações foram desenvolvidas nas formas de gel (F1F) e emulgel (F2F), adicionadas ou não da fração de BC, cuja composição pode ser visualizada na tabela 2. Posteriormente foi desenvolvida a formulação gel adicionada do padrão catequina (F1CAT).

As formulações foram preparadas a frio por agitação a 300 rpm, em agitador mecânico (Fisatom, modelo 713 D). A fração e a CAT foram previamente solubilizadas, em solução de propilenoglicol e água (50:50) e incorporadas na concentração de 1% na fase aquosa destas formulações. Foram preparadas ainda, formulações placebo sem adição dos ativos para cada formulação. As formulações foram acondicionadas em potes opacos brancos, com capacidade para 50 g, para posterior teste de estabilidade.

Tabela	2.	Comr	osicão	das	formu	lacões
i abela	4.	COIIII	osicao	uas	TOTHIU.	iacues.

Componentes (%)	F1F	F2F	F1CAT
Aristoflex AVC®*	3	-	3
Hostacerin SAF®**	-	5	-
Esqualeno de origem vegetal	2		2
Óleo de macadâmia		2	
Fenoxietanol+parabenos	0,5	0,5	0,5
Propilenoglicol	5	5	5
Água deionizada	88,5	86,5	88,5
Fração de BC	1	1	-
Catequina	-	-	1

^{*}Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona Pré-Neutralizado. ** Acriloildimetil-taurato de amônio, Copolimero VP, ésteres de sorbitol, fosfato de trilaurete-4, óleo mineral e palmitato de isopropila

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado em condições extremas de temperatura. Adotou-se ciclos de 24 horas a $45\pm2^{\circ}$ C, e 24 horas a $4\pm2^{\circ}$ C por 12 dias. As análises dos parâmetros características organolépticas e valor de pH foram realizadas em formulações recém preparadas, no tempo zero e durante todos os dias do estudo (BRASIL. ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004).

3.3.1 Características organolépticas

As amostras foram analisadas visualmente quanto ao aspecto, cor e odor, tendo como padrão de comparação amostras de formulações recém preparadas (BRASIL. ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004).

3.3.2 Determinação do valor de pH

A avaliação de pH foi realizada pela determinação direta do pH em soluções aquosas das amostras a 10% (p/v), utilizando peagâmetro Digimed DM20 (Di Mambro e Fonseca, 2005).

3.3.3 Estabilidade da atividade funcional das formulações preparadas

A estabilidade da atividade funcional *in vitro* das formulações desenvolvidas foi monitorada pela atividade antioxidante das mesmas através da medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol no tempo zero e no 12º dia do estudo conforme o item 3.2 4.3.

Para isto, foram preparadas diluições das formulações em meio reacional contendo glicina (0,1 M) e EDTA (1 mM), pH 9,4 de forma a conseguir concentrações da fração da BC

correspondente à quantidade necessária para se conseguir porcentagens de inibição da luminescência de aproximadamente 50%. Desta forma, 500 mg de formulação foi diluída em 5 mL de tampão glicina, obtendo uma solução contendo 1 mg/ml de fração, esta solução foi novamente diluída em meio reacional afim de obter uma solução final com concentração de 8µg/mL da fração de BC. 10 µL desta última diluição foram adicionados na reação xantina/XOD/luminol. As porcentagens de inibição das formulações foram concomitantemente comparadas com a inibição produzida pela fração não veiculada, utilizando as mesmas condições para formulações e fração.

3.4 Estudo de penetração cutânea *in vitro* dos componentes da fração incorporada às formulações gel e emulgel

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a sua capacidade de penetração dos compostos presentes na fração de BC na pele de orelha de porco. Os estudos de penetração cutânea foram conduzidos utilizando células de difusão vertical do tipo Franz (figura 9), com 1,77 cm² de área de difusão e com compartimento para solução receptora de 12 mL. A solução receptora utilizada foi solução tampão fosfato 0,15M, pH 7,2 contendo 0,5% de Tween 20®, previamente desgaseificada. A solução receptora permaneceu sob agitação (400 rpm) por uma barra magnética e foi mantida a 37°C por um banho circulante que envolve as células.

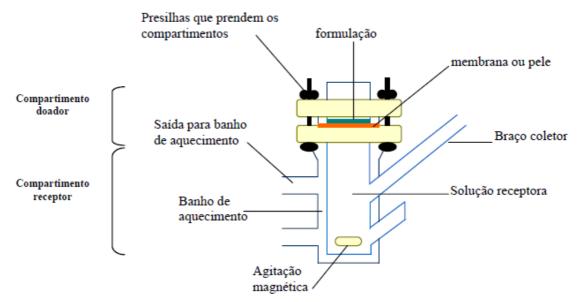


Figura 9: Célula de difusão de Franz tipo modificada. Reproduzido de Marquele-Oliveira (2007).

Seis células de difusão foram utilizadas para cada experimento, sendo que três células foram utilizadas com formulações com a fração e três delas com formulações placebo. Foram utilizados 200 mg de cada formulação em cada célula de difusão e foram realizados dois experimentos (n=6) (Fonseca, 2010).

3.4.1 Obtenção da pele

Os experimentos de penetração cutânea *in vitro* foram conduzidos utilizando pele de orelha de porco, obtidas em abatedouro logo após o abate do animal (Olhos D'Água, Ipuã-SP). Para tal, a pele da parte externa das orelhas foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi e estocadas a -80°C por um período de até 3 meses. No momento da utilização, a pele foi descongelada e removeu-se o tecido gorduroso com auxílio de tesoura sendo que somente a epiderme e a derme foram isoladas.

3.4.2 Escolha do solvente para extração dos componentes antioxidantes da fração de BC penetrados na epiderme+derme de pele de orelha de porco

Secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco limpas tiveram o estrato córneo retirado pelo método de *tape stripping*, utilizando 15 fitas adesivas tipo "durex". As amostras de pele foram enriquecidas com 50 μL da fração 1mg/mL em MetOH 80% (50 μg) e em seguida picotadas com o auxílio de tesoura e transferidas para tubo falcon.

Diferentes solventes extratores foram testados (metanol 25%, 50% e 80%) a fim de escolher o mais adequado para a extração dos compostos da fração de BC, com menor interferência possível na determinação da atividade antioxidante provocada pelos componentes inerentes da pele.

Adicionou-se 3 mL de solvente extrator no tubo contendo as peles picotadas e deixou-se em banho de ultra-som por 30 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon. As amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido e ressuspendidas em 500µL do respectivo solvente no qual a pele foi triturada; a amostra ressuspendida foi então diluída 10 vezes e a sua atividade antioxidante analisada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina oxidase/luminol, conforme descrito no item 3.2.4.3. Este mesmo procedimento foi realizado para o branco (somente a pele extraída) e para a fração (controle) utilizando cada solvente extrator.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para as amostras foi comparada com a porcentagem de inibição gerada pelo branco e com a porcentagem de inibição gerada pela fração na mesma concentração final das amostras. Assim, foi possível verificar o solvente mais apropriado para realizar o estudo de recuperação do método de penetração cutânea.

3.4.3 Estudo de recuperação dos componentes antioxidantes da fração de BC adicionados na pele

Em secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco limpas e sem o estrato córneo, adicionou-se 200, 50 e 20 μg da fração de BC. Estas quantidades correspondem a 10%, 2,5% e 1% das quantidades da fração presentes em 200 mg de formulação, respectivamente. Para cada nível de concentração foram utilizadas três secções de pele. Foram preparados um branco (somente a pele extraída) e soluções da fração (controle). Procedeu-se a extração conforme item 3.4.2, utilizando-se o solvente extrator mais adequado escolhido anteriormente (metanol:água 80%). Posteriormente, a porcentagem de inibição da quimioluminescência foi determinada, conforme item 3.2 4.3.

As porcentagens de inibição da quimioluminescência encontradas para as amostras, em cada concentração da fração (10, 2,5 e 1%), foram comparadas com a porcentagem de inibição gerada pelo branco e com a porcentagem de inibição gerada pela fração na mesma concentração final das amostras. A recuperação das porcentagens de inibição da quimioluminescência da fração adicionada na pele para cada concentração foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

Onde, IQ = inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol.

3.4.4 Medida da atividade antioxidante e de componentes da fração de BC penetrados na epiderme/derme após os estudos de penetração *in vitro*

As formulações tópicas preparadas foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração dos componentes da fração com atividade antioxidante e dos compostos fenólicos: CAT, EGCG e QG na pele de orelha de porco.

Os estudos de penetração foram conduzidos utilizando-se células de Franz, a pele de orelha de porco foi colocada na parte superior da célula receptora, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor da célula de difusão. Foi colocada sobre a pele 200 mg de formulação adicionada da fração de BC ou não.

Ao final de 12 horas, a camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirado por *tape stripping*, pressionando-se uniformemente 15 fitas do tipo "durex" e descartadas. A pele remanescente (epiderme viável + derme) foi submetida ao processo de extração conforme item 3.4.2.

Os compostos antioxidantes extraídos da pele foram analisados tanto pelo método de quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase conforme descrito anteriormente, quanto por CLAE.

Para o estudo de penetração *in vitro* das formulações tópicas pelo método CLAE, as amostras secas sob ar comprimido foram ressuspensas em 500 μL de solvente extrator (metanol:água 80%), filtradas em membranas com poros de 0,45 μm e então analisadas por CLAE utilizando-se o procedimento analítico descrito anteriormente item 3.2.1.

As amostras de pele de orelha de porco adicionadas da formulação placebo foram comparadas com as amostras adicionadas da formulação incorporada da fração de BC com o intuito de verificar a interferência de compostos da pele e da formulação na análise. Em seguida, os compostos CAT, EGCG e QG presentes na epiderme+derme foram quantificados empregando a equação da reta obtida utilizando os padrões destes compostos.

3.5 Estudo de penetração cutânea *in vivo* da formulação gel adicionada da fração de BC ou da CAT

As formulações gel adicionadas da fração (F1F) ou da catequina (F1CAT) foram avaliadas quanto à capacidade em disponibilizar o(s) princípio (s) ativo(s) e de retê-los na pele dos camundongos sem pelos.

Este estudo foi conduzido utilizando camundongos sem pelos da linhagem HRS/J, machos com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 30 g. Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25°C, com livre acesso de água e comida, 4 trocas de ar/hora e ciclos claro/escuro de 12 h. Os experimentos foram conduzidos com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo –campus de Ribeirão Preto (Protocolo n° 13.1.496.53.1), anexo 1.

Para este experimento os animais foram divididos em 3 grupos: grupo placebo (P1) (tratado com a formulação gel não adicionada da fração ou da catequina), grupo F1F (tratado com a formulação gel adicionadas da fração) e grupo F1CAT (tratado com a formulação gel adicionada da catequina). 200 miligramas de formulação foram aplicados no dorso dos animais.

Após 2 horas da aplicação das formulações, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e a área da pele em que a formulação foi aplicada foi removida. Uma área de aproximadamente 1,77 cm² da pele foi submetida ao procedimento de *tape stripping*. Para verificar o aumento da atividade antioxidante proporcionada pela fração e pelo padrão catequina da pele dos camundongos sem pelos, a pele remanescente (epiderme viável + derme) foi extraída com metanol: água 80%, conforme item 3.4.2, em seguida, as amostras foram submetidas ao ensaio de quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol como descrito no item 3.2.4.3. Para a determinação dos compostos da fração de BC e do padrão catequina penetrados na epiderme/derme da pele dos animais por CLAE, após a secagem sob ar comprimido, as amostras foram ressuspensas em 500 μL de água milliQ e filtradas em membranas com poros de 0,45 μm e então analisadas por CLAE utilizando-se o procedimento analítico já descrito.

3.6 Avaliação da fotoestabilidade da fração de BC em propilenoglicol 50% e da formulação gel adicionada da fração

Para avaliar a fotoestabilidade da fração de BC, 4 mL de uma solução 1% da fração em propilenoglicol 50% e 200mg da formulação F1F foram transferidos para microplacas de área 9,62 cm². Em seguida, as amostras foram expostas à mesma dose de radiação utilizada nos estudos de eficácia fotoquimioprotetora *in vivo* (2,87J/cm² de radiação UVB). Soluções de propilenoglicol 50% e o placebo da formulação gel foram também expostos à radiação. Em seguida, as amostras foram analisadas por medida da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol e por CLAE.

3.6.1 Quimioluminescência

Foram avaliadas as atividades antioxidantes da fração solubilizada em propilenoglicol 50%, da fração incorporada na formulação gel e dos seus respectivos placebos irradiados e sem irradiar, pela medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD, conforme descrito no item 3.2.4.3. As amostras foram diluídas no tampão do meio reacional de forma a conseguir concentrações da fração correspondentes à

quantidade necessária para se obter porcentagem de inibição do sistema de aproximadamente 50%.

3.6.2 CLAE

A fração solubilizada em propilenoglicol 50% e a solução placebo de propilenoglicol 50% irradiados e sem irradiar foram diluídas com álcool metílico a uma concentração de 1mg/mL, sendo estas soluções novamente diluídas na proporção de 125 μL de solução para 1 mL de água ultra pura (125μg/mL). 20 μL desta última diluição foram injetados e analisados por CLAE conforme descrito no item 3.2.1. Os perfis cromatográficos obtidos da fração irradiada e não irradiada, assim como dos placebos, foram comparados entre si.

3.7 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vitro da fração de BC e da CAT

O efeito fotoquimioprotetor da fração de BC e da CAT foi avaliado em cultura de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT expostos à radiação UVB. Foi avaliada a citotoxidade da fração de BC e da CAT, o efeito da fração de BC e da CAT na viabilidade celular de queratinócitos expostos à radiação UVB, a inibição do aumento dos níveis de peróxidos lipídicos e da secreção dos marcadores do processo inflamatório (IL-1β, IL-6 e NF-kB) induzidos pela radiação UVB. Para todos os testes, foi realizado o controle não irradiado (CNI), onde as células não foram expostas a radiação UV e o controle irradiado (CI), onde as células foram expostas a radiação UV, ambos sem pré-tratamento.

3.7.1 Linhagem e cultivo celular

As células de queratinócitos humano da linhagem HaCaT foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% soro fetal bovino (SBF), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 μg/mL) e incubadas em incubadora com 5% de CO₂ em ar a 37°C. As células foram subcultivadas a cada 5-7 dias, usando solução salina 0,9 % para lavá-las e tripsina 0,25 % para desagregá-las do frasco. Após desagregação, estas células foram centrifugadas a 1000 rpm por 15 minutos a 10°C, ressuspendidas em meio RPMI completo (suplementado com SFB), e para contagem de células usou-se câmara de Neubauer. Os meios de cultura e demais reagentes utilizados no cultivo das células foram adquiridos da Gibco[®].

As células de queratinócitos, da 3ª a 8ª passagens, sub-cultivadas foram inoculadas em microplaca de 96 poços a uma densidade de 0,3x10⁵ células/poço ou em microplaca de 12

poços a uma densidade de $3x10^5$ células/poço. Em seguida, foram incubadas em estufa a 37 °C, com 5 % de CO_2 , até atingir confluência em torno de 80%.

3.7.2 Avaliação da citotoxidade da fração de BC e da CAT pelo ensaio do Vermelho Neutro

O ensaio do vermelho neutro foi realizado com base no protocolo experimental descrito por Borenfreund e Puerner (1985). As células de queratinócitos da linhagem HaCaT foram inoculadas em microplaca de 96 poços, como descrito no item anterior. Ao atingirem confluência de 80%, 20 μL de diferentes diluições da fração de BC (5-80 μg/mL) e da catequina (5-20 μg/mL) foram adicionadas aos poços da placa contendo as células de queratinócitos em meio não suplementado com SBF (meio incompleto). 24 horas após o tratamento, o meio foi retirado, as células foram lavadas com solução salina e foram adicionados 200μL de vermelho neutro (50μg/mL) em cada poço. Em seguida a placa foi incubada na estufa por 3 horas. Após este período, o vermelho neutro foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e CaCl₂ 1% (p/v). Em seguida, foram adicionados 200 μL de solução etanólica 50% com 1% de ácido acético (v/v). A leitura da absorbância foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplaca (μQuant) em 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

3.7.3 Estudo do efeito da fração de BC e da CAT na viabilidade celular de queratinócitos expostos à radiação UVB

Foi determinada uma curva dose-resposta de viabilidade celular frente a diferentes doses de radiação UVB (15-50 mJ/cm²) para os queratinócitos HaCaT. Para este experimento, as células HaCaT foram inoculadas em placas de petri individuais (9,2 cm²), como descrito no item 3.7.1. Ao atingirem confluência de 80%, as células foram lavadas com solução salina e expostas a diferentes doses de irradiação UVB com 1 mL de Tampão Hank's (tabela 3). Após a irradiação, o tampão foi trocado por 1 mL de meio incompleto e as placas foram incubadas por 24 horas na estufa. Após este período o ensaio vermelho neutro foi realizado conforme descrito no ensaio de citotoxidade.

Tabela 3: Com	nposição do	tampão Hank'	s, pH 7.2.
---------------	-------------	--------------	------------

Componentes	Concentração
NaCl	0,137 M
KCl	5,4 mM
Na_2HPO_4	0,25 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
NaHCO ₃	4,2 mM
$CaCl_2$	1,3 mM
${ m MgSO_4}$	1 mM
Glicose	5,6 mM

A fonte de luz utilizada para radiação UVB foi uma lâmpada fluorescente modelo Philips TL40W/12 RS (Medical Holand), que emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida das doses foi realizada com auxílio de radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detector UVB (SED 240).

Para avaliar o efeito da fração de BC e da CAT na viabilidade celular de queratinócitos expostos à radiação UVB, as células HaCaT cultivadas em microplacas de 96 poços foram pré-tratadas com concentrações sub-tóxicas da fração (1,2-10 μg/mL) ou da CAT (10-20 μg/mL) em meio incompleto e incubadas por 24 horas. Após este período, as células foram lavadas com solução salina e expostas à radiação UVB (20 mJ/cm²) na presença da fração (1,2-10 μg/mL) ou CAT (10-20 μg/mL) em Tampão Hank's, com volume final de 200 μL. Após a irradiação o tampão foi substituído por meio incompleto e as microplacas incubadas novamente. 24 horas após a exposição à radiação UVB, a viabilidade das células submetidas ou não a irradiação foi determinada pelo ensaio vermelho neutro, conforme descrito no item 3.7.1.2.

3.7.4 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vitro* por medida da peroxidação lipídica

O efeito da fração de BC e da CAT em inibir a peroxidação lipídica em cultura de queratinócitos foi avaliado empregando o ensaio de TBARS (teste das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) conforme descrito por Morliere, Moysan e Tirache, (1995).

As células de queratinócitos HaCaT foram cultivadas em microplaca de 12 poços e pré-tratadas com diferentes concentrações sub-tóxicas da fração de BC (1,2-5 μg/mL) ou da CAT (5-20 μg/mL) em meio incompleto. Após 24 horas, as células foram lavadas com

solução salina e expostas a radiação UVB na presença da fração ou da CAT em Tampão Hank's, com volume final de 1 mL. Após a irradiação, as células foram lavadas mais uma vez com solução salina e incubadas em estufa de CO₂ por 3 horas com 1 mL de Tampão Hank's. Em seguida, 900 µL do sobrenadante foram recolhidos e adicionados 90 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) (2 % p/v em etanol), a amostra foi congelada em freezer -80°C até a realização do teste. Posteriormente, 1 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (0,375 % p/v) contento HCl (0,25 M) e 15 % de ácido tricloroacético foi adicionado na amostra descongelada, seguido por incubação de 15 minutos a 85°C e posterior resfriamento em gelo. O complexo MDA-TBA foi extraído com 1 mL de n-butanol com auxilio de vórtex e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A fluorescência da fração orgânica foi determinada em 515 e 550 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500. Os dados foram expressos em porcentagem (%) de nM de MDA por mg de proteína. Para isso, foi construída uma curva de calibração empregando solução padrão de tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich®) (o qual produz MDA) e o teor de proteínas do lisado celular foi determinado pelo método Bradford com albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

Para obtenção do lisado celular, as células foram lavadas com solução salina e removidas dos poços com 250 µL de tampão de lise (tabela 4) e auxílio de raspador de células (scrapper). Recolheu-se a suspensão de células de cada poço em microtubos, as células foram lisadas em banho de ultrassom contendo água gelada e gelo por 5 minutos, seguido por 1 minuto de agitação em vórtex, o procedimento foi repetido por 2 vezes. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas e quantificação dos marcadores do processo inflamatório (IL-1β, IL-6 e NF-kB/p65).

Tabela 4: Composição do tampão de lise.

_3 1	
Composição	Concentração
EDTA	1mM
PMSF	1mM
Pepstatina	1 μg/mL
Leupeptina Nonidet [®] P-40	1 μg/mL
Nonidet® P-40	0,25%
Tampão fosfato pH 7,4	50mM

*PMSF: fluoreto de fenitilmetilsulfonil. *EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

3.7.5 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vitro* pela quantificação dos marcadores do processo inflamatório

Os testes foram realizados com 100 μL das amostras do sobrenadante do lisado celular (descrito no item anterior) contendo 300 μg/mL de proteína. A quantificação das citocinas IL-1β e IL-6 foram realizadas por ensaio colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Elisa Ready-SET-Go!®, eBioscience, EUA), assim como a quantificação do NF-k/ p65 total (Elisa InstantOneTM, eBioscience, EUA). Os dados foram expressos em pg IL-1β ou IL-6 de por mg de proteína ou % de NF-kB/ p65 presente no citoplasma.

3.8 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração de BC ou da CAT adicionados à formulação gel

Foi avaliada a atividade fotoquimioprotetora *in vivo* da fração de BC ou da CAT adicionados à formulação gel contra os danos causados pela radiação UVB na pele de camundongos sem pelos através dos seguintes parâmetros: inibição da depleção dos níveis de GSH intracelular, da atividade de mieloperoxidase, da secreção dos marcadores de processo inflamatório (IL-1β, IL-6) e da atividade/secreção das metaloproteinases.

3.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos sem pelos (n=5 para cada grupo), machos, adultos, pesando em média 30g, linhagem HRS/J, de acordo com o descrito no item 3.5.

3.8.2 Irradiação dos camundongos sem pelos

A fonte de luz consistiu de uma lâmpada ultravioleta UVB fluorescente modelo Philips TL/RS 40W (Medical-Holand). Esta fonte emite radiação na faixa de 270-400 nm com pico máximo de emissão em 313 nm. A fonte irradiação foi instalada em um compartimento de madeira (figura 10) desenvolvido para indução de estresse oxidativo na pele dos animais (Casagrande, 2005; Marquele-Oliveira, 2007). Os animais foram colocados em caixas plásticas, cobertas com tela plástica para mantê-los dentro das mesmas durante todo o tempo de exposição à radiação. Nestas condições, a irradiância foi de 0,34mW/cm², determinada por radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detector UVB (SED 240), da qual aproximadamente 80% corresponderam à radiação UVB.

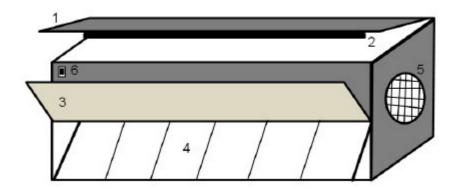


Figura 10: Esquema da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB. (1) Tampa superior; (2) lâmpada UVB; (3) tampa frontal; (4) repartições para colocar as caixas plásticas com os animais; (5) orifício de ventilação; (6) acionamento da lâmpada.

Os animais foram divididos em oito grupos de cinco animais cada. São eles: controle não irradiado (CNI); tratado com formulação gel placebo e não irradiado (NP); tratado com formulação contendo a fração de BC e não irradiado (NBC); tratado com formulação contendo o padrão catequina e não irradiado (NCAT); controle irradiado (CI); tratado com placebo e irradiado (IP); tratado com formulação contendo a fração de BC e irradiado (IBC) e tratado com formulação contendo o padrão catequina e irradiado (ICAT).

O tratamento consistiu na aplicação de 200 mg de formulação no dorso de cada animal 2 horas antes do início da irradiação. Os grupos irradiados foram expostos à radiação UVB, à dose de 2,87 J/cm². A dose de radiação utilizada foi reportada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da FCFRP-USP (Casagrande *et al.*, 2006; Vicentini *et al.*, 2008) como sendo a dose capaz de induzir a depleção do GSH, induzir a secreção/liberação de metaloproteinases e migração leucocitária, e foi experimentalmente confirmada.

Após 6 horas do término da irradiação, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono, a pele foi limpa com auxílio de algodão e solução de NaCl 0,9% (p/v) para retirada total das formulações. Amostras do tecido cutâneo do dorso dos animais foram coletadas e estocadas a – 80°C até a análise.

3.8.3 Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Os níveis de GSH na pele do dorso dos animais foram determinados utilizando o ensaio de fluorescência descrito por Hissin e Hilf (1976). As amostras de pele foram picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1M, pH 8,0, contendo EGTA (5mM). Posteriormente, foram homogeneizadas em Turrax TE-120 a 21500rpm por 2 minutos e

200μL de ácido tricloroacético 30% foram acrescentados para cada mililitro de tampão adicionado. Esse homogeneizado foi, então, centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para microtubo e, novamente, centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C (Casagrande *et al.*, 2006).

Na determinação das quantidades de GSH, 100μL da fração sobrenadante (amostra) foram adicionados a 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 8,0, contendo EGTA 5mM, e 100μL de o-ftalaldeído (OPT) 1mg/mL preparado em metanol. A fluorescência foi determinada após 15 minutos em 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F4500. Para determinação dos níveis de GSH presentes nas amostras foi utilizada a equação de regressão linear da curva de calibração obtida plotando-se concentração de GSH padrão (Sigma®) (μM) versus unidades de fluorescência. O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os dados foram expressos em μM de GSH por mg de proteína.

3.8.4 Avaliação da eficácia antiinflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O ensaio para dosagem da MPO seguiu o protocolo descrito por (Bradley, P. P. *et al.*, 1982). As amostras da pele do dorso dos animais foram coletadas e armazenadas a –80°C em microtubos contendo tampão K₂HPO₄ (50 mM) adicionado de brometo de hexadecil trimetilamônio (HTAB) 0,5% (p/v), pH 6,0. Posteriormente, as amostras foram picotadas, diluídas a 50 mg/mL utilizando o mesmo tampão e homogeneizadas em Turrax a 21500 rpm por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12880g por 6 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e analisada quanto à atividade de MPO. Em microplaca de 96 poços, 60μL das amostras foram adicionadas a 200μL de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de *o*-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada após 10 minutos do início da reação em 450 nm, utilizando espectrofotômetro leitor de microplaca. A atividade da enzima nas amostras foi determinada através de uma curva padrão de mieloperoxidase (Sigma®). Os resultados foram expressos em unidade de mieloperoxidase por miligrama de pele (Casagrande *et al.*, 2006).

3.8.5 Quantificação das citocinas IL-1β e IL-6

As concentrações de IL-1β e IL-6 foram determinadas por ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando as amostras de pele congeladas e armazenadas no -80°C. As amostras de pele foram picotadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo EDTA (1mM), PMSF

(1mM), pepstatina (1μg/mL) e leupeptina (1μg/mL) na concentração de 50 mg/mL, homogeneizadas em Turrax® e centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e os níveis teciduais de IL-1β e IL-6, foram quantificados por ensaio colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Elisa Ready-SET-Go!®, eBioscience, EUA), e o resultado expresso em pg/mg de proteína. O método de Bradford foi utilizado para dosagem de proteínas das amostras de pele (Bradford, 1976)

3.8.6 Inibição da atividade/secreção de metaloproteinases utilizando zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio)

Foi utilizada SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) para a detecção de enzimas com atividade gelatinolítica (Onoue *et al.*, 2003; Gerlach *et al.*, 2007). As amostras de pele foram coletadas e armazenadas como descrito anteriormente. Posteriormente, foram picotadas e diluídas 1:4 em tampão Tris/HCl (50 mM), contendo CaCl₂ (10 mM) pH 7,4, adicionado de 1% de mistura de inibidor de proteinases (Sigma®). As amostras foram homogeneizadas, com auxílio de Turrax a 21500 rpm por 2 minutos e deixadas durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, estas amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos a 4°C sendo a fração sobrenadante retirada e novamente centrifugada a 12000 *g* por 10 minutos a 4°C (Casagrande *et al.*, 2006; Vicentini *et al.*, 2008). A 50 μL do sobrenadante das amostras foram adicionados 10 μL de tampão não redutor Tris/HCl (0,1 M), com SDS (4%), glicerol (20%) e azul de bromofenol (0,001%). Foram aplicados 10 μL desta mistura na placa de eletroforese.

Na montagem da placa de gel para eletroforese utilizou-se gel de concentração e gel de separação a 10% (10 cm). Segue abaixo a composição dos géis:

Gel de separação

Água milli Q	5,80 mL
Tris/HCl (1,5 M) com SDS (0,4%) pH 8,8	11,25 mL
Acrilamida: bis acrilamida (30:0,8)	5 mL
Gelatina 100 mg/mL	375 μL
Persulfato de amônio 10%	50 μL
Temed	10 μL

Gel de concentração

Água milli Q	4,06 mL
Tris/HCl (0,5 M) com SDS (0,4%) pH 6,8	1,67 mL
Acrilamida: bis acrilamida (30:0,8)	860 µL
Persulfato de amônio 10%	33 μL
Temed	6,6 µL

O tampão usado nas cubas foi Tris/glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970). O gel foi submetido a uma pré-corrida de 15 minutos a 13 mA e então foi aplicada 40 µL de amostra corada. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi de 13 mA no gel de concentração e 16 mA no gel de separação. A corrente foi mantida constante até 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 hora com solução de Triton X-100 2% sob constante agitação e posteriormente incubado por 12 horas a 37°C em tampão de reação constituído de 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, CaCl₂ 10 mM e 0,02% de azida sódica (Demacq *et al.*, 2008). Após incubação do gel no tampão de reação, este foi colocado por 10 minutos na solução corante contendo 0,1% de Coomassie Blue R 350, obtida pela diluição 1:1 da solução estoque do corante em solução de ácido acético 20%. A atividade proteolítica foi observada após descoloração do gel com solução de ácido acético 20%. O método de Bradford foi utilizado para dosagem de proteínas das amostras de pele(Bradford, 1976)

3.9 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística GraphPad Prism[®] (versão 5.0). Os resultados foram expressos pela média ±desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni e teste *t*-student. Foram consideradas diferenças significativas os valores de p<0,05.

4 Resultados e Discussão

4.1.1 Análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato e da fração de BC

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas e são importantes determinantes das qualidades sensoriais e nutricionais dos frutos, legumes, hortaliças e flores (Lapornik, Prošek e Golc Wondra, 2005). Os principais grupos polifenólicos são: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos e lignanas (D'archivio *et al.*, 2007). Devido à alta capacidade antioxidante, estes compostos são considerados benéficos à saúde humana, desempenhando importantes papéis na proteção contra um número de distúrbios patológicos, como no tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares, nas disfunções cerebrais, na fotoquimioproteção da pele contra os efeitos da radiação solar e outras patologias (Vicentini *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010; Ignat, Volf e Popa, 2011)

Muitos extratos vegetais têm os seus efeitos terapêuticos e preventivos baseados sobre os efeitos sinérgicos de seus multicomponentes e multialvos, sendo insuficiente determinar simplesmente um ou dois marcadores dos constituintes bioativos em uma preparação tão complexa como são os extratos (Liu et al., 2013). Assim, a impressão digital ou "fingerprint" de plantas medicinais usando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido aceita internacionalmente como um método possível para avaliação da qualidade dos extratos, podendo auxiliar na identificação de compostos quando comparados a padrões, como também ser utilizado nos estudos de estabilidade química. A impressão digital cromatográfica expressa o perfil químico de extratos vegetais sob a forma de um cromatograma (Ma et al., 2011; Li et al., 2015)

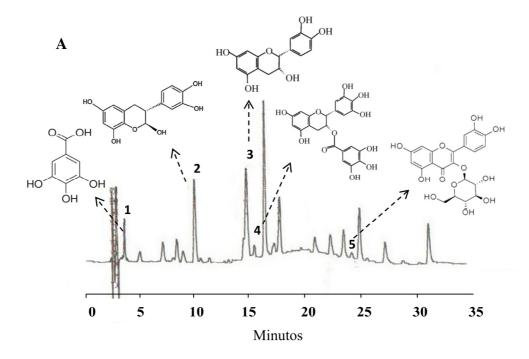
A impressão digital cromatográfica do extrato metanólico da folha de BC foi obtida por Souza (2007). O autor submeteu o extrato metanólico ao processo cromatográfico em coluna de fase reversa, C₁₈ Germini, no qual foi empregado um gradiente não linear com a fase móvel água (A) e acenonitrila (B) com 1% de ácido fórmico. A impressão digital cromatográfica foi constituída de nove picos majoritários e as estruturas químicas dos compostos: ácido gálico, catequina; epicatequina; epigalocatequina; epigalocatequina galato; quercetina-3-O-arabinopiranosideo-2''galato foram deduzidas por interpretação das informações espectroscópicas obtidas por ressonância nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN de ¹H e ¹³C) e espectrometria de massas. Bejar e Malone (1993); Bejar *et al.*,(1995) extraíram e isolaram também alguns flavonóides do extrato metanólico da folha da BC usando processos cromatográficos clássicos. Esses compostos foram identificados como sendo

catequina, epicatequina, quercetina-3-O-L-α-L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-*O*-[6-galoil]galactosídeo pelas informações espectroscópicas obtidas pelo espectro de absorção da radiação ultravioleta (UV), Infravermelho (IR), RMN de ¹H e ¹³C, e espectros de massas.

O laboratório de Cromatografia do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia/Universidade Federal do Pará (CVCBA/UFPA), visando à aplicação dos extratos vegetais em produtos farmacêuticos e cosméticos realizaram a extração dos compostos da folha da BC em etanol, classificado como solvente com baixo potencial tóxico pelo ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* - 1997). O extrato etanólico bruto das folhas de BC foi fracionado em quatro frações de acordo com sua polaridade utilizando resinas macroporosas. No presente trabalho, o extrato etanólico purificado e a fração de média polaridade separada desse extrato foram utilizados como matérias- primas.

As impressões digitais cromatográficas do extrato etanólico purificado da folha da BC e da fração de média polaridade foram obtidas por pequenas modificações das condições cromatográficas desenvolvidas por Souza (2007) (Figura 11 A e B). O processo cromatográfico foi padronizado pela ordem de eluição dos padrões ácido gálico (AG), (+) catequina (CAT), (-) epicatequina (EC) e (-) epigalocatequina-3- galato (EGCG) que foi a mesma obtida por Souza (2007) e pela eluição do padrão quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (Isoquercitrin da Sigma[®]) cuja presença no extrato metanólico da BC foi confirmada mais tarde pelo grupo de Souza.

Os compostos AG, CAT, EC e EGCG foram identificados no extrato etanólico purificado e na sua fração de média polaridade pela comparação do tempo de retenção de cada pico com aqueles dos padrões e pelos dados de Souza (2007). A presença da quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo (QG) foi confirmada pela comparação do tempo de retenção do pico com o do padrão e pela co-eluição do padrão e dos picos nas amostras de extrato e da fração adicionados do padrão.



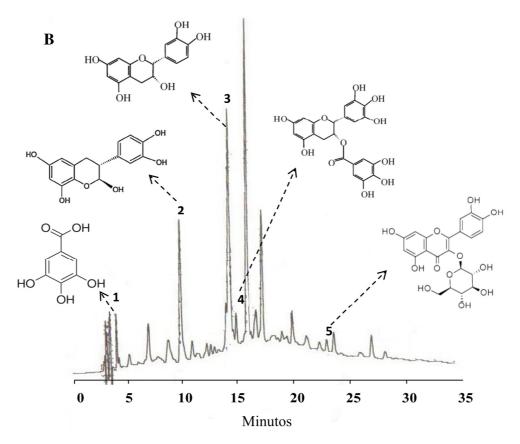


Figura 11: Perfil cromatográfico do extrato (A) e da fração (B) das folhas de BC (125 μ g/mL) obtido por CLAE em coluna C18. Os números correspondem a eluição dos seguintes compostos: 1: (+) ácido gálico; 2: (+) catequina; 3: (-) epicatequina; 4: (-) epigalocatequina-3-galato e 5: quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo.

4.1.1.1 Quantificação dos compostos CAT, EGCG e QG no extrato e na fração de BC por CLAE

O método analítico cromatográfico usado para obtenção dos perfis cromatográficos do extrato e da fração (Figura 11A e B) foi validado quanto a sua linearidade usando soluções dos padrões CAT, EGCG e QG em diferentes concentrações. A precisão interdia foi determinada pelas injeções de cinco amostras de extrato e fração seguidas pelas medidas das áreas dos picos eluídos nos mesmos tempos de retenção dos compostos CAT, EGCG e QG.

A) Linearidade

A linearidade de um método analítico refere-se à proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta obtida (área do pico ou altura). Curvas analíticas foram construídas plotando-se, no eixo das abscissas, as concentrações das soluções de cada padrão e no eixo das ordenadas as áreas dos picos. O método analítico foi linear na faixa de concentração de 1 a 20 µg/mL para todos os padrões usados. As equações da regressão linear para os três padrões foram calculadas na forma de y = ax + b, onde y e x são as áreas dos picos e a concentração (µg/mL), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Equação da regressão linear, valores do coeficiente de determinação (R²) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (%) obtidos para os padrões CAT, EGCG e QG.

Compostos	Equação da regressão linear	Coeficiente de determinação (R²)	Coeficiente de variação dos fatores de respostas (%)
CAT	y = 2321,7x - 7559,9	0,9947	11,6
EGCG	y = 4891,1x + 1848,5	0,9923	8,0
QG	y = 3897,7x - 716,51	0,9937	11,3

B) Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Neste ensaio foram realizadas 5 determinações do teor de CAT, EGCG e QG no extrato e na fração de BC com o mesmo analista e mesma instrumentação. Foram avaliadas a precisão inter-dia, avaliando a medida do coeficiente de variação (CV%) das áreas dos picos cromatográficos identificados. As equações das retas obtidas para as curvas analíticas dos padrões foram empregadas para a medida da concentração dos compostos fenólicos identificados no extrato e na fração (mg/g) de BC (Tabela 6). Todos os picos em análise apresentaram boa resolução e separação.

Tabela 6: Precisão do método analítico cromatográfico para a quantificação dos compostos fenólicos CAT, EGCG e QG presentes no extrato e na fração de BC, por CLAE.

Amostra	Padrão	Área do pico	CV (%)	Quantidade (mg/g)
Extrato	CAT	27056 ± 676	2,50	$119 \pm 2,3$
Fração	CAI	66403 ± 940	1,27	$255 \pm 3,2$
Extrato	EGCG	3245 ± 126	3,91	8 ± 0.2
Fração	EGCG	17491 ± 1028	6,57	$26 \pm 1,68$
Extrato	OC	2400 ± 192	8,02	$6 \pm 0,4$
Fração	QG	5061 ± 46	0,80	12 ± 0.09

Os coeficientes de variação calculados a partir dos dados das áreas dos picos para o método analítico variaram de 8,02% a 0,8% para QG presente no extrato e na fração, respectivamente. O critério de aceitabilidade para o coeficiente de variação para a precisão de métodos analíticos cromatográficos para produtos contendo um único fármaco sintético é igual ou menor que 5%. No entanto, no caso de extratos ou frações contendo uma mistura de vários compostos, os coeficientes de variação aceitos podem ser maiores, por exemplo, inferiores a 15%, conforme descrito na Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

O maior coeficiente de variação foi observado para o composto do extrato onde está presente em menor quantidade (QG) quando comparados à fração. Os métodos analíticos tornam-se menos precisos quando o analito encontra-se em baixa concentração na amostra. Isto poderia justificar a menor precisão do método analítico para os compostos do extrato. No entanto, para o composto EGCG o maior coeficiente de variação foi observado para o composto presente na fração. As figuras 11A e 11B mostram que os picos 3 da EC e o pico 4 da EGCG estão muito próximos, dependendo da quantidade da EC pode ocorrer maior interferência deste composto na quantificação da EGCG. Como o pico da EC é maior na fração do que no extrato, provavelmente houve maior interferência do pico 4 na quantificação do pico na fração do que no extrato.

A fração apresentou maiores quantidades de ativos do que o extrato. As quantidades de CAT e QG na fração foram duas vezes maiores do que no extrato, enquanto que a quantidade de EGCG foi três vezes maior. Esses resultados indicam que o processo de enriquecimento da fração em compostos fenólicos de média polaridade foi um sucesso.

4.1.2 Determinação dos teores de polifenóis e flavonóis totais e medida da atividade antioxidante do extrato e da fração de BC

Estudos mostram que a ação antioxidante de extratos vegetais, tais como a sua propriedade de seqüestrar EROs, relaciona-se ao teor de compostos fenólicos presentes nestes (Silva et al., 2007; Li et al., 2014).

4.1.2.1 Quantidades de polifenóis totais no extrato e na fração de BC

A quantidade de polifenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteau baseado na redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolíbdico (reagente de Folin-Cicalteau) a óxidos de tungstênio e molibdênio em meio alcalino (pH ≥ 10) por compostos fenólicos. Sob pH básico ocorre dissociação do próton fenólico levando a formação do ânion fenolato, que é oxidado pelo reagente de Folin-Cicalteau, levando a formação de um complexo tungstênio-molibdênio azul (Singleton et al., 1999; Huang, Ou e Prior, 2005).

O teor de polifenóis foi determinado através da equação da reta obtida pela curva de calibração com padrão de ácido gálico y = 0.113x-0.031 (r = 0.994) onde x representa a concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y representa a absorbância. O conteúdo de polifenóis totais encontrado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato ou fração, em relação ao peso seco (mgEaG/g), como mostra a tabela 7. A fração apresentou teor de polifenóis totais 45% maior que o extrato de BC.

Tabela 7: (Duantidades de	polifenóis e flavonóis	totais presentes no	extrato e na fração de BC.
I unciu / i \	, autitiuaudob ac	politicitors e flavoliois	totals presentes no	children e na mação de Be.

Amostras	Polifenóis Totais (mg EAG/g)	Flavonóis Totais (mg EQ/g)
Extrato BC	370	12,16
Fração BC	540	1,92

O extrato e a fração de BC apresentaram altos teores de polifenóis totais quando comparados a outros extratos vegetais estudados em nosso laboratório. Como por exemplo, o extrato de calêndula (28,6 mg EAG/g) e o extrato de Garcinia brasiliensis (69,8 mg EAG/g), os quais se mostraram eficazes na prevenção aos danos causados pela RUV (Fonseca et al., 2010; Figueiredo et al., 2014). O teor de polifenóis encontrado por Souza et al. (2008) para o extrato metanólico de BC foi seis vezes menor (58,1 mg EAG/g) que o encontrado para o

extrato em estudo, provavelmente este resultado seja devido ao tipo de solvente orgânico utilizado para extração dos compostos presentes nas folhas de BC.

4.1.2.2 Quantidades de flavonóis totais no extrato e na fração de BC

Dentre os compostos fenólicos, a classe dos flavonóides é aquela com maior número de compostos e com ampla atividade biológica, dentre elas destacam-se as atividades antiinflamatória e antioxidante (Silva et al., 2007; Gulcin et al., 2010). Entre as muitas subclasses de flavonóides estão os flavonóis que possuem uma estrutura química planar com uma dupla ligação na posição C2-C3 do anel C o que confere insaturação ao anel; a conexão do anel B ao anel C ocorre através de C2. Apresenta um grupo cetônico na posição C4 e uma hidroxila livre no carbono C-3 do anel heterocíclico (figura 12). Os flavonóis são representados principalmente pela quercetina, miricetina e rutina (Van Acker et al., 1996; Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997; Burda e Oleszek, 2001; Soobrattee et al., 2005).

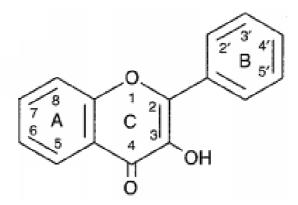


Figura 12: Estrutura química básica dos flavonóis.

Para a quantificação de flavonóis em extratos vegetais sem a interferência de outros compostos fenólicos, emprega-se o método colorimétrico com o cloreto de alumínio. O método colorimétrico tem como princípio a formação de um complexo estável entre o cátion alumínio e as hidroxilas livres dos flavonóis, ocasionando um deslocamento dos máximos de absorção para as regiões de maior comprimento de onda e uma intensificação da absorção (Marques et al., 2012).

O conteúdo de flavonóis totais do extrato e da fração de BC foi determinado pela equação y = 0.0606x + 0.0065 (r=0.9987) obtida com padrão de quercetina. O teor de flavonóis foi expresso em mg de equivalente de quercetina / g de extrato ou fração, em relação ao peso seco (mgEq/g), como representado na tabela 7.

A tabela 7 mostra que apenas 3,3% dos polifenóis encontrados no extrato correspondem a flavonóis totais. Este resultado está de acordo com aquele obtido por Souza *et al.*, (2008) que mostraram que apenas 5,4% dos polifenóis totais do extrato metanólico das folhas de BC são flavonóis. Os outros polifenóis que não são os flavonóis, como flavanona, isoflavonas, flavanóis, ácidos fenólicos, taninos, entre outros, podem fazer parte do extrato de BC. Os dados da tabela 7 mostram também que apenas 0,35% dos polifenóis totais da fração são flavonóis. Isto sugere que apenas 0,35% dos flavonóis do extrato são flavonóis de média polaridade.

Ao analisar os perfis cromatográficos, dos picos majoritários do extrato e da fração de BC, dois são flavanóis, CAT e EC. Os flavanóis são classificados também como uma subclasse de flavonóides, estes se diferem dos flavonóis pela ausência da insaturação no anel C (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997). Os flavanóis são potentes antioxidantes capazes de interagir com fosfolipídios de membrana, impedindo o acesso de agentes oxidantes à bicamada lipídica, consequentemente evitando a propagação da oxidação lipídica (Verstraeten et al., 2003).

4.1.3 Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato e da fração de BC

As radiações solares ultravioletas A e B que atingem a Terra são componentes da luz solar que geram severo estresse oxidativo nas células cutâneas via formação de radicais livres, estes por sua vez induzem danos as membranas lipídicas, proteínas e moléculas de DNA (Wickens, 2001). Os antioxidantes são compostos protéicos e não protéicos capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (Atoui *et al.*, 2005). Os antioxidantes frequentemente incluem inibidores das reações radicalares em cadeia, queladores de metais, inibidores de enzimas oxidativas e cofatores de enzimas antioxidantes (Huang, Ou e Prior, 2005).

Assim, o potencial antioxidante do extrato e fração de média polaridade foi determinado por três ensaios *in vitro*, pela medida da capacidade do extrato e da fração em doar íons H⁺ ao radical estável ao DPPH[•], pela capacidade de inibição da peroxidação lipídica e pela inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol.

4.1.3.1 Avaliação da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH[•] do extrato e da fração de BC

O teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é baseado na redução do radical estável DPPH pela capacidade doadora de hidrogênio dos polifenóis, o que está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxilas em suas estruturas químicas (Seyoum, Asres e El-Fiky, 2006). À medida que o radical aceita um átomo de hidrogênio (H) da molécula antioxidante sofre redução passando de DPPH[•] para DPPH-H, resultando na mudança da coloração púrpura da solução etanólica de DPPH para amarela, com concomitante decréscimo de absorção em 515 nm (Blois, 1958; Deng, Cheng e Yang, 2011). O método de DPPH é amplamente usado para avaliar atividade antioxidante de extratos de plantas por ser um método rápido e preciso. No entanto, é uma espécie radicalar sintética centrada no nitrogênio não presente nos sistemas biológicos.

O extrato e a fração de BC apresentaram forte capacidade de reduzir o radical DPPH • de forma concentração-dependente, apresentando IC₅₀ (concentração inibitória 50%) de 1,82 ± 0,07 e 1,51 ± 0,1 µg/mL, respectivamente. Comparando-se os valores de IC₅₀ de ambos, é possível verificar que são valores muito próximos e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (teste t-student), apesar do extrato ter apresentado teor de flavonóis muito superior ao da fração. Isto sugere que os outros polifenóis da fração podem estar colaborando para atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH[•].

Casagrande et al., (2006) determinaram a capacidade doadora de H⁺ ao radical DPPH[•] da quercetina, um flavonóide de alto poder antioxidante, e encontraram o valor de IC₅₀ de 1,17 µg/mL. Comparando os valores de IC₅₀ encontrados no presente estudo com o da quercetina pode-se concluir que tanto o extrato quanto a fração desse extrato possuem também alto poder antioxidante.

4.1.3.2 Avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica do extrato e da fração de BC

A pele está constantemente exposta ao estresse oxidativo induzido pela radiação solar por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O dano oxidativo mediado pelas EROs envolve grande número de moléculas biológicas; dentre elas os lipídios, os quais são os mais susceptíveis (Briganti e Picardo, 2003). Isto se deve ao fato que as membranas biológicas contêm consideráveis quantidades de lipídeos altamente insaturados e são banhadas por fluídos ricos em oxigênio e metal (Buege e Aust, 1978).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia onde as EROs atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células gerando os radicais alquila (L'), peroxila (LOO) e alcoxila (LO). Os produtos finais da peroxidação lipídica são aldeídos reativos, tais como 4-hidroxinonenal e malondialdeído (MDA), muitos dos quais são altamente tóxicos para as células. Além disso, os aldeídos reativos gerados pela peroxidação lipídica podem atacar outros alvos celulares, tais como proteínas e DNA, propagando assim os danos celulares (Dargel, 1992; Yu e Yang, 1996; Gulcin et al., 2010).

O ensaio in vitro de inibição da peroxidação lipídica baseia-se em uma reação colorimétrica entre duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) e o MDA gerado durante incubação aeróbia de homogeneizados de tecidos, como é o caso das mitocôndrias isoladas de fígado de rato, na presença de íons Fe²⁺. A presença dos íons Fe²⁺ é o fator determinante para que ocorra a indução da peroxidação lipídica in vitro. Eles atuam catalisando a reação de Fenton/Harber-Weiss [Fe²⁺ + $H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$] gerando o radical hidroxila (${}^{\bullet}OH$) altamente reativo que inicia a peroxidação lipídica (Moure et al., 2001). Além disso, na preparação do homogenato de fígado de ratos para obtenção da mitocôndria, ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos pela ação de enzimas liberadas na maceração do tecido. Na presença de sais de ferro estes hidroperóxidos lipídicos são decompostos e originam radicais peroxila e alcoxila, propagando a peroxidação lipídica (Hippeli e Elstner, 1999; Marquele *et al.*, 2005).

Compostos antioxidantes com a capacidade de doar elétrons aos radicais peroxila, alcoxila e alquila são capazes de inibir a propagação da peroxidação lipídica, diminuindo a geração dos aldeídos reativos, como MDA (Marquele et al., 2005; Casagrande et al., 2007; Fonseca et al., 2010).

O extrato e a fração de BC apresentaram propriedades inibitórias da peroxidação lipídica concentração-dependente verificada pela inibição da formação de espécies reativas que reagem com o TBA. Os valores de IC₅₀ encontrados para o extrato e fração foram, respectivamente, 1.3 ± 0.10 e 1.4 ± 0.15 µg/mL. É possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa (teste t-student) entre os valores de IC₅₀ encontrados para o extrato e a fração.

Os valores do IC₅₀ encontrados para o extrato e fração de BC foram cerca de seis vezes maiores que o da quercetina (IC₅₀ de 0,215 μg/mL) calculado por Vicentini e colaboradores (2007b). O coeficiente de partição octanol/água determinados para quercetina por diferentes autores variou de 2,29 a 3,84 (Liao e Yin, 2000; Zhang et al., 2007). Isto indica que este flavonol tem interação com fase lipofílica, facilitando sua atividade inibidora da peroxidação lipídica. Por outro lado, os coeficientes de partição octanol/água determinados para os componentes majoritários do extrato e da fração de BC: AG, CAT e EC foram de 0.45 ± 0.057 ; 0.60 ± 0.072 e 0.59 ± 0.21 , respectivamente (Liao e Yin, 2000; Alonso et al., 2014). Esses dados de coeficiente de partição associados ao da quercetina sugerem que a menor atividade inibidora da peroxidação lipídica observada para o extrato e fração deve ser devido à menor interação dos seus componentes com compostos lipídicos.

4.1.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol do extrato, da fração de BC e dos compostos fenólicos AG, CAT, EC, EGCG e QG

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato e da fração em meio aquoso foi escolhido o ensaio de medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol em solução tampão glicina (0,1 M), pH 9,4. A xantina oxidase (XOD) oxida xantina a ácido úrico. Durante a reoxidação da XOD, o oxigênio molecular pode agir como um aceptor de elétrons, produzindo os ânions superóxido. Os ânions superóxido oxidam o monoânion do luminol formando o radical luminol que dependendo da concentração do O2 e o pH do meio leva a formação do α-hidroxihidroperóxido, responsável direto pela produção da quimioluminescência. A inibição da quimioluminescência emitida pela oxidação do luminol pode ocorrer pela inibição da enzima xantina oxidase ou pelo sequestro dos radicais superóxido e luminol formados (Robak e Gryglewski, 1988; Pietta, 2000).

A habilidade dos componentes do extrato e da fração de BC e dos compostos fenólicos isolados AG, CAT, EC, EGCG e QG identificados no extrato e na fração de cederem elétrons aos os radicais superóxidos e luminol formados no sistema xantina/ XOD/ luminol foi avaliada. O extrato, a fração e as substâncias isoladas foram capazes de reduzir a emissão da luminescência produzida pela oxidação do luminol de forma concentração-dependente. Os valores de IC₅₀ estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ de inibição da luz emitida no sistema xantina/XOD/luminol encontrado para o extrato, fração de BC e para os compostos identificados por CLAE: AG, CAT, EC, EGCG e QG. O valor de IC₅₀ foi obtido pela média de três determinações ±DP.

Amostras	Xantina/XOD/Luminol
$(IC_{50} \mu g/mL)$	(valores de IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato BC	0.23 ± 0.01
Fração BC	$0,10 \pm 0,004$
AG	0.30 ± 0.02
CAT	0.50 ± 0.02
EC	0.54 ± 0.02
EGCG	0.51 ± 0.01
QG	0.36 ± 0.01

A fração de BC demonstrou ser estatisticamente mais potente na diminuição da emissão da luz gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol do que o extrato de BC (p<0,05). Além disso, neste teste, o extrato e a fração de BC apresentaram menores valores de IC₅₀ do que os compostos isolados, mostrando que há um sinergismo entre os compostos fenólicos, o que proporciona ao extrato e a fração maior atividade antioxidante.

Em adição a estes experimentos, o extrato e a fração foram testados quanto a suas capacidades de inibir a enzima xantina oxidase (dados não mostrados), cujos resultados obtidos evidenciaram que componentes do extrato e da fração inibiram muito discretamente a enzima. Assim, os valores de IC₅₀ obtidos podem ser devido à inibição da enzima xantina oxidase, ao sequestro do radical superóxido formado e a atividade antioxidante dos componentes do extrato e da fração sobre o luminol oxidado.

Realizando este mesmo ensaio, Vicentini e colaboradores (2007), encontraram valor de IC₅₀ para quercetina de 11,3 µg/mL; Fonseca et al., (2010) encontraram 4,4µg/mL para o extrato de calêndula e Figueiredo et al., (2014) encontraram 3,77 µg/mL para o extrato de Garcinia brasiliensis. Pela comparação com estes dados, é possível observar o alto potencial antioxidante do extrato e da fração de BC assim como dos compostos fenólicos isolados: AG, CAT, EC, EGCG e QG.

Comparando-se os valores referentes às atividades antioxidante do extrato e da fração pelos diferentes métodos empregados é possível observar que a atividade antioxidante quantificada pelo método da inibição da quimioluminescência foi o que apresentou menor valor de IC₅₀. Estes dados sugerem que os componentes antioxidantes e/ou sequestradores de radicais livres presentes no extrato e na fração de BC podem ser mais hidrofílicos que lipofílicos. Sendo assim, estes resultados corroboram com os dados obtidos na análise do extrato e da fração por CLAE, onde a eluição dos compostos se dá até 20% de fase orgânica, mostrando que os compostos apresentam características mais polares do que apolares.

Pelos resultados obtidos até o momento, visando futura aplicação tópica, a fração de BC foi selecionada para ser incorporada em duas formulações tópicas, em seguida avaliadas quanto à penetração in vitro e in vivo dos compostos fenólicos.

Preparação e estudo de estabilidade preliminar de formulações tópicas 4.2 adicionadas da fração de média polaridade de BC

Os extratos vegetais, ricos em compostos polifenólicos, possuem diferentes estruturas químicas com diferentes pesos moleculares, alto poder antioxidante e valores variáveis de coeficiente de partição octanol/água, portanto, pode ser um desafio incorporá-los em formulações tópicas fotoquimioprotetoras. Ativos vegetais com potencial antioxidante apresentam um papel de destaque em formulações fotoquimioprotetoras, pois são capazes de modular alguns alvos na pele, como oxidação, inflamação, matriz extracelular e reparo do DNA (Angerhofer et al., 2009). A formulação fotoquimioprotetora deverá permitir a liberação e facilitar a penetração dos ativos através do estrato córneo, como também, deverá conferir estabilidade química e funcional a estes ativos.

A fração de média polaridade do extrato de BC, contendo os compostos AG, CAT, EC, EGCG e QG, capacidade doadora de H⁺ ao DPPH $^{\bullet}$ (IC₅₀ 1,51 ± 0,1 µg/mL), inibidora da peroxidação lipídica (IC₅₀ 1,4 \pm 0,15 μ g/mL) e inibidora da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol (IC₅₀ 0,10± 0,004 µg/mL), foi incorporada às formulações gel e emulgel, emulsão óleo em água gelificada por adição de polímero (Ajazuddin et al., 2013).

A formulação gel (F1F) foi preparada pela adição do polímero Aristoflex[®]AVC, sintetizado pela copolimerização do ácido sulfônico acriloidimetiltaurato e vinilpirrolidona na presença de amônia e agente de "Cross linking" e o emoliente esqualeno de origem vegetal extraído da oliveira previamente hidrogenado.

A formulação emulgel (F2F) foi preparada com a base comercial auto-emulsionante Hostacerin® SAF que contém ácidos graxos intermediários e o polímero do ácido sulfônico acrilidimetiltaurato e vinilpirrolidona (Aristoflex®) AVC. A associação de doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes permitem a preparação a frio de emulsões O/A (óleo em água), de caráter aniônico e estáveis. À emulsão emulgel foi também adicionado óleo de macadâmia constituído de triglicerídeos vegetais extraídos das nozes de macadâmia.

As formulações gel e emulgel adicionadas ou não da fração de BC foram submetidas aos estudos de estabilidade preliminar recomendado pelo Guia de estabilidade de produtos

cosméticos da ANVISA (2004). As amostras foram submetidas a seis ciclos de 24 horas a 45±2°C e 24 horas a 4 ± 2°C, durante 12 dias. As formulações gel e emulgel, depois dos 6 ciclos, mantiveram suas propriedades organolépticas, não sendo observado mudanças de cor, odor e aspecto e os valores de pH compatíveis com o pH cutâneo; 5,51 para a formulação gel e 6,0 para a formulação emulgel (Leonardi, Gaspar e Campos, 2002).

A atividade antioxidante das formulações submetidas ou não ao teste de estabilidade preliminar foi avaliada pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol. Os dados da figura 14 mostram que antes do estudo de estabilidade, as amostras da formulação gel adicionada da fração inibiram em 45% a quimioluminescência, valor este muito próximo aos 46% de inibição obtidos com a fração (F-controle). Este resultado sugere que os ingredientes da formulação gel não interferem no método de medida da atividade antioxidante por quimioluminescência da fração. Como também, podem indicar que não devem ter ocorrido interações entre os grupos químicos funcionais dos compostos da fração, responsáveis pela atividade antioxidante, com os ingredientes da formulação.

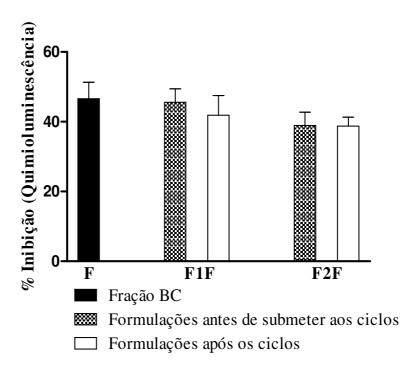


Figura 133: Porcentagens de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD calculadas para a fração de média polaridade e para as formulações gel (F1F) e emulgel (F2F), submetidas ao teste de estabilidade preliminar. Os resultados representam a média de três determinações ± DP. *p<0,05 ANOVA de uma via, seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni's.

Por outro lado, a formulação emulgel incorporada da fração, antes de ser submetida aos ciclos de temperatura, inibiu a quimioluminescência em 39%. Este dado, em relação aos 46% de inibição da quimioluminescência obtido pela fração, pode indicar que os componentes da formulação emulgel podem interferir nos resultados de luminescência da fração. No entanto, os dados de quimioluminescência obtidos para as formulações placebo gel e emulgel (formulações não adicionadas da fração) em relação às amostras correspondentes a 100% de quimioluminescência (controle) mostraram que não houve diminuição quimioluminescência (dados não mostrados). Isto indica que os ingredientes de ambas as formulações não interferiram com o método. Assim, a redução de 7% da atividade antioxidante observada para a formulação emulgel em relação à atividade da fração poderia ser devido às interações entre os grupos químicos funcionais dos compostos antioxidantes com os componentes da formulação.

Após as formulações gel e emulgel adicionadas da fração serem submetidas ao estudo de estabilidade preliminar, as porcentagens de inibição da quimioluminescência foram de 42% e 36%, respectivamente, e as análises estatísticas dos dados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) da porcentagem de inibição da quimioluminescência das formulações F1F e F2F antes e após de submetê-las aos ciclos. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as formulações F1F e F2F e a fração não veiculada.

Pelos resultados dos estudos de estabilidade preliminar pode-se considerar que as formulações F1F e F2F no período de 12 dias são físico-quimicamente e funcionalmente estáveis. Assim, as formulações preparadas para os próximos ensaios in vitro e in vivo foram usadas dentro do período dos 12 dias.

4.3 Estudo de penetração cutânea in vitro e in vivo dos componentes da fração incorporada às formulações tópicas

A pele é o maior e o mais complexo órgão do corpo humano e desempenha diferentes funções protetoras. A exposição excessiva da pele a agentes externos, sendo o mais agressivo a radiação UV solar, acumula danos a este órgão (Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006). Desta forma, formulações tópicas contra os efeitos deletérios da radiação solar devem promover a penetração dos ativos através do estrato córneo e acúmulo dos mesmos na camada basal da epiderme e na derme, para que esses ativos exerçam os seus efeitos farmacológicos. Por outro lado, os componentes dessas formulações não podem causar alterações irreversíveis à função barreira da pele, pois deverão ser administradas diariamente (Raut et al., 2012).

Para avaliar o efeito fotoquimioprotetor dos extratos vegetais a ação sinérgica dos seus vários componentes contribuem para a atividade farmacológica. Assim, a formulação deve promover penetração não de apenas de um dos componentes da fração, mas de vários componentes que podem ter diferentes propriedades físico-químicas. Desta forma, o desenvolvimento ou a preparação de formulações tópicas fotoquimioprotetoras deve ser acompanhado pelos estudos de penetração, os quais visam a quantificação dos compostos ativos na epiderme/derme da pele. Estes estudos são essenciais para o direcionamento do processo de desenvolvimento das formulações.

As formulações gel e emulgel adicionadas da fração de BC foram avaliadas quanto ao seu potencial de promover a penetração de componentes da fração na epiderme/derme da pele de orelha de porco por ensaios in vitro, nos quais a pele foi montada em célula de difusão de Franz bicompartimental, e por ensaios in vivo, onde as formulações foram aplicadas na pele de camundongos hairless.

Para realização dos experimentos de penetração cutânea in vitro, utiliza-se membrana sintética ou peles como meio de separação entre os dois compartimentos da célula de difusão de Franz. O ideal seria o uso da pele humana, porém, a dificuldade de obtenção restringe o seu uso. Dentre os modelos animais, a preferência pela pele de orelha de porco deve-se à facilidade de obtenção e à similaridade com a pele humana quanto às propriedades histológicas: densidade de folículos pilosos, espessura do estrato córneo e propriedades bioquímicas. Assim, sua utilização em estudos de permeação tem apresentado resultados comparáveis ao tecido humano (Dick e Scott, 1992; Moser et al., 2001; Sekkat, Kalia e Guy, 2002).

A confiabilidade dos resultados dos estudos de penetração in vitro e in vivo depende dos procedimentos de extração dos ativos da epiderme/derme empregados, e também, dos métodos de medida da quantidade de ativos penetrados que devem ser padronizados e validados.

A quantificação dos componentes da fração de BC que penetraram na epiderme/derme nos ensaios in vitro e in vivo foi realizada por medida da atividade antioxidante pela inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol e por CLAE. A medida da % de inibição da quimioluminescência foi importante, pois permitiu avaliar o aumento do potencial antioxidante da epiderme/derme após a aplicação das formulações gel e emulgel e os componentes penetrados não foram apenas detectados e/ou quantificados por CLAE.

4.3.1 Escolha do solvente para extração e medida da recuperação dos componentes antioxidantes da fração de BC na epiderme/derme da pele de orelha de porco

A extração dos compostos que penetram na pele é um procedimento que deve ser validado quanto ao parâmetro de recuperação. Desta forma, a escolha do solvente ideal deve estar baseada na maior porcentagem de recuperação dos componentes da fração pelo solvente e na menor quantidade de interferentes extraídos da pele.

A escolha do solvente extrator dos componentes da fração de BC da pele deve ser ainda mais criteriosa, pois além da utilização da CLAE será empregado o ensaio de medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência para quantificação do aumento da atividade antioxidante da pele pelos componentes da fração. A pele possui um complexo sistema antioxidante que inclui enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutationa redutase e peroxidase, e os antioxidantes de baixa massa molecular, o qual constitui de sequestradores de EROs sintetizados pela célula, glutationa reduzida, NADH e L-carnosina, produto do metabolismo, ácido úrico, e provenientes da alimentação, carotenos, tocoferóis, ácido ascórbico e ácido lipóico (Kohen, 1999). Assim, dependendo do solvente extrator escolhido pode ser extraído da pele maior quantidade de antioxidantes endógenos do que os componentes da fração, logo, estes antioxidantes endógenos interfeririam no ensaio de medida da quimoluminescência.

A escolha do solvente extrator foi baseada nos trabalhos realizados por Fonseca et al., (2010) que extraiu os componentes do extrato de calêndula em metanol 50%, Vicentini et al., (2009) e Casagrande et al., (2006) extraíram a quercetina em metanol e Marquele-Oliveira et al., (2007) também usou metanol para a extração dos componentes da própolis da epiderme/derme. Vicentini et al., (2009) e Marquele-Oliveira et al., (2007) avaliaram a quantidade de compostos penetrados na pele por medida da atividade antioxidante usando o radical livre DPPH e a inibição da quimioluminescência do sistema xantina/xantina oxidase/luminol, respectivamente, além da CLAE.

O metanol foi o solvente escolhido inicialmente para extração dos componentes da fração de BC, mas a atividade antioxidante dos componentes da fração recuperados da epiderme/derme da pele de orelha de porco foi muito baixa, quase igual àquela da pele não adicionada de fração. Este resultado indicou que os componentes da fração que penetraram foram pouco solúveis no metanol, ao contrário que Vicentini et al., (2009) e Marquele-Oliveira et al., (2007) observaram para quercetina e a própolis, respectivamente. Desta forma, soluções aquosas do metanol a 25%, 50% e 80% foram testadas e os resultados estão apresentados a tabela 9.

Tabela 9: Dados de recuperação e porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol obtidas para as amostras (pele adicionada da fração de BC) e para o branco (pele sem adição da fração de BC) extraídas com os solventes extratores metanol 25%, 50% e 80% e para a fração de BC (controle 100%). Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

Solvente	Inibição da Quimioluminescência (%)			Recuperação
extrator	Amostras	Branco	Fração	(%)
MetOH 25%	$72,6 \pm 1,5$	$68,2 \pm 2,5$	$25,4 \pm 5,0$	77,5
MetOH 50%	$69,6 \pm 2,7$	$67,2 \pm 3,9$	$37,0 \pm 2,9$	66,8
MetOH 80%	$42,4 \pm 7,9$	$11,0 \pm 2,7$	$37,4\pm1,3$	87,6

Os resultados mostram que o metanol 25 e 50% extraíram grande quantidade de componentes antioxidantes endógenos da pele, como pode ser verificado pelas porcentagens de inibição da quimioluminescência de 68,2 e 67,2%, obtidas para os brancos, pele sem adição da fração, respectivamente. Enquanto que a amostra de pele não adicionada da fração (branco) e extraída com metanol 80% mostrou uma inibição da quimioluminescência de 11%. Isto sugere que os componentes antioxidantes endógenos da pele são pouco solubilizados em metanol 80%.

A mesma quantidade da fração de BC adicionada à epiderme/derme foi diretamente solubilizada em metanol 25, 50 e 80% e os dados de quimioluminescência obtidos foram de 25,4, 37,0 e 37,4%, respectivamente. Estes dados sugerem que o metanol 25% pode não ter solubilizado totalmente os componentes antioxidantes da fração, como ocorreu com o metanol 50 e 80%. Os resultados de recuperação mostram que o metanol 80% é o solvente extrator de escolha. Este solvente extrai menos os antioxidantes endógenos da pele e é capaz de extrair melhor os componentes antioxidantes da fração na pele.

O procedimento de extração dos componentes da fração que penetraram na pele ficou assim estabelecido: a área da pele de 1,77 cm² foi triturada em 3mL de metanol 80%, sonicada em banho-ultrassom, agitada em vórtex e a suspensão centrifugada. A fração sobrenadante foi seca sob ar comprimido e o resíduo solubilizado em 500 µL de metanol 80%, seguido pela diluição de 10 vezes no solvente extrator escolhido, antes da medida da atividade antioxidante. Esse mesmo procedimento foi realizado para as amostras de epiderme/derme adicionada da fração, para o branco e fração de BC (controle).

Segundo Ribani et al., (2004) para avaliar a recuperação do procedimento de extração dos componentes que penetraram, a pele deve ser enriquecida com pelo menos três

concentrações conhecidas do composto isolado ou da fração. Desta forma, a capacidade de recuperação do procedimento foi avaliada pela adição das quantidades de 200, 50 e 20 µg da fração de BC à epiderme/derme da pele de orelha de porco, as quais correspondem a 10; 2,5 e 1% do total da fração de BC presente em 200 mg das formulações gel e emulgel que serão utilizadas nos estudos de penetração e nos ensaios de avaliação da eficácia fotoquimioprotetora *in vivo*. Os dados de recuperação do procedimento de extração baseados na medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Dados de recuperação e medidas da porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a fração (controle), para a pele sem adição da fração (branco) e para as amostras de epiderme/derme adicionadas de 200, 50 e 20 µg da fração de BC. Os resultados de inibição da quimioluminescência representam a média de três determinações ± DP.

Fração adicionada	Concentração meio	Inibição da Quimioluminescência (%)		Recuperação	
na pele (µg)	reacional (µg/mL)	Amostras	Branco	Fração	(%)
200	0,60	$33,9 \pm 2,3$	$2,6 \pm 0,5$	$58,1 \pm 3,8$	56
50	0,15	$42,4 \pm 2,2$	$8,3 \pm 1,6$	50.0 ± 0.9	73
20	0,06	$34,0 \pm 3,0$	$8,3 \pm 1,6$	$39,9 \pm 0,8$	70,5

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para cada nível de concentração da fração adicionada à pele (amostras) foi comparada à porcentagem de inibição gerada pela fração de BC nas concentrações anteriormente citadas e ao branco. A porcentagem de recuperação dos componentes antioxidantes foi de 56, 73 e 70,5% quando a fração foi adicionada à epiderme/derme nas concentrações de 200, 50 e 20 µg, respectivamente. As porcentagens de recuperação de 73 e 70,5% podem ser consideradas adequadas, visto que a recuperação de 80% foi considerada ideal para os estudos de penetração por Bronaugh et al., (1999).

4.3.2 Medida da quantidade de atividade antioxidante e de componentes da fração de BC penetrados na epiderme/derme após os estudos de penetração in vitro

O estudo de penetração in vitro foi conduzido por 12 horas após aplicação das formulações (200 mg) sobre a pele de orelha de porco em células de difusão vertical. Em seguida, o estrato córneo foi retirado por tape stripping com o objetivo de retirar o excesso

das formulações que não penetraram ou que apenas ficaram retidas no estrato córneo. Desta forma, a atividade antioxidante e a quantidade de compostos determinados por medida da inibição da quimioluminescência e por CLAE, respectivamente, serão relativas àquelas presentes na epiderme/derme da pele.

Os dados de medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência determinados na epiderme/derme das peles tratadas com as formulações gel e emulgel adicionadas ou não da fração estão apresentados na figura 15.

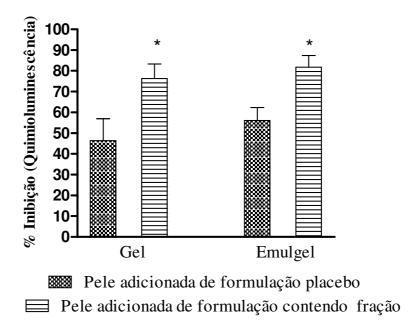


Figura 14: Porcentagem de inibição da quimioluminescência, gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol, pelos componentes da fração que penetraram na epiderme/derme da pele de orelha de porco tratadas com as formulações gel e emulgel adicionadas ou não de 1% de fração de BC, após 12 horas da aplicação das formulações. Os resultados representam a média de seis determinações ± DP. *p<0,05 diferença significativa comparado a pele adicionada da respectiva formulação placebo, usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A análise dos resultados obtidos mostrou que as formulações adicionadas da fração de BC proporcionaram aumento da atividade antioxidante na pele. A diferença entre a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida para a formulação gel e emulgel adicionadas da fração e suas respectivas formulações placebo foram de 30% e 26%, respectivamente. Estes dados evidenciam que as formulações proporcionaram a penetração de compostos com potencial para sequestrar o ânion superóxido ou de ceder elétrons ao radical luminol formado.

Ao comparar a porcentagem de inibição da quimioluminescência das formulações placebo com o aumento da porcentagem de inibição da quimioluminescência proporcionada pelas respectivas formulações adicionadas da fração, pode-se dizer que a formulação gel proporcionou um aumento de 66% da atividade antioxidante da pele de orelha de porco, enquanto o aumento proporcionado pela formulação emulgel foi de 46%.

Baseado nos dados cromatográficos da fração de BC, a análise por CLAE da epiderme/derme provenientes da pele de orelha de porco tratada com as formulações gel e emulgel adicionadas ou não da fração evidenciou que as formulações proporcionaram a penetração do AG, CAT, EC, EGCG e QG, além de outros componentes não identificados.

A tabela 14 mostra as quantidades dos polifenóis CAT, EGCG e QG presentes na epiderme/derme após 12 horas de experimento de penetração cutânea a partir das formulações gel e emulgel adicionadas de 1% da fração de BC. Infelizmente houve interferência dos componentes da pele de orelha de porco ou das formulações na quantificação da CAT. Este flavanol foi co-eluído com outros compostos da pele ou da formulação. A área do pico cromatográfico deste interferente foi bem menor que àquela da CAT. Por isso, foi possível calcular a área do pico da CAT pela subtração da área do interferente da área do pico relativo ao flavanol e mais o interferente.

Tabela 11: Quantidades determinadas por CLAE de compostos fenólicos identificados na fração de BC que penetraram na epiderme/derme da pele de orelha de porco tratada com formulações gel e emulgel adicionadas de 1% da fração, após 12 horas da aplicação. Os resultados representam a média de 6 determinações ± DP.

Padrões	Quantidades acumuladas dos componentes da fração na epiderme/derme da pele de orelha de porco (µg/cm²)	
	Gel	Emulgel
CAT	$21,72 \pm 5,2$	$21,58 \pm 5,97$
EGCG	$0,40 \pm 0,09$	0.19 ± 0.02
QG	0.45 ± 0.06	$0,10 \pm 0,02$

Os resultados mostram que as formulações gel e emulgel foram capazes de reter na epiderme/derme da pele de orelha de porco aproximadamente as mesmas quantidades de CAT, 21,72 e 21,58 µg/cm², respectivamente. Isto pode ser devido ao tempo de 12 horas de exposição, que pode ter sido suficientemente longo para que o máximo de penetração tenha sido atingido para as duas formulações. Abla e Banga, (2013) avaliaram a penetração da CAT na epiderme/derme de pele de orelha de porco tratada com 200 µL de solução saturada de CAT em propilenoglicol/água (3:1), usando célula de difusão de Franz. Após 24 horas da

aplicação, a quantidade de CAT penetrada foi de 6 µg, cerca de 3 vezes menor que as observadas para as formulações gel e emulgel adicionadas da fração de BC. Estes resultados evidenciam a importância da veiculação da fração de BC nas formulações gel e emulgel para promover a penetração deste polifenol em pele de orelha de porco.

Ao comparar as duas formulações tópicas, observa-se que as quantidades de EGCG e QG liberadas pela formulação gel na epiderme/derme após 12 horas de estudo foi cerca de duas e quatro vezes maior do que a quantidade liberada pela formulação emulgel, respectivamente.

Dal Belo et al., (2009) incorporaram 6% do extrato de Chá verde em formulações à base de Hostacerin SAF®, os autores relataram que a quantidade de EGCG penetrada na epiderme e na derme humana em experimento in vitro conduzido por 24 horas foi de 0,54 μg/cm² e 0,38 μg/cm², respectivamente. Embora Dal Belo *et al.*, (2009) tenham aplicado uma formulação mais concentrada em teor de ativos e empregado um maior tempo de experimento do que o presente estudo, a formulação gel proposta foi capaz de prover a penetração de uma quantidade EGCG próxima àquela obtidas pelos autores.

Assim, os resultados de penetração obtidos por CLAE confirmam o aumento da atividade antioxidante na epiderme/derme da pele de orelha de porco, observado através do aumento da porcentagem de inibição da quimioluminescência proporcionada pela formulação gel adicionada da fração de BC, que foi 20% maior do que a atividade antioxidante obtida pela formulação emulgel.

O ideal é que o antioxidante apresente boa permeabilidade no estrato córneo e que seja capaz de alcançar as camadas mais profundas da pele (Marti-Mestres et al., 2007). Desta forma, pode-se dizer que a formulação gel foi eficiente em promover a penetração dos compostos antioxidantes da fração de BC na pele de orelha de porco, sendo a CAT o composto majoritário identificado neste estudo de penetração cutânea in vitro. Portanto, a fim de reforçar os estudos de penetração in vitro, foi feito o estudo de penetração in vivo da formulação gel adicionada de 1% da fração de BC e da formulação gel adicionada de 1% de CAT.

4.3.3 Medida da quantidade de atividade antioxidante e de componentes da fração de BC ou da CAT penetrados na epiderme/derme após os estudos de penetração in vivo

A pele de camundongos sem pelos tem sido comumente utilizada nos estudos de penetração cutânea. A vantagem de se utilizar esses animais baseia-se principalmente no fato

deles serem animais de pequeno porte, de fácil manuseio e de custo relativamente baixo. A ausência de pelos mimetiza a pele humana e o fato de não ser necessária a remoção dos pelos evita o risco de lesão ao tecido cutâneo (Godin e Touitou, 2007).

Através de testes in vivo utilizando o organismo do animal como um todo, é possível observar a influência de outros parâmetros na absorção de ativos, tais como o metabolismo cutâneo e a presença de circulação sanguínea, que influenciam grandemente o transporte de ativos, principalmente os lipofílicos, até a derme (Moser et al., 2001). Além disso, é de grande importância para os estudos de eficácia fotoquimioprotetora garantir a presença dos compostos antioxidantes na epiderme/derme do animal no início da irradiação.

Neste estudo, a formulação gel adicionada da fração ou da CAT teve a sua capacidade de promover a penetração dos ativos na epiderme/derme da pele de camundongos avaliada por medida da inibição da quimioluminescência e por CLAE

Os estudos de penetração com a formulação gel foram conduzidos por duas horas na pele do dorso de camundongos sem pelo. As amostras da epiderme/derme de peles tratadas com a formulação gel placebo (P1), a formulação gel adicionada da fração (F1F) e com a formulação gel adicionada da catequina (F1 CAT) mostraram porcentagens de inibição da quimioluminescência de 19%, 63% e 38%, respectivamente (figura 16).

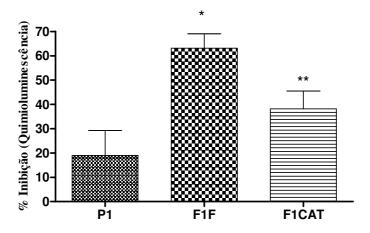


Figura 15: Dados de porcentagem de inibição da quimioluminescência, gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol, obtidos para as amostras de epiderme/derme provenientes da pele de camundongos sem pelo tratada por duas horas com a formulação gel adicionada de 1% da fração BC (F1F) ou 1% de categuina (F1 CAT) e a formulação gel placebo, não adicionada de ativos (P1). Os resultados representam a média de três determinações ± DP. *, **p<0,05 diferença significativa comparada à pele adicionada da formulação placebo (P1), usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A formulação gel adicionada da fração (F1F) proporcionou o aumento de 232% da atividade antioxidante da epiderme/derme quando comparado ao grupo placebo (P1). Este resultado mostra que a formulação F1F proporcionou aumento do potencial antioxidante da epiderme/derme da pele do camundongo 3,5 vezes maior que àquela proporcionada pela mesma formulação na epiderme/derme da pele de orelha de porco. Este aumento de atividade antioxidante pode estar relacionado ao aumento de penetração de compostos antioxidantes.

A formulação gel adicionada da CAT também proporcionou aumento do potencial antioxidante da pele dos camundongos e esse aumento foi de apenas 100% em relação ao grupo placebo (P1). Com isso, pode sugerir que a CAT seja responsável por mais de 40% do aumento da atividade antioxidante fornecida pela fração de BC na pele do camundongo. Os resultados obtidos nos experimentos in vivo confirmam a capacidade da formulação gel de promover a penetração cutânea de compostos antioxidantes da fração de BC e da CAT isolada.

Os estudos de penetração cutânea in vivo foram acompanhados também pela análise por CLAE. Os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos da epiderme/derme das peles do dorso de camundongo tratadas por duas horas com as formulações gel placebo e gel adicionada da fração mostram que houve a penetração dos polifenóis identificados: AG, CAT, EC, EGCG e QG e de compostos não identificados como detectado nos estudos de penetração *in vitro* com pele de orelha de porco (dados não mostrados).

Pelas áreas dos picos observa-se que a penetração dos compostos identificados e não identificados foi maior na pele de orelha de porco, provavelmente, devido ao maior tempo de penetração empregado, 12 horas para os estudos em pele de orelha de porco contra 2 horas em pele de camundongo sem pelos. Nos estudos de penetração in vivo, as quantidades de CAT, EGCG e QG penetradas na epiderme/derme foi de 12,98; 0,17 e 0,16 µg/cm², respectivamente, para a formulação gel adicionada da fração (Tabela 12).

Tabela 12: Quantidades determinadas por CLAE dos compostos fenólicos identificados na fração de BC que penetraram na epiderme/derme da pele de camundongo sem pelo tratada com as formulações gel adicionadas de 1% da fração BC ou 1% de CAT, após 2 horas da aplicação. Os resultados representam a média de 3 determinações ± DP.

Padrões	Quantidade acumulada dos ativos na epiderme/derme da pele dos camundongos sem pelos (μg/cm²)		
	Gel+Fração BC	Gel+CAT	
CAT	$12,98 \pm 0,65$	$23,8 \pm 4,05$	
EGCG	0.17 ± 0.02	-	
QG	$0,16 \pm 0,01$	-	

Por outro lado, a quantidade de CAT penetrada na epiderme/derme da pele de camundongo sem pelos tratada com a formulação gel adicionada de 1% de CAT foi de 23,8 μg/cm² (tabela 12), semelhante àquela obtida para formulação gel + fração em pele de orelha de porco $(21.72 \pm 5.2 \,\mu\text{g/cm}^2)$ (tabela 11). Estes dados sugerem que a concentração de CAT na formulação pode não ter influenciado a penetração, pois a quantidade de CAT aplicada sob a pele de camundongo foi cerca de 3,9 vezes maior que àquela aplicada à pele de orelha de porco.

Entretanto, uma vez que as quantidades penetradas dos ativos identificados e não identificados na pele da orelha de porco foram maiores que a da pele de camundongo, como explicar a maior atividade antioxidante na pele de camundongo. A pele de camundongo mostrou ter menor quantidade de antioxidantes endógenos que interferem com a medida da atividade antioxidante por quimioluminescência. A quimioluminescência do placebo (pele de camundongo + formulação placebo) foi cerca de 136% menor que a do placebo na pele de orelha de porco. Em adição, como a quantidade de antioxidantes penetrada foi maior na pele de orelha de porco a porcentagem de inibição da quimioluminescência obtida foi de 80%, que é a porcentagem máxima de inibição independente da concentração da fração de BC no meio reacional. Isto sugere que a medida da atividade antioxidante na pele da orelha de porco tratada com a formulação gel + fração foi subestimada. Para melhor quantificação o extrato metanólico obtido da pele deveria ter sido mais diluído antes do ensaio de quimioluminescência.

Fotoestabilidade da fração de BC em propilenoglicol 50% e da formulação gel 4.4 adicionada da fração

Os filtros UV orgânicos comerciais incorporados aos protetores solares são caracterizados pelo seu estreito espectro de absorção e por sua baixa fotoestabilidade. Por isso, os produtos naturais têm despertado grande interesse. Polifenóis são particularmente promissores por absorverem um largo espectro de radiação UV solar incluindo as radiações UVA e UVB. Além disso, podem penetrar na epiderme/derme e absorver a radiação UV que atingem essas camadas, podem também reduzir o estresse oxidativo e atuarem como antiinflamatórios e agentes reguladores da sinalização celular (Gaspar e Maia Campos, 2006; Serpone, Dondi e Albini, 2007; Nichols e Katiyar, 2010; Hojerova, Medovcikova e Mikula, 2011)

A fotoestabilidade é um parâmetro essencial para caracterizar a eficácia e a segurança de formulações tópicas fotoquimioprotetoras, que estão expostas à radiação UV. A luz pode por em perigo a integridade dos ativos na formulação por iniciar a degradação dos mesmos e pode exercer efeitos colaterais por meio das interações fototóxicas. A decomposição dos ativos da formulação induzida pela luz pode reduzir o seu poder fotoquimioprotetor e pode provocar fenômenos de fotoalergia e fototoxidade devido à interação dos produtos de fotodegradação com adjuvantes da formulação, componentes da pele e formação de novas moléculas com propriedades tóxicas desconhecidas (Gilaberte et al., 2003; Kullavanijaya e Lim. 2005).

A fotoestabilidade dos compostos da fração veiculada em propilenoglicol 50% (P50%) foi avaliada quanto à atividade antioxidante pelo ensaio da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD e pelo perfil cromatográfico por CLAE. Já a fotoestabilidade dos compostos da fração adicionados na formulação gel foi avaliado apenas pela atividade antioxidante. Para este teste foi utilizada a dose de radiação UVB utilizada nos testes com camundongos sem pelos (2,87 J/cm²) com o intuito de garantir a fotoestabilidade dos compostos antioxidantes nos testes in vivo, e consequentemente nos testes in vitro, nos quais serão empregados a dose de 20 mJ/cm² de radiação UVB.

A solução de propilenoglicol 50% e a formulação gel adicionadas da fração de BC e submetidas à radiação UVB não apresentaram diferença estatisticamente significativa (p>0,05) quanto à atividade antioxidante, quando comparada às mesmas sem irradiar (dados não mostrados), evidenciando a fotoestabilidade da fração sob a quantidade de radiação empregada.

Em adição, as soluções irradiadas e não irradiadas da fração solubilizada em solução de P 50% foram analisadas qualitativamente e quantitativamente por CLAE (dados não mostrados). Os perfis cromatográficos mostraram que na fração exposta à radiação UVB não houve aparecimento de novos picos, sugerindo que não houve degradação dos ativos. As concentrações dos ativos CAT, EGCG e QG presentes na fração de BC após irradiação UVB não apresentaram diferença estatisticamente significativa (p>0,05) quando comparado à fração não irradiada indicando a fotoestabilidade desses ativos da fração exposta à radiação UVB (2,87 J/cm²).

Portanto, a fração de BC e o padrão CAT foram selecionados para serem avaliados quanto ao potencial fotoquimioprotetor em cultura de queratinócitos, em seguida, avaliados quanto ao potencial fotoquimioprotetor in vivo em camundongos sem pelos, frente à radiação UVB.

4.5 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vitro da fração de BC e da CAT em cultura de queratinócitos humanos

A fotoquimioproteção consiste no uso de substâncias químicas capazes de prevenir ou combater os efeitos adversos da RUV na pele (F'guyer, Afaq e Mukhtar, 2003). Antioxidantes, principalmente de origem vegetal, têm recebido considerável atenção como agentes fotoquimioprotetores para uso humano. Alguns trabalhos já demonstram a eficácia antioxidante, antiinflamatória e/ou modificadora da sinalização celular de extratos vegetais e/ou de substâncias isoladas de plantas. Assim, outra possibilidade da fotoquimioproteção, em adição ao uso de protetores solares, seria a utilização de formulações tópicas adicionadas de antioxidantes e anti-inflamatórios naturais antes da aplicação dos protetores solares na pele e antes da exposição à radiação solar (Katiyar, Afaq, Azizuddin, et al., 2001; Vayalil, Elmets e Katiyar, 2003; Casagrande et al., 2006; Nichols e Katiyar, 2010).

Os modelos atualmente utilizados para avaliação da fotoquimioproteção consistem na utilização de culturas de células em monocamadas (fibroblastos e queratinócitos), camundongos sem pelos, biópsia de pele humana e pele humana reconstruída (Backvall et al., 2002; Adhami et al., 2008; Fonseca et al., 2010; Brohem et al., 2011). O potencial fotoquimioprotetor da fração de BC e da CAT foi avaliado em cultura de queratinócitos da linhagem HaCaT (in vitro), enquanto que a formulação gel adicionada da fração ou da CAT teve seu efeito fotoquimioprotetor avaliado em pele de camundongos sem pelo (in vivo) expostos à radiação UVB (2,87J/cm²) e os seguintes parâmetros foram avaliados: determinação dos níveis da peroxidação lipídica, quantificação dos marcadores do processo inflamatório IL-1β, IL-6 e NFκB, determinação dos níveis da glutationa reduzida, da atividade da mieloperoxidase e da metaloproteinase MMP-9.

4.5.1 Avaliação da citotoxidade da fração de BC e da CAT em cultura de queratinócitos

A cultura de células é uma importante ferramenta de estudo para investigar as interações específicas que ocorrem em nível celular e molecular. As células cultivadas podem crescer e sobreviver mais facilmente que os tecidos e quando cultivadas in vitro podem manter suas características e funções originais (Pizzoferrato et al., 1994).

A avaliação da citotoxidade in vitro pode ser empregada para avaliar múltiplos parâmetros, incluindo a medida de morte celular, morfologia, metabolismo, agregação, desagregação e permeabilidade da membrana celular (Tan et al., 2008). Os queratinócitos são

as células predominantes na epiderme. A função dos queratinócitos é diversificada e inclui a formação de uma barreira mecânica, defesa imunológica e impede a perda de água do organismo. Disfunções nos queratinócitos levam a muitas doenças comuns da pele, como a psoríase, feridas cutâneas crônicas e câncer de pele (Gniadecki, 1998).

A avaliação da citotoxidade da fração de BC e da CAT foi realizada em cultura de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT, utilizando o método vermelho neutro que é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis. O corante vermelho neutro é solúvel em água e passa através da membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hifrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares resultando no decréscimo da captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre as células viáveis e danificadas pela medida da intensidade da cor da cultura celular (Borenfreund e Puerner, 1985).

A citotoxidade dos queratinócitos tratados com diferentes concentrações da fração de BC e de CAT foi expressa pelo percentual de células viáveis em relação ao controle (C), 100% de viabilidade, queratinócitos não tratados com a fração ou CAT. Observou-se redução da viabilidade quando as células de queratinócitos foram tratadas com concentrações crescentes da fração (figura 17).

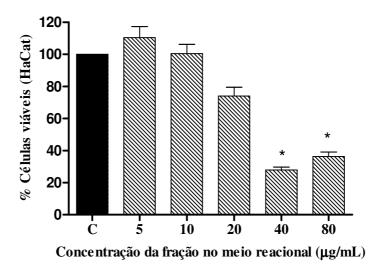


Figura 16: Percentual de viabilidade dos queratinócitos tratados com concentrações crescentes da fração de BC por 24h, empregando o ensaio do vermelho neutro. Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados ± DP. *p<0,05 diferença significativa comparado ao controle (C-100% células viáveis), usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A fração de BC na concentração de 40 µg/mL no meio de cultura reduziu cerca de 70% a viabilidade dos queratinócitos, comparado ao controle sem tratamento (C), considerado 100 % de células viáveis. Esta concentração foi cerca de 26 a 400 vezes maior que àquelas que apresentaram atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH• (IC₅₀ 1,51 µg/mL), inibidora da peroxidação lipídica (IC₅₀ 1,4 µg/mL) e inibidora da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol (IC₅₀ 0,10 μg/mL).

O solvente utilizado no preparo das amostras (DMSO) não causou redução na viabilidade das células de queratinócitos (dados não mostrados) evidenciando que a toxidade observada foi referente aos componentes da fração. Para os futuros testes as células de queratinócitos serão tratadas com concentrações iguais ou menores que 10 µg/mL, para assegurar 100% da viabilidade celular.

Com relação à citotoxidade da CAT foi observado que até 20 µg/mL, a maior concentração estudada, as células de queratinócitos tratadas com este padrão apresentaram 100% de viabilidade celular (dados não mostrados).

4.5.2 Estudo do efeito da fração de BC e da CAT na viabilidade celular de queratinócitos expostos à radiação UVB

As células de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram expostas a diferentes quantidades de radiação UVB (15-50 mJ/cm²) para a construção de uma curva de viabilidade celular em função da dose de irradiação utilizando o ensaio do vermelho neutro (figura 18).

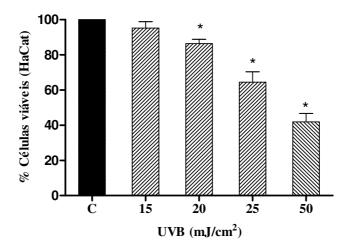


Figura 17: Percentual da viabilidade celular dos queratinócitos da linhagem HaCaT submetidos à crescentes doses de radiação UVB, empregando o ensaio do vermelho neutro. Os resultados representam a média de 2 experimentos isolados ± DP (n = 6 determinações). *p<0,05 diferença significativa comparado ao controle (C-100% células viáveis), usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A viabilidade dos queratinócitos expostos a diferentes quantidades de radiação UVB foi avaliada como mostra a figura 18. Observou-se uma diminuição gradual da viabilidade das células HaCaT em função do aumento da quantidade de radiação. Houve diminuição de 5, 14, 35 e 60% da viabilidade quando as células foram expostas a 15, 20, 25 e 50 mJ/cm², respectivamente.

Em estudos utilizando queratinócitos da linhagem HaCaT expostos à radiação UVB, Mammone *et al.*, (2000) e Farrukh *et al.*, (2014) demonstraram que a dose de 20 mJ/cm² levou a uma perda de aproximadamente 20% da viabilidade celular, próximo à resposta observada no presente estudo.

Associando os resultados do estudo da viabilidade das células HaCaT sob a radiação UVB e as recomendações do guia de genotoxidade do ICH (2011), que menciona que a citotoxidade em células de mamífero não pode ser superior a 50%, pois os resultados obtidos poderiam representar a ação não só do ativo em estudo, mas também dos seus metabólitos, escolhemos para os estudos de fotoquimioproteção *in vitro* a dose de radiação UVB de 20 mJ/cm².

O protocolo de tratamento das células HaCaT a ser utilizado para avaliar o potencial fotoquimioprotetor da fração de BC e da CAT compreendeu no tratamento destas células por 24 horas com diferentes concentrações sub-tóxicas de ativos. Após este período, as células foram lavadas e expostas a radiação UVB (20 mJ/cm²) na presença dos ativos em tampão. Para saber se a fração de BC e a CAT expostas a esta radiação poderiam gerar produtos citotóxicos às células, o efeito da radiação nas células tratadas foi avaliada pela medida da viabilidade celular (figura 19).

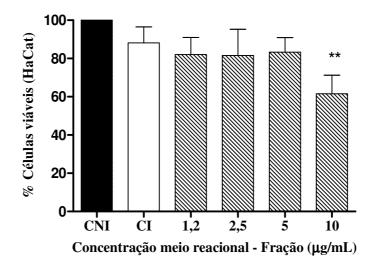


Figura 18: Porcentagem de viabilidade celular dos queratinócitos da linhagem HaCaT prétratados com soluções da fração de BC em diferentes concentrações sub-tóxicas e submetidos à radiação UVB (20 mJ/cm²) na presença dos compostos fenólicos. Os resultados representam a média de 2 experimentos isolados ± DP. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado UVB e as concentrações da fração utilizadas no tratamento. **p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (UVB), usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A solução da fração de BC 10 µg/mL reduziu a viabilidade dos queratinócitos em 27% quando comparado ao grupo controle irradiado (CI). Isso mostra que componentes da fração podem ter sofrido fotodegradação e os produtos gerados podem ter sido tóxicos às células.

Com relação à CAT, a viabilidade dos queratinócitos tratados por 24 horas com soluções de CAT em diferentes concentrações (20 e 10 µg/mL) e irradiadas na presença deste polifenol não foi alterada (dados não mostrados). Isto sugere que a CAT, em diferentes concentrações, sob a radiação UVB (20 mJ/cm²) não sofre fotodegradação, ou se sofre os produtos gerados não levaram a diminuição da viabilidade da células HaCaT.

Wu et al., (2006) observaram que a CAT na concentração de 29 μg/mL (100μM) protegeu em 80% a viabilidade de queratinócitos pré-tratados com o polifenol e expostos a 50 mJ/cm² de radiação UVB. O efeito protetor da CAT observado pelos autores pode ser devido a quantidade de radiação empregada, os autores utilizaram uma dose que provocou 50% de morte celular. Desta forma, torna-se possível observar o efeito protetor do ativo contra a morte celular induzida pela radiação UVB.

4.5.3 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vitro por medida da peroxidação lipídica

Quando espécies reativas de oxigênio geradas pela exposição à radiação UV atacam lipídios da membrana, o radical peroxila é formado e a partir deste, cada vez mais radicais peroxila podem ser formados, resultando numa reação em cadeia que pode ameaçar a integridade estrutural da membrana e levar ao processo de peroxidação lipídica (Pinnell, 2003; Svobodova et al., 2007). A peroxidação lipídica pode ser quantificada pela medida do metabólito secundário, malondialdeído (MDA), mutagênico e carcinogênico (Marnett, 1999), gerado no interior das células ou no meio de cultura, pois as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico são liberadas das células durante a irradiação (Morliere et al., 1991).

Os resultados apresentados referem-se às porcentagens de MDA presentes no meio de cultura 3 horas após a irradiação. Ao comparar o grupo controle de células não irradiadas (CNI) com o grupo controle de células irradiadas (CI), é possível verificar que a radiação UVB induziu um aumento estatisticamente significativo (p<0,05) nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no meio de cultura dos queratinócitos, como mostra a figura 20.

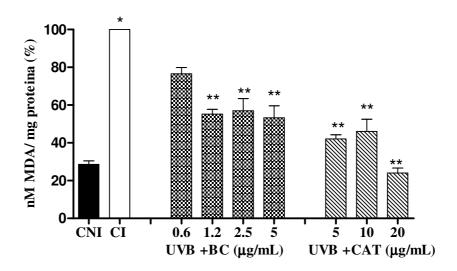


Figura 19: Porcentagem de MDA gerada em queratinócitos da linhagem HaCaT expostos à radiação UVB na presença dos compostos antioxidantes. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado UVB e as concentrações da fração e da CAT utilizadas no tratamento. Os resultados representam a média de três experimentos ± DP. * p<0,05 diferença significativa comparado ao CNI, e **p<0,05 diferença significativa comparado ao CI, usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

Como visto na figura 20, o tratamento das células HaCaT com a fração de BC resultou na diminuição dos níveis de MDA induzidos pela radiação UVB. Na faixa de 1,2 a 5 µg/mL a fração inibiu a peroxidação lipídica em torno de 45%, comparado ao CI. A CAT inibiu a geração de peróxidos lipídicos induzidos pela radiação UVB em 58, 54 e 76% nas células tratadas com 5, 10 e 20 µg/mL, respectivamente, promovendo assim o retorno dos queratinócitos aos níveis basais da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica induzida pela radiação UV na pele é potencialmente prejudicial para função celular, tendo efeitos citotóxicos, estimuladores ou efeitos inibitórios sobre enzimas e danos na membrana celular, além de efeitos cancerígenos (Shindo *et al.*, 1994). Os resultados demonstram que a fração de BC e a CAT previnem a formação do MDA, produto da peroxidação lipídica induzido por radicais livres ou ativados por espécies reativas de oxigênio quando as células são expostas a radiação UV (Santa-María *et al.*, 2010).

A fração de BC, rica em CAT, e a CAT isolada podem inibir a peroxidação lipídica induzida por Fe²⁺ pela neutralização direta das EROs geradas pela exposição a radiação UVB e pela capacidade da CAT quelar metais de transição (Fe²⁺) que catalisam a peroxidação lipídica (Verstraeten *et al.*, 2003). Além disso, um terceiro mecanismo de natureza físico-química poderia estar envolvido da inibição da peroxidação lipídica. Segundo Wesołowska *et al.*, (2009), flavanóis como a CAT e a EC podem interagir com grupos polares da cabeça dos fosfolipídios, esta interação pode levar a diminuição da fluidez das membranas celulares, dificultando a exposição de grupos susceptíveis à oxidação, ou pode restringir o acesso de oxidantes à bicamada lipídica, diminuindo assim, a propagação da oxidação lipídica.

A fração de BC é enriquecida de compostos fenólicos, estes por sua vez inibem as reações de cadeia que propagam a peroxidação lipídica e sequestram os radicais peroxila. Os compostos fenólicos do chá verde, por exemplo, epigalocatequina (EGC), EGCG, EC, epicatequina galato (ECG) e CAT protegem a pele de reações adversas causadas pela exposição à radiação UV, incluindo os danos da pele, eritema e peroxidação lipídica (Rice-Evans, 1999). Além da CAT, EC, EGCG, a fração de BC apresenta em sua constituição o AG, eficiente no sequestro do radical peroxila (Yilmaz e Toledo, 2004; Santa-María *et al.*, 2010).

4.5.4 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vitro* pela quantificação dos marcadores do processo inflamatório

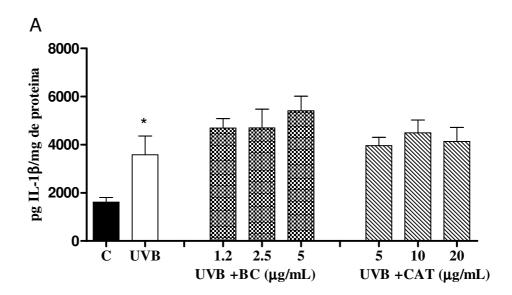
Os queratinócitos apresentam função imunológica e desempenham um importante papel na resposta inflamatória à irradiação UV na pele humana através da liberação de vários

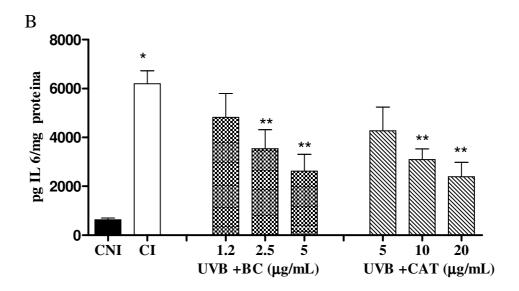
ativadores fisiológicos, como as citocinas derivadas das células epidermais (Ullrich, 1995; Kondo, 1999; Gupta et al., 2006; Ishida e Sakaguchi, 2007).

A inflamação cutânea induzida pela radiação UV é um processo complexo que inclui uma cascata de eventos interligados. A exposição da pele à radiação UV aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) –α, interleucina IL-1 e IL-6, que posteriormente ativam o fator de transcrição NF-kB (Mukhtar e Elmets, 1996). Adicionalmente, a regulação da expressão de genes das citocinas é dependente da atuação do NF-κB, que estimula a produção de metaloproteinase 1 (MMP-1), eventualmente levando à degradação das fibras de colágeno (Barchowsky, Frleta e Vincenti, 2000; Sun, Malacinski e Yokota, 2002; Chung, 2003; Tanaka et al., 2007). Assim, níveis elevados de citocinas próinflamatórias contribuem para o processo de promoção de tumores (Mukhtar e Elmets, 1996).

Portanto, neste trabalho os queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram escolhidos para avaliação in vitro da eficácia fotoquimioprotetora da fração de BC e da CAT. As culturas de células tratadas e não tratadas com as soluções da fração de BC ou da CAT foram expostas ou não à radiação UVB de 20 mJ/cm². A ativação da resposta inflamatória pela radiação e o efeito da fração de BC e da CAT sobre esta resposta foram avaliadas por medida das quantidades das interleucinas IL-1β e IL-6 e do NFκB por ensaio de ELISA.

Os dados da figura 21A mostram que a radiação UVB induziu o aumento de 120% da quantidade de IL-1\beta, no entanto as soluções da fração de BC nas concentrações de 1,2 a 5 ug/mL, e da CAT 5 a 20 μg/mL não foram capazes de diminuir as quantidades de IL-1β sintetizada por ação da radiação sobre a célula.





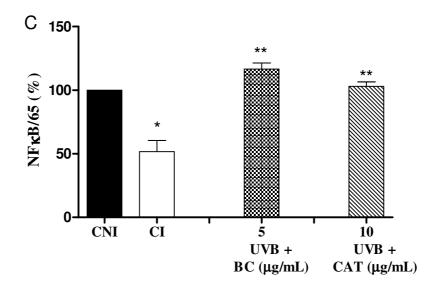


Figura 20: Medida das quantidades de IL-1β (A), IL-6 (B) e NF-kB/65 (C) em cultura de queratinócitos expostos à radiação UVB tratados ou não com os compostos antioxidantes. Onde, CNI= controle não irradiado, CI = controle irradiado UVB e as concentrações da fração e da catequina utilizadas no tratamento. Os resultados representam a média de dois experimentos ± DP. * p<0,05 diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), e **p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (CIB), usando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A atividade biológica da IL-1 é medida por duas citocinas produzidas por dois genes diferentes, IL-1 α e IL-1 β , as quais se ligam ao mesmo receptor. A IL-1 presente na forma latente na célula é liberada logo após a radiação pela interação da sua molécula ao receptor ou pela ação direta da radiação UVB. Ambas as IL-1α e IL-1β são secretadas pelos queratinócitos, mas a forma predominante liberada é a IL-1α. Além disso, grande quantidade da IL-1α permanece associada à membrana plasmática e pode exercer as suas funções por estimular as células pela interação direta célula-célula (Burger et al., 2006).

A ausência de efeito da fração de BC e da CAT observada na figura 21A pode ser devido à quantidade de IL-1\beta liberada pelos queratinócitos. A quantidade de radiação UVB de 20 mJ/cm² pode não ter sido suficiente para induzir uma alta diferença na secreção de IL-1β, entre os controles não-irradiado e irradiado, e assim não foi possível observar a proteção das células tratadas com os ativos. Este fato pode ser confirmado pelo efeito inibidor da liberação da IL-6 observado para os queratinócitos tratados com a fração de BC ou CAT e expostos a 20 mJ/cm² de radiação UVB (figura 21B). A quantidade de IL-6 liberada pelos queratinócitos expostos a 20 mJ/cm² de radiação UVB foi cerca de 834% maior que aquela liberada sem estímulo. O resultados mostram que a quantidade de IL-6 liberada foi cerca de 684% maior que a quantidade liberada de IL-1β pela mesma célula e nas mesmas condições de estímulo.

O tratamento dos queratinócitos com a fração de BC foi capaz de inibir o aumento de IL-6 induzida pela radiação UVB em 43 e 57% nas concentrações 2,5 e 5 μg/mL, respectivamente, comparado ao grupo irradiado (UVB). A CAT proporcionou uma inibição da citocina IL-6, próxima àquela fornecida pela fração de BC, cerca de 50 e 62%, porém em maiores concentrações, 10 e 20 µg/mL, respectivamente.

A IL-6 é uma citocina multifuncional que desempenha papel central no sistema de defesa devido a sua grande atividade imunológica, bem como possui potente habilidade para induzir a resposta de fase aguda. É normalmente produzida e liberada espontaneamente por queratinócitos em cultura e expressa em baixos níveis, exceto durante infecção, traumas ou outros estresses como radiação solar. É também estimulada por outras interleucinas como IL-1α, IL-1β, TGF (Grone, 2002; Muller e Meineke, 2007).

Um dos eventos iniciais da exposição das células à radiação solar é a ativação dos receptores de superfície do fator de crescimento e dos receptores das citocinas, TNF-α e IL-1. A radiação inicia a ativação dos receptores, sua internalização e subsequentemente, múltiplas cascatas de sinalização celular são ativadas. A ativação dos membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) conduz a ativação dos fatores de transcrição proteína 1 (AP1) e o NF-κB, que consequentemente regulam a expressão de genes das MMPs e das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α, respectivamente. As EROs podem ativar também a sinalização das MAPK, a expressão do AP-1 e NFκB, consequentemente a "up" regulação da produção das citocinas IL-6 e TNF-α (Xu e Fisher, 2005; Cooper e Bowden, 2007; Ray, Huang e Tsuji, 2012).

Devido à ativação direta dos receptores da superfície celular pela radiação UVB e pelo aumento de EROs intracelular ocorre a ativação da cascata de sinalização celular e a super produção da IL-6, como foi observado em nossos experimentos. Estes resultados sugerem que os componentes da fração de BC e a CAT podem ter se ligado aos receptores de superfície das interleucinas, impedido parcialmente a ativação desses receptores pela radiação UV ou pelas próprias moléculas de IL-1, TNF-α ou mesmo IL-6, já liberada. Em adição, podem também ter seqüestrado as EROs impedindo a ativação das proteínas da família MAPK.

Diversos estudos relatam que o pré-tratamento com EGCG reduz significativamente os níveis destas citocinas pró-inflamatórias induzidas pela radiação UVB em cultura de queratinócitos (Xia et al., 2005; Luo et al., 2006). Além disso, o AG diminui a produção de TNF-α e IL-6 em células de mastócitos humanos (Kim et al., 2006). A EC diminui a expressão de TNF-α, IL-1 α e IL-6 em macrófagos (Ramiro et al., 2005). Assim sendo, a fração e a CAT demonstram mais uma vez a potencial aplicabilidade como agentes fotoquimioprotetores.

No presente trabalho, também foi quantificado, por ensaio de ELISA, o fator de transcrição NF-κB/65 inativo em cultura de queratinócitos humanos (fig. 21C). A família de proteínas do fator de transcrição NF-κB desempenha um papel crucial em uma variedade de processos biológicos, notadamente na resposta inflamatória e imune, e também está envolvido em várias doenças de pele, incluindo dermatite alérgica, psoríase vulgar e câncer de pele. O requerimento do NF-κB nestes processos é indicado por sua habilidade para regular genes críticos para estes eventos (Mohamed et al., 2014).

O estresse oxidativo induzido pela radiação UV causa a ativação do fator de transcrição NF-κB e a fosforilação de proteínas quinases de sinalização ativadas por mitógeno (MAP quinases) (Kallunki et al., 1994; Fisher et al., 1998). As MAP quinases ativadas aumentam a ativação das subunidades p65 e p50 que são componentes críticos do NF-κB. Este, por sua vez, induz a secreção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo: a IL-1, IL-6, TNF-α e VEGF (Maverakis *et al.*, 2010).

Na ausência de qualquer estímulo, dímeros de NF-kB são mantidos no citoplasma pela associação de várias proteínas inibitórias, membros da família de inibidores do NF-κB (IκB). A ligação de IκB-α mascara o sinal de localização nuclear do NF-κB e previne sua translocação para o núcleo. Passo de ativação tradicional, NF-κB pode ser estimulado por uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e EROs, todos levam a ativação da ΙκΒ quinase (IKK). A quinase IKK ativada fosforila a proteína inibitória IκB-α, isto permite a translocação

do NF-κB para o núcleo onde se liga à sequências DNA e ativa a transcrição gênica (Surh *et al.*, 2001; Wiseman, Mulder e Rietveld, 2001; Levites *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2014).

Os dados da figura 21C mostram a diminuição de 50% da quantidade de NF-κB/65 no citoplasma celular 3 horas após a exposição à radiação UVB. Assim, avaliou-se a capacidade da fração de BC e da CAT em evitar a translocação do NF-kB/65 do citoplasma para o núcleo.

A fração de BC e a CAT nas concentrações 5 e 10 μg/mL, respectivamente, foram capazes de prevenir a ativação do NF-kB/65 induzido pela radiação UVB, permanecendo 100% no citoplasma (figura 21C). Os resultados sugerem que o efeito inibitório da fração de BC e da CAT na produção de IL-6 podem atribuir o efeito inibitório de ambos na ativação do NF-κB induzida pela radiação UV.

Primeiramente, supõe-se que um mecanismo de ação da fração de BC e da CAT em impedir a diminuição do NF-κB inativo do citoplasma diz respeito às suas propriedades antioxidantes e seqüestro de radicais livres, uma vez que a radiação UVB provoca um aumento nos níveis de EROs, bem como liberação de interleucinas, e que estas condições estimulam a ativação do NF-κB, e sua translocação para o núcleo. Adicionalmente, compostos naturais também podem bloquear a sinalização da via de NF-κB pela a inibição dos receptores de fator de crescimento que ativam a cascata de sinalização de NF-κB (Filip e Clichici, 2011).

Outro possível mecanismo de ação da fração de BC e/ou da CAT contra a ativação de NF-κB pela radiação pode ser pela inibição da fosforilação da proteína inibitória IκB-α, principal mecanismo de ação dos maiores inibidores de NF-κB, como por exemplo, a EGCG. Estudos mostram que a EGCG inibi a translocação nuclear do NF-κB induzida pela radiação UVB (20 mJ/cm²) em cultura de queratinócitos através da inibição da fosforilação e degradação de IkB-α, assim como a inibição da expressão da proteína IKKα, necessária para a fosforilação da proteína IκB-α, induzidas pela radiação UV (Yang, Maliakal e Meng, 2002; Afaq *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2005; Song, Bi e Xu, 2006).

Como mencionado anteriormente, a ativação do NF-κB é modulada pelas MAP quinases, as quais podem levar danos às células da pele. Diversos estudos têm mostrado também o efeito inibitório de EGCG na ativação das MAP quinases ERK, JNK e p38 em pele de camundongo *hairless* e queratinócitos expostos a radiação UVB (Katiyar, Afaq, Azizuddin, *et al.*, 2001; Vayalil, Elmets e Katiyar, 2003). Assim, compostos antioxidantes e/ou seqüestradores de EROS como a CAT e aqueles presentes na fração de BC, seriam

capazes de inibir a ativação do NF-κB também pela inibição das MAP quinases do citoplasma (Flohe *et al.*, 1997; Saliou *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos sugerem que a ativação de NF-κB pelo estresse oxidativo é altamente especifica ao tipo celular, com a participação de diferentes mecanismos, sendo a ação de compostos antioxidantes neste processo muito ampla (Garcia-Roman *et al.*, 2008). Assim, maiores investigações devem ser conduzidas para melhor elucidar o mecanismo demonstrado da capacidade da fração de BC e da CAT de impedir a translocação de NF-κB.

Portanto, a diversidade de compostos fenólicos presentes na fração de BC a torna um agente fotoquimioprotetor mais eficaz do que a CAT isolada, pois foram utilizadas concentrações bem maiores da CAT para se observar o mesmo efeito fotoquimioprotetor proporcionado pela fração de BC na cultura de queratinócitos.

4.6 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração de BC ou da CAT adicionados à formulação gel

A pele sofre diariamente os efeitos deletérios da radiação UV que põe em risco sua integridade e a manutenção da homeostase celular. A severa depleção dos antioxidantes que compõem o sistema de defesa endógeno (GSH, SOD, CAT), durante o estresse oxidativo, resulta em uma proteção insuficiente e consequentemente, no dano celular com a formação de hidroperóxidos, produção de eicosanóides, oxido nítrico e citocinas (Peus *et al.*, 2001; Nicolaou, Pilkington e Rhodes, 2011).

Inúmeros trabalhos demonstram que ativos com propriedades antioxidantes são capazes de manifestar efeitos anti-inflamatórios e anticarcinogênicos na pele, sugerindo a possibilidade de que agentes específicos podem ser usados para alvos definidos e eventos moleculares estabelecidos na prevenção e tratamento de uma variedade de desordens da pele. O uso destes agentes isoladamente ou adicionados em formulações pode ser desenvolvido para fotoquimioproteção (Afaq, Adhami e Mukhtar, 2005; Vicentini *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010).

Devido à complexa resposta do organismo à radiação solar, a ação fotoquimioprotetora de ativos não pode ser avaliada por um único ensaio. Assim, a eficácia fotoquimioprotetora *in vivo* da fração de BC e da CAT incorporados à formulação gel foi avaliada pela medida da capacidade das formulações em proteger a pele da depleção do antioxidante endógeno GSH, pela sua eficácia anti-inflamatória e pelo seu potencial em impedir o aumento e/ou secreção das metaloproteinases induzida pela radiação UVB.

O potencial fotoquimioprotetor *in vivo* da fração de BC ou da CAT adicionados à formulação gel foi avaliado em camundongos sem pelos. Os animais foram tratados com as formulações contendo ativos ou não por 2 horas, em seguida, foram expostos ou não à radiação UVB (2,87 J/cm²). 6 horas após a irradiação os animais foram sacrificados, a pele do dorso dos animais foi retirada e armazenada para a realização dos testes.

4.6.1 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor *in vivo* pela quantificação do antioxidante endógeno GSH

A glutationa, na sua forma reduzida (GSH, γ-L-glutamil-L-cisteinil- glicina; tripeptídeo hidrofílico) é uma das mais importantes defesas antioxidantes contra as EROs induzidas pela radiação UV, pois além de atuar como cofator para a enzima glutationa peroxidase (GPx), o antioxidante endógeno GSH pode agir diretamente pelo sequestro de radicais livres doando átomos de hidrogênio, como também regenerando as vitaminas E e C que atuam como antioxidantes (Carini *et al.*, 2000; Monostori *et al.*, 2009).

A GPx converte H₂O₂ em água e oxigênio, durante esta conversão o GSH é convertido para sua forma oxidada, GSSG. A enzima glutationa oxidase (GO) catalisa a reação de oxidação de GSH na presença de oxigênio molecular produzindo glutationa na forma oxidada (GSSG) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A recuperação do antioxidante GSH é feita intracelularmente pela enzima glutationa redutase (GR) usando o NADPH, em uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção natural (figura 22). Em geral, a glutationa peroxidase intracelular compreende duas proteínas distintas, a glutationa peroxidase clássica (cGPx) e a gluationa peroxidase hidroperóxido-fosfolipídeo (PHGPx), que existem no núcleo, na mitocôndria ou no citosol. O GSH é utilizado como substrato reduzido para cGPx e PHGPx, por isso o monitoramento dos níveis de GSH pode ser utilizado para avaliar o efeito preventivo de antioxidantes exógenos na instalação do estresses oxidativo na pele, uma vez que o GSH pode ser considerado um dos primeiros sensores na instalação do estresse oxidativo epidermal causado pela RUV (Carini *et al.*, 2000; Chandra Jagetia *et al.*, 2003; Meloni e Nicolay, 2003).

Figura 21: Interconversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR). Adaptado por Meister e Anderson (1983).

Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação do GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá aumento do consumo de GSH e da produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Com a exposição à radiação UV, o conteúdo de GSH é significativamente reduzido induzindo um aumento nos níveis de EROs (Afaq e Mukhtar, 2001; Katiyar, Afaq, Perez, et al., 2001; Katiyar e Mukhtar, 2001; Ho et al., 2005; Svobodova e Vostalova, 2010).

Estudos realizados por Casagrande et al., (2006) e Vicentini et al., (2008) demonstraram que a radiação UVB induziu uma diminuição dose dependente (0,96 -2,87J/cm²) nos níveis de GSH na pele de camundongos sem pelos. Houve diferença estatística em relação ao grupo controle não irradiado a partir da dose de 1,91J/cm², sendo esta, também, estatisticamente diferente da dose final testada (2,87J/cm²).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a dose de 2,87J/cm² de radiação UVB causou a depleção de aproximadamente 50% nos níveis de GSH da pele dos camundongos (CI) quando comparado ao grupo controle que não recebeu irradiação (CNI), corroborando com os estudos realizados por Casagrande et al., (2006) e Vicentini et al., (2008) (Figura 23).

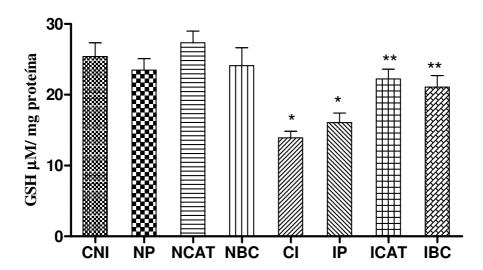


Figura 22: Medida da recuperação dos níveis de GSH depletados pela radiação UVB na pele de camundongos sem pelos tratados com as formulações gel adicionadas da fração de BC ou da CAT. Onde: CNI: controle não irradiado, NP: não irradiado e tratado com a formulação placebo, NCAT = não irradiado e tratado com a formulação contendo CAT, NBC: não irradiado e tratado com a formulação contendo a fração de BC, CI: controle irradiado, IP: irradiado e tratado com a formulação placebo, ICAT: irradiado e tratado com a formulação contendo CAT e IBC: irradiado e tratado com a formulação contendo a fração. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo ± DP. * p<0,05 diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), e ** p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI) utilizando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

A administração tópica das formulações gel adicionadas da fração ou CAT (IBC e ICAT) foram capazes de inibir em 87% a depleção dos níveis de GSH, ambas as formulações forneceram o mesmo nível de proteção com relação ao GSH, pois não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05) entre si.

A formulação placebo P1 (IP) sem adição dos ativos não causou inibição da depleção dos níveis de GSH, sugerindo que o efeito protetor do GSH pode ser atribuído aos componentes da fração e à CAT incorporadas. Além disso, os grupos tratados com a formulação placebo e com as formulações adicionadas da CAT e da fração de BC, mas não irradiados (NP, NCAT e NBC, respectivamente), não apresentaram diferença estatisticamente significativa (p>0,05) quando comparado com o grupo não tratado e não irradiado (CNI), evidenciando que nem os componentes da fração ou a CAT nem os componentes da formulação gel alteram os níveis de GSH ou interferem o método de quantificação do GSH.

A radiação UV na presença de sensibilizantes exógenos ou endógenos é uma fonte de oxigênio singlete e de outras EROs (Rahmanto et al., 2010). O oxigênio singlete é conhecido por gerar peróxidos reativos (endoperóxidos ou hidroperóxidos) de colesterol, lipídeos e DNA

(Geiger et al., 1997). Como as proteínas são os maiores alvos intracelulares para fotooxidação, muitos estudos têm mostrado a formação de peróxidos em aminoácidos, peptídeos e proteínas isoladas (Girotti, 2008). O sistema de defesa enzimático contra os danos de hidroperóxidos (aminoácidos, peptídeos e proteínas) e de peróxidos lipídicos é o ciclo redox da glutationa (Carini et al., 2000; Monostori et al., 2009).

A eficácia do tratamento com as formulações adicionadas da fração de BC ou da CAT na prevenção da depleção de GSH induzida pela radiação UVB é uma forte indicação da proteção contra os fotodanos induzidos pela radiação UV. Quando os animais foram expostos a radiação UVB, as suas peles já estavam enriquecidas de compostos fenólicos antioxidantes, como mostrado anteriormente no ensaio de penetração in vivo. Assim, devido ao poder antioxidante da fração de BC e da CAT, como mostrado também pelos diferentes ensaios de atividade antioxidante in vitro, o efeito protetor da depleção dos níveis de GSH induzidos pela radiação UVB pode ser devido ao sequestro das EROs pelos compostos antioxidantes da fração e da CAT, ou por meio da redução dos hidroperóxidos formados, evitando assim a redução destes pelo sistema enzimático cGPx e PHGPx e o consumo do GSH.

A atividade enzimática PHGPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares às membranas. O ciclo de neutralização dos hidroperóxidos pela GPx consiste no consumo de duas moléculas de GSH para cada hidroperóxido gerado na peroxidação lipídica de membranas celulares (Meister e Anderson, 1983; Brigelius-Flohé, 1999; Huber, Almeida e Fátima, 2008). O fato da fração e da CAT adicionados em formulação terem protegido a glutationa reduzida está de acordo com os resultados obtidos em cultura de queratinócitos em que os ativos diminuíram significativamente os níveis de peroxidação lipídica induzidos pela radiação UVB. Assim, sugere-se que a proteção do GSH se dá também pela diminuição da quantidade de peróxidos lipídicos gerados pela radiação UVB por consequência do tratamento com a fração ou CAT. A redução na formação dos hidroperóxidos e peróxidos lipídicos pelos compostos fenólicos conduz ao menor uso das enzimas cGPx e PHGPx e consequentemente a menor depleção do GSH.

Em pesquisas realizadas anteriormente no mesmo laboratório por Fonseca et al., (2010), sob as mesmas condições de irradiação, a administração tópica de uma formulação contendo extrato concentrado de calêndula mostrou-se capaz de inibir a depleção dos níveis de GSH em 100%, assim como a quercetina, a EGCC e os polifenóis do chá verde (Vayalil, Elmets e Katiyar, 2003; Hsu, 2005; Casagrande et al., 2006; Vicentini et al., 2008).

4.6.2 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vivo pela medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A exposição à radiação UVB induz a inflamação cutânea. Uma única exposição à radiação UVB pode resultar em resposta inflamatória aguda que é caracterizada pelo eritema e edema devido ao aumento do fluxo e permeabilidade vascular. O aumento do fluxo e permeabilidade vascular, por sua vez, auxilia no recrutamento e infiltração de células inflamatórias na pele incluindo os neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas após a exposição da pele à radiação UVB (Terui, Okuyama e Tagami, 2001; Young, 2006).

A mieloperoxidase (MPO) é uma peróxido de hidrogênio oxidorredutase pertencente à primeira linha de defesa do sistema imune inespecífico, responsável pela atividade microbicida dentro dos neutrófilos humanos (Jantschko et al., 2005). A MPO é especificamente encontrada em leucócitos granulocíticos, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, basófilos e eosinófilos.

Desde que Bradley et al., (1982) descreveram o procedimento utilizado para avaliar a inflamação cutânea pela quantificação de mieloperoxidase epidermal (MPO), esta enzima passou a ser considerada um biomarcador útil para medir e quantificar o influxo de PMNs na pele após exposição a um agente irritante (Trush, Egner e Kensler, 1994). Sugere-se que o ensaio de MPO é um método simples e específico para quantificar PMN acumulado ou infiltrado em vários processos patológicos que acompanham a inflamação (Xia e Zweier, 1997). Assim, o ensaio para dosagem da MPO permite inferir indiretamente o número de neutrófilos totais/mg de tecido cutâneo e segue o protocolo descrito por Bradley et al., (1982).

Estudos descrevem que a irradiação UVB induz um aumento dose dependente (0,61-3,69 J/cm²) na atividade de MPO na pele de camundongos sem pelos (Casagrande et al., 2006). No presente estudo, os resultados da dosagem da enzima MPO mostraram que a irradiação UVB (2,87 J/cm²) induziu um aumento de 7,4 vezes na atividade de MPO comparado ao grupo controle sem irradiação (CNI), o que comprova a indução do processo inflamatório pela radiação na dose utilizada (figura 24).

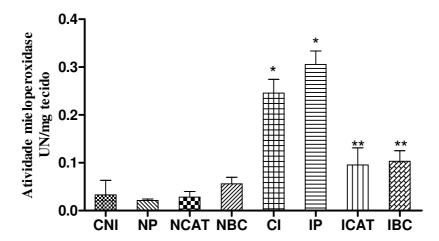


Figura 23. Medida da atividade da MPO na pele dos camundongos sem pelos tratados ou não com as formulações gel adicionadas da fração de BC ou da CAT. CNI: controle não irradiado, NP: não irradiado e tratado com a formulação placebo, NCAT = não irradiado e tratado com a formulação contendo CAT, NBC: não irradiado e tratado com a formulação contendo a fração de BC, CI: controle irradiado, IP: irradiado e tratado com a formulação placebo, ICAT: irradiado e tratado com a formulação contendo CAT e IBC: irradiado e tratado com a formulação contendo a fração. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo ± DP. * p<0.05 diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), e ** p<0.05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI) utilizando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

Entretanto, a aplicação tópica da fração de BC e da CAT diminuíram a atividade de MPO induzida pela radiação UVB. A fração de BC (IBC) e a CAT (ICAT) foram capazes de inibir o aumento da atividade da MPO induzido pela radiação UVB em 60% comparado com o grupo irradiado sem tratamento (CI). Tais resultados indicam que a mistura complexa de compostos presentes na fração de BC foi tão capaz de inibir o processo inflamatório induzido pela radiação UVB quanto à substância isolada.

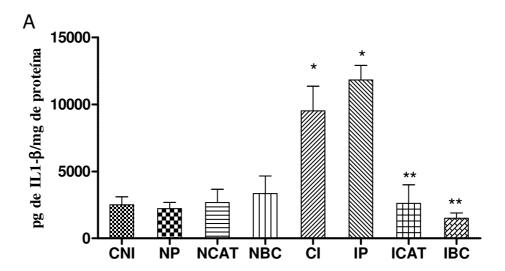
A fração de BC e a CAT apresentaram eficácia semelhante à EGCG. Katiyar e Mukhtar, (2001) observaram que o tratamento tópico com a EGCG antes de exposição à radiação UVB inibiu a atividade da mieloperoxidase na derme da pele de camundongos em 65%. Assim, fica evidente que tanto a CAT quanto a fração de BC e a EGCG, que está presente na fração e que mostraram boa penetração in vitro, são eficientes no bloqueio da radiação UVB, impedindo a geração de radicais livres, responsáveis pela ativação dos mediadores do processo inflamatório, como a migração de neutrófilos para a área exposta.

Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre o controle não irradiado (CNI) e os grupos tratados com as formulações e não irradiado (NP, NCAT, NBC), o que indica que os componentes da fração e da formulação gel não irradiado não foram capazes de alterar os níveis normais de MPO presente na pele.

4.6.3 Avaliação do potencial fotoquimioprotetor in vivo pela quantificação das citocinas IL-1β e IL-6

A radiação UV induz mudanças no perfil das citocinas na epiderme que envolve tanto citocinas pró-inflamatórias quanto antiinflamatórias de diferentes tipos de células (Duthie, Kimber e Norval, 1999). Na inflamação induzida por excesso de EROs, o NF-κB desempenha um papel crucial, uma vez que está ligado a diferentes genes promotores, os quais codificam TNF-α, interleucinas (IL-1 e IL-6), e diversas moléculas de adesão, permitindo, assim, sua transcrição (Campanini et al., 2013).

No presente estudo a dose de irradiação UVB de 2,87 J/cm² incidida sobre a pele dos animais induziu a um aumento significativo de 280 e 80% dos níveis de IL- 1β, IL-6, respectivamente, em comparação com o grupo de animais não irradiados (CNI) (figura 25A e B).



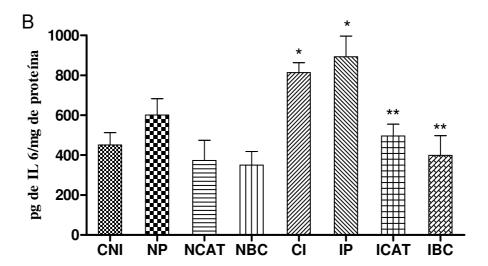


Figura 24: Medida das quantidades das citocinas IL-1β (A), IL-6 (B) na pele dos camundongos sem pelos tratados ou não com as formulações gel adicionadas da fração de BC ou da CAT. CNI: controle não irradiado, NP: não irradiado e tratado com a formulação placebo, NCAT = não irradiado e tratado com a formulação contendo CAT, NBC: não irradiado e tratado com a formulação contendo a fração de BC, CI: controle irradiado, IP: irradiado e tratado com a formulação placebo, ICAT: irradiado e tratado com a formulação contendo CAT e IBC: irradiado e tratado com a formulação contendo a fração. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo ± DP. * p<0,05 diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), e ** p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI) utilizando ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

Os resultados representados na figura 25 A e B mostram que os grupos de animais tratados com as formulações contendo a CAT ou com a fração de BC e irradiados (ICAT e IBC, respectivamente) forneceram proteção total contra a indução da secreção de IL-1β e IL-6 induzidos pela radiação UVB, pois, não houve diferença estatisticamente significativa comparado ao CNI (p>0,05). Assim, a CAT e a fração, devido a sua mistura complexa de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias, são capazes de inibir os eventos inflamatórios decorrentes da radiação UVB e da consequente geração de EROs.

A inibição de IL-1β pode estar intimamente ligada à inibição da atividade da MPO, uma vez que a IL-1β é quimiotático para neutrófilos, o que indica que a inibição da produção de IL-1\beta pode levar a redução do recrutamento de neutrófilos e, portanto, a redução da atividade da MPO (Campanini et al., 2013).

Um estudo realizado por Monga et al., (2014) mostrou que o tratamento de ratos BALB/c com a CAT, incorporada em uma formulação gel emulsionada, suprimiu a atividade das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 de tumores de pele, evidenciando o potencial quimioprotetor deste polifenol.

4.6.4 Inibição da atividade/secreção de proteinases utilizando zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio)

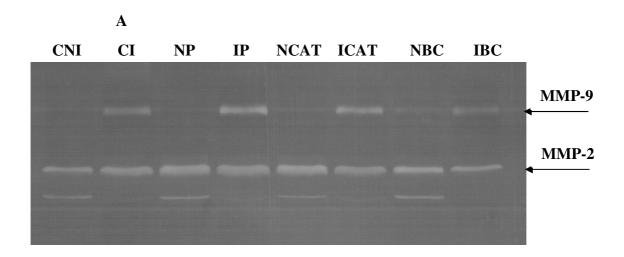
Os fibroblastos estão presentes na derme e são responsáveis principalmente pela produção de fibras de colágeno tipo I e III, as quais fornecem força e resistência à pele, sendo colágeno tipo I o mais abundante na pele (85-80%), produzido a partir do pró-colágeno tipo I. Um dos principais danos causados pela exposição à radiação UVB é a degradação das fibras elásticas, do colágeno e das glicosaminoglicanas da matriz extracelular da derme, que levam a perda de elasticidade e assim contribuem para a formação de rugas e fotoenvelhecimento da pele (Pillai, Oresajo e Hayward, 2005; Uitto, 2008; Shah e Rawal Mahajan, 2013).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem à família das endopeptidases capazes de digerir as proteínas de meio extracelular possuindo o papel de promover a remodelação, degradação ou modificação da matriz e desempenham um papel no fotoenvelhecimento (Fisher et al., 2002). A exposição à radiação UVB provoca danos no tecido conjuntivo da pele devido a elevada expressão de MMPs (Uitto, 2008). MMP-1, é a mais efetiva colagenase, inicialmente degrada os colágenos tipo I, III, VII, VIII, X, os quais são posteriormente degradados pelas enzimas gelatinolíticas, MMP-2 e -9 (Rittie e Fisher, 2002; Nagase, Visse e Murphy, 2006). As gelatinases MMP-2 e -9 não degradam o colágeno intacto, mas a combinação de MMP-1 e MMP-9 quebram o colágeno em pequenos peptídeos, e a MMP-3 ativa pró-MMP-1(Varani et al., 2001; Rittie e Fisher, 2002; Jung et al., 2014). Assim, inibidores tópicos de MMP podem ser eficazes na prevenção na formação de rugas induzida pela radiação UVB.

A indução da atividade de metaloproteinases (MMP) pela radiação UV tem sido observada em culturas de células de queratinócitos e fibroblastos (Chiang et al., 2012; Kim et al., 2012). Além disso, Jung et al., (2010), Casagrande et al., (2006) e Vicentini et al., (2008) também observaram aumento da secreção/atividade de MMPs utilizando camundongos sem pelos expostos a radiação UVB.

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, a qual é extremamente sensível para detecção de MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B) (Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005) e nos permite verificar alterações na atividade destas enzimas na pele. As imagens dos géis foram analisadas com o software ImageJ® com o objetivo de quantificar as bandas translúcidas através da contagem de pixels.

A figura 26 mostra o gel de zimografia (A) e o gráfico da medida da atividade da MMP-9 obtido a partir do gel (B). Os resultados evidenciam o aumento da MMP-9 (MMP-9, 92 kDa) induzido pela radiação UVB enquanto que a MMP-2 (72 kDa) praticamente se manteve inalterada, corroborando com os dados encontrados na literatura de que a radiação UVB induz a expressão da MMP-1, MMP-3 e MMP-9 in vivo (Cho et al., 2007; Pallela, Na-Young e Kim, 2010).



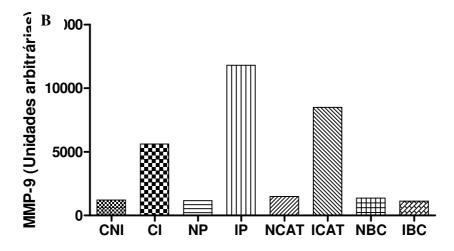


Figura 25: Imagem representativa da atividade proteolítica em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina (A) e avaliação da eficácia in vivo pela medida da atividade da MPP-9 (B). CNI: controle não irradiado, CI: controle irradiado, NP: não irradiado e tratado com a formulação placebo, IP: irradiado e tratado com a formulação placebo, NCAT = não irradiado e tratado com a formulação contendo CAT, ICAT: irradiado e tratado com a formulação contendo CAT, NBC: não irradiado e tratado com a formulação contendo a fração de BC e IBC: irradiado e tratado com a formulação contendo a fração de BC. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo.

Analisando-se os grupos: não irradiado (CNI), não irradiado tratado com a formulação gel placebo (NP) e não irradiado tratado com a formulação adicionada da fração de BC (NBC) e da CAT (NCAT), é possível identificar a presença da MMP-9, porém em quantidades menores que as observadas nos grupos irradiados. A presença da MMP-9 em baixa quantidade nos grupos não irradiados deve-se ao fato de que essas enzimas são constitutivas, isto é, estão normalmente presentes na pele. No entanto, a expressão basal é relativamente baixa, sendo aumentada pela radiação tanto in vivo quanto em cultura de células (Jenkins, 2002).

A administração tópica da formulação placebo aumentou a atividade de MMP-9 no grupo irradiado (IP) em relação ao controle irradiado (CI). Por outro lado, o tratamento tópico com a formulação gel contendo a fração de BC foi capaz de inibir o aumento da MMP-9, comparado ao CI e ao grupo tratado com a formulação placebo e irradiado (IP); sugerindo a eficácia da fração na formulação tópica desenvolvida. Já o grupo tratado com a formulação contendo a CAT e irradiado (ICAT), no entanto, não foi capaz de inibir o aumento da expressão da MMP-9 induzido pela radiação UVB e pela formulação placebo irradiada.

A ativação enzimática pode ser um reflexo da geração de EROs, pois oxidantes são potentes ativadores de MMPs. O processo inflamatório iniciado pela geração de EROs promove a liberação de fatores de crescimento, de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos. A IL-1, por exemplo, pode prontamente induzir o passo de sinalização intracelular de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Janssens e Beyaert, 2003). Uma vez ativada, a via de sinalização das MAPKs (JNK, ERK e proteína p38) leva ao aumento da expressão do fator de transcrição AP-1, o qual regula simultaneamente o aumento da expressão das MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e a diminuição da produção de pró-colágeno I (Lahmann et al., 2001; Rittie e Fisher, 2002; Kim, Shin, et al., 2005; Cho et al., 2007; Lin et al., 2008).

Desta forma, o tratamento com a formulação contendo a fração de BC pode ter inibido a ativação da MMP-9 devido ao sequestro de EROs pelos compostos fenólicos da fração encontrados na epiderme/derme da pele de camundongos sem pelos, já que nos experimentos in vitro a fração de BC demonstrou atividade antioxidante nos diversos sistemas de geração de EROs.

Além disso, a inibição da expressão da MMP-9 no grupo tratado com a formulação contendo a fração também pode estar intimamente relacionada com a redução dos níveis de IL-1β e IL-6, uma vez que a expressão da MMP-9 na epiderme, após a irradiação, estimula a expressão destas citocinas inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (Choi et al., 2010).

Esta atividade da fração de BC pode ser explicada também pela modulação da via de sinalização do NFκB, que é ativada pela radiação UVB e é responsável pela transcrição de diversos fatores pró-inflamatórios, dentre eles as MMPs. Um dos flavonóides mais estudados e que está presente na fração de BC é a EGCG que, como discutido anteriormente, exerce seus efeitos inibitórios sobre NFkB por inibir a ativação da família das IkB quinases e a consequente degradação da IkB. Além disso, a EGCG inibi a fosforilação induzida pela radiação UVB das MAP quinases ERK, JNK e p38 em pele de camundongo hairless (Vayalil, Elmets e Katiyar, 2003). Assim, sugere-se que os compostos antioxidantes presentes na fração de BC estejam inibindo a indução da MMP-9 por modulação negativa da ativação da via de sinalização do NFκB, como foi observado in vitro na cultura de queratinócitos, e das MAP quinases. Desta forma, a fração de BC apresenta potencial terapêutico para a prevenção de fotoenvelhecimento e a formação de rugas.

Já com relação à CAT incorporada na formulação gel (ICAT), o composto isolado não foi capaz de evitar a indução da MMP-9 na pele exposta à radiação UVB. Sugere-se que provavelmente a concentração de CAT que penetrou na epiderme/derme (± 20µg/cm²) não foi suficiente para reverter o aumento da expressão da MMP-9 induzida pela formulação placebo irradiada.

Park et al., (2010) realizaram um estudo comparativo entre a (+) - catequina e o extrato Punica granatum contra os danos induzidos pela radiação UVB em fibroblastos de pele humana. Os resultados mostraram que a CAT foi capaz de aumentar o pró-colágeno tipo I e diminuir a expressão de MMP-1; no entanto, o efeito do extrato de Punica granatum foi maior do que a de (+) – catequina, evidenciando que a mistura de compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais é mais eficiente na inibição de atividade/secreção das metaloproteinases do que substâncias isoladas.

Diante do exposto, o presente estudo mostra que a fração de BC, bem como o padrão CAT possuem um papel importante na proteção contra danos diretos e/ou oxidativos causados à cultura de queratinócitos e à pele dos camundongos sem pelos por sua exposição à radiação UVB, o que faz destes ativos agentes promissores para uso em estratégias de fotoquimioproteção e consequente prevenção/tratamento dos danos induzidos pela radiação UVB à pele.

Assim, foi observado que a fração de BC atua modulando várias vias de sinalização induzida pela radiação UVB por diversos mecanismos: inibição da peroxidação lipídica, proteção do sistema antioxidante endógeno por manutenção dos níveis da glutationa reduzida, ação antiiflamatória por inibição das metaloproteinases de matriz (MMP-9), do infiltrado inflamatório na pele e das citocinas IL-1β e IL-6, assim como a CAT, que não foi eficiente apenas contra a inibição da MMP-9.

Deve-se destacar ainda que o efeito fotoquimioprotetor in vitro apresentado pela CAT foi numa concentração cerca de 2 à 4 vezes maior do que aquela utilizada para fração de BC, mostrando que o enriquecimento da fração de BC em compostos fenólicos de média polaridade foi vantajoso, visto que a mistura de compostos polifenólicos pode agir de forma mais eficiente do que o composto isolado, por mecanismos de ações complementares evitando danos causados por um estimulo específico (radiação UVB) pela alta atividade antioxidante (fortalecimento do sistema imune ou ativar um sistema de proteção enzimática endógena), garantindo a homeostasia do organismo.

Portanto, a formulação tipo gel adicionada da fração de BC enriquecida de compostos fenólicos (AG, CAT, EC, EGCG e QG) foi eficiente em promover a penetração de compostos antioxidantes na pele de orelha de porco e na pele de camundongos sem pelos, e assim fornecer o efeito fotoquimioprotetor desejado, contribuindo significativamente para o futuro desenvolvimento e aplicabilidade da fração de BC ou de outros extratos vegetais ricos em polifenóis como ativos fotoquimioprotetores. Sendo assim, mais estudos relacionados à eficácia da fração de BC merecem ser realizados para o completo entendimento do seu efeito na prevenção e/ou tratamento de doenças da pele causada pela radiação UVB.

6 Referências

- ABLA, M. J.; BANGA, A. K. Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 35, n. 1, p. 19-26, 2013.
- ABRAHAM, M. H.; CHADHA, H. S.; MITCHELL, R. C. The Factors that Influence Skin Penetration of Solutes*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 47, n. 1, p. 8-16, 1995.
- ABU ZAID, M. et al. Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx. **Photochemistry and Photobiology,** v. 83, n. 4, p. 882-888, Jul-Aug 2007.
- ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. **Neoplasia**, v. 5, n. 1, p. 74-82, Jan-Feb 2003.
- ADHAMI, V. M. et al. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. **Photochem Photobiol,** v. 84, n. 2, p. 489-500, Mar-Apr 2008.
- AFAQ, F. et al. Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Oncogene**, v. 22, n. 7, p. 1035-44, Feb 20 2003.
- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat Res,** v. 571, n. 1-2, p. 153-73, Apr 2005.
- AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **J Photochem Photobiol B,** v. 63, n. 1-3, p. 61-9, Oct 2001.
- AJAZUDDIN et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. **Journal of Controlled Release,** v. 171, n. 2, p. 122-132, 10/28/2013.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition research** (**New York, N.Y.**), v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.
- ALONSO, C. et al. Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. **Free Radic Biol Med,** v. 75, p. 149-55, Oct 2014.
- ANGERHOFER, C. K.; MAES, D.; GIACOMONI, P. U. Chapter 10 The Use of Natural Compounds and Botanicals in the Development of Anti-Aging Skin Care Products. In: BY, E. e DAYAN, N. (Ed.). **Skin Aging Handbook**. Norwich, NY: William Andrew Publishing, 2009. p.205-263.
- ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H.; KROMHOUT, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. **The Lancet**, v. 354, n. 9177, p. 488, 8/7/1999.
- ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry,** v. 89, n. 1, p. 27-36, 1// 2005.
- BACKVALL, H. et al. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. **Exp Dermatol,** v. 11, n. 4, p. 349-56, Aug 2002.

- BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochem Photobiol Sci**, v. 5, n. 2, p. 243-53, Feb 2006.
- BARCHOWSKY, A.; FRLETA, D.; VINCENTI, M. P. Cytokine, v. 12, n. 10, p. 1469-79, Oct 2000.
- BEJAR, E. et al. Constituents of Byrsonima crassifolia and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy,** v. 33, n. 1, p. 25-32, 1995.
- BEJAR, E.; MALONE, M. H. Pharmacological and chemical screening of Byrsonima crassifolia, a medicinal tree from Mexico. Part I. **J Ethnopharmacol,** v. 39, n. 2, p. 141-58, Jun 1993.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 04/26/print 1958.
- BOND, M.; BAKER, A. H.; NEWBY, A. C. Nuclear Factor κB Activity Is Essential for Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Upregulation in Rabbit Dermal Fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, n. 2, p. 561-567, 10/22/ 1999.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 2–3, p. 119-124, 2// 1985.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248-254, 5/7/ 1976.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar 1982.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br.. Site visitado em: 15 de março, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Gerência Geral de cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Série qualidade 1. Brasília, 2004. Disponível em: http://anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em 02 de maio de 2012.
- BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 17, n. 6, p. 663-9, Nov 2003.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 27, n. 9–10, p. 951-965, 11// 1999.
- BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 1, p. 35-50, Feb 2011.
- BRONAUGH, R.L.; HOOD, H.L.; KRAELING, M.E.K.; YOURICK, J.J. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3° ed., Marcel Dekker, New York, p. 229-234, 1999.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol,** v. 52, p. 302-10, 1978.

- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001/06/01 2001.
- BURGER, D. et al. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology,** v. 20, n. 5, p. 879-896, 10// 2006.
- CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 571, n. 1-2, p. 3-17, Apr 1 2005.
- CAMPANINI, M. Z. et al. Efficacy of topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **J Photochem Photobiol B,** v. 127, p. 153-60, Oct 5 2013.
- CARINI, M. et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Farmaco**, v. 55, n. 8, p. 526-34, Aug 2000.
- CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 328, n. 2, p. 183-190, 1/10/2007.
- CASAGRANDE R, GEORGETTI SR, VERRI WA JR, DORTA DJ, DOS SANTOS AC, FONSECA MJ. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J Photochem Photobiol B,** v. 84, n. 1, p. 21-7, Jul 3 2006.
- CASAGRANDE, R. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo. Tese de doutorado Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- CHANDRA JAGETIA, G. et al. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated γ radiation. **Clinica Chimica Acta**, v. 332, n. 1–2, p. 111-121, 6. 2003.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 491-497, Sep 2005.
- CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **J Am Acad Dermatol**, v. 67, n. 5, p. 1013-24, Nov 2012.
- CHIANG, H.-M. et al. Michelia alba extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. **Food and Chemical Toxicology,** v. 50, n. 12, p. 4260-4269, 12// 2012.
- CHO, H. S. et al. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. **Photodermatol Photoimmunol Photomed,** v. 23, n. 5, p. 155-62, Oct 2007.
- CHOI, H. K. et al. Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. In: (Ed.). **J Biosci Bioeng**. Japan: 2009. Published by Elsevier B.V., v.109, 2010. p.291-6.

- CHUNG, J. H. Photoaging in Asians. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 19, n. 3, p. 109-121, Jun 2003.
- CLAERHOUT, S. et al. Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. **Photochem Photobiol Sci**, v. 5, n. 2, p. 199-207, Feb 2006.
- COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. **Antioxid Redox Signal,** v. 7, n. 1-2, p. 72-9, Jan-Feb 2005.
- COOPER, S. J.; BOWDEN, G. T. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. **Curr Cancer Drug Targets,** v. 7, n. 4, p. 325-34, Jun 2007.
- CORSINI, E. et al. In vitro mechanism(s) of ultraviolet-induced tumor necrosis factor-α release in a human keratinocyte cell line. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine,** v. 11, n. 3, p. 112-118, 1995.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **J Exp Med,** v. 193, n. 6, p. F23-6, Mar 19 2001.
- D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanita,** v. 43, n. 4, p. 348-61, 2007.
- DAL BELO, S. E. et al. Skin penetration of epigallocatechin-3-gallate and quercetin from green tea and Ginkgo biloba extracts vehiculated in cosmetic formulations. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 22, n. 6, p. 299-304, 2009.
- DARGEL, R. Lipid peroxidation--a common pathogenetic mechanism? **Exp Toxicol Pathol,** v. 44, n. 4, p. 169-81, Aug 1992.
- DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 285-296, 2/1/2009.
- DEMACQ, C. et al. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. **Clin Chim Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 72-6, Aug 2008.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 4/15/2011.
- DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. Assessment of physical and antioxidant activity stability, in vitro release and in vivo efficacy of formulations added with superoxide dismutase alone or in association with alpha-tocopherol. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 66, n. 3, p. 451-9, Jun 2007.
- DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 287-295, 2/23/2005.
- DICK, I. P.; SCOTT, R. C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **J Pharm Pharmacol**, v. 44, n. 8, p. 640-5, Aug 1992.
- DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nat Chem Biol,** v. 7, n. 8, p. 504-11, Aug 2011.

- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic Res,** v. 46, n. 4, p. 382-419, Apr 2012.
- DUTHIE, M. S.; KIMBER, I.; NORVAL, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. In: (Ed.). **Br J Dermatol**. England, v.140, 1999. p.995-1009.
- ELIAS, P. M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. **J Invest Dermatol**, v. 125, n. 2, p. 183-200, Aug 2005.
- F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 19, n. 2, p. 56-72, Apr 2003.
- FARRUKH, M. R. et al. Oxidative stress mediated Ca2+ release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells. **Journal of Dermatological Science,** v. 75, n. 1, p. 24-35, 7// 2014.
- 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,** v. 131, n. 0, p. 65-73, 2/5/2014.
- FILIP, A. et al. Photoprotective effects of two natural products on ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin. **J Med Food,** v. 14, n. 7-8, p. 761-6, Jul-Aug 2011. ISSN 1096-620x.
- FISHER, G. J. et al. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 117, n. 2, p. 219-226, Aug 2001.
- FISHER GJ, KANG S, VARANI J, BATA-CSORGO Z, WAN Y, DATTA S, VOORHEES JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch Dermatol,** v. 138, n. 11, p. 1462-70, Nov 2002.
- FISHER, G. J.et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 6, p. 1432-1440, Mar 15 1998.
- FILIP, G. A.; CLICHICI, S. Chemoprevention of Skin Cancer by Natural Compounds, Skin Cancers Risk Factors, Prevention and Therapy. Prof Caterina La Porta (Ed.), November 14, 2011.
- FLOHE, L. et al. Redox regulation of NF-kappa B activation. **Free Radic Biol Med,** v. 22, n. 6, p. 1115-26, 1997.
- FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de calêndula.** 2010. 165p. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- 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,** v. 127, n. 3, p. 596-601, 2/17/2010.

- GARCIA-ROMAN, R. et al. The differential NF-kB modulation by S-adenosyl-L-methionine, N-acetylcysteine and quercetin on the promotion stage of chemical hepatocarcinogenesis. **Free Radic Res,** v. 42, n. 4, p. 331-43, Apr 2008.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. In: (Ed.). **Int J Pharm**. Netherlands, v.307, 2006. p.123-8.
- GEIGER, P. G. et al. Lipid Peroxidation in Photodynamically Stressed Mammalian Cells: Use of Cholesterol Hydroperoxides as Mechanistic Reporters. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 1, p. 57-68, // 1997.
- GERLACH, R. F. et al. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. **Clin Biochem,** v. 40, n. 1-2, p. 119-23, Jan 2007.
- GILABERTE, Y. et al. Fotoprotección. **Actas Dermo-Sifiliográficas,** v. 94, n. 5, p. 271-293, // 2003.
- GIROTTI, A. W. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. In: (Ed.). **Free Radic Biol Med**. United States, v.44, 2008.
- GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, n. 4, p. 685-692, 4/3/2000.
- GNIADECKI, R. Regulation of Keratinocyte Proliferation. **General Pharmacology: The Vascular System,** v. 30, n. 5, p. 619-622, 5// 1998.
- GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. In: (Ed.). **Adv Drug Deliv Rev**. Netherlands, v.59, 2007. p.1152-61.
- GRONE, A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol,** v. 88, n. 1-2, p. 1-12, Sep 6 2002.
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: Applications and evaluation of their efficacy. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, Jan-Feb 2007.
- GULCIN, I. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food Chem Toxicol,** v. 48, n. 8-9, p. 2227-38, Aug-Sep 2010.
- GUPTA, N. et al. Cloning and identification of EDD gene from ultraviolet-irradiated HaCaT cells. **Photodermatol Photoimmunol Photomed,** v. 22, n. 6, p. 278-84, Dec 2006.
- HADGRAFT, J. Skin deep. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, n. 2, p. 291-299, 9// 2004.
- HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutat Res,** v. 571, n. 1-2, p. 107-20, Apr 1 2005.

- HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radic Biol Med,** v. 41, n. 8, p. 1205-12, Oct 15 2006.
- HECK, D. E. et al. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 195, n. 3, p. 288-297, Mar 15 2004.
- HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 63, n. 4, p. 840-845, 3/13/2006.
- HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. **FEBS Letters**, v. 443, n. 1, p. 1-7, 1/22/1999.
- HIRAYAMA, O. et al. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Anal Biochem,** v. 247, n. 2, p. 237-41, May 1 1997.
- HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976.
- HO, J. N. et al. Protective effects of aucubin isolated from Eucommia ulmoides against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biol Pharm Bull,** v. 28, n. 7, p. 1244-8, Jul 2005.
- HOJEROVA, J.; MEDOVCIKOVA, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. In: (Ed.). **Int J Pharm**. Netherlands: 2011 Elsevier B.V, v.408, 2011.
- HSU, S. Green tea and the skin. J Am Acad Dermatol, v. 52, n. 6, p. 1049-59, Jun 2005.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem,** v. 53, n. 6, p. 1841-56, Mar 23 2005.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova,** v. 31, p. 1170-1179, 2008.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 6/15/2011.
- ILLEL, B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,** v. 14, n. 3, p. 207-19, 1997.
- International Conference on Harmonization (ICH), ICH Harmonized tripartite guideline, Topic Q2B , **Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q3C: Impurities: **Guideline for residual solvents.** 1997.

- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use**, 2011.
- ISHIDA, T.; SAKAGUCHI, I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of Lithospermum erythrorhizon. **Biol Pharm Bull,** v. 30, n. 5, p. 928-34, May 2007.
- JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. In: (Ed.). **Mol Cell**. United States, v.11, 2003. p.293-302.
- JANTSCHKO, W. et al. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 8, p. 1149-1157, 2005.
- JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech Ageing Dev,** v. 123, n. 7, p. 801-10, Apr 2002.
- JEON, S. E. et al. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. **Photodermatol Photoimmunol Photomed,** v. 19, n. 5, p. 235-41, Oct 2003.
- JUNG, H.-Y. et al. Pinus densiflora extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression. **Toxicology Reports,** v. 1, n. 0, p. 658-666, // 2014.
- JUNG, S. K. et al. Myricetin suppresses UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by inhibiting Raf. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 10, p. 1455-1461, 5/15/2010.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Pp 359-366.
- KALLUNKI, T. et al. JNK2 CONTAINS A SPECIFICITY-DETERMINING REGION RESPONSIBLE FOR EFFICIENT C-JUN BINDING AND PHOSPHORYLATION. **Genes & Development,** v. 8, n. 24, p. 2996-3007, Dec 15 1994.
- KAMIJO, T. et al. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 95, n. 14, p. 8292-8297, Jul 7 1998.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, Jul-Aug 2002.
- KATIYAR, S. K. et al. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 176, n. 2, p. 110-117, Oct 15 2001.
- KATIYAR, S. K. et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 287-94, Feb 2001.

- KATIYAR, S. K.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 5, p. 719-726, May 2001.
- KIM, H.-S. et al. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from Anemarrhena asphodeloides. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1–3, p. 38-44, 8/15/2012.
- KIM, H. H. et al. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. **Mechanisms of Ageing and Development,** v. 126, n. 11, p. 1170-1177, Nov 2005.
- KIM, H.H. Eicosapentaenoic acid inhibits UV-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts. **J Lipid Res,** v. 46, n. 8, p. 1712-20, Aug 2005.
- KIM, S.-H. et al. Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 123-131, 2006.
- KOCK, A. et al. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. **J Exp Med,** v. 172, n. 6, p. 1609-14, Dec 1 1990.
- KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 4, p. 181-92, May 1999.
- KONDO, S. The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. **J Investig Dermatol Symp Proc,** v. 4, n. 2, p. 177-83, Sep 1999.
- KONDO, S. The roles of cytokines in photoaging. **Journal of Dermatological Science,** v. 23, Supplement 1, n. 0, p. S30-S36, 3// 2000.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 6, p. 937-958, 6// 2005.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2// 2004.
- KUPPER, T. S.; GROVES, R. W. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. **J Invest Dermatol,** v. 105, n. 1 Suppl, p. 62s-66s, Jul 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- LAHMANN, C. et al. Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation¶. **Photochemistry and Photobiology,** v. 73, n. 6, p. 657-663, 2001.
- LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; GOLC WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 11// 2005.

- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 563-569, 2002.
- LEVANG, A. K.; ZHAO, K.; SINGH, J. Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 181, n. 2, p. 255-263, 4/30/ 1999.
- LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell,** v. 88, n. 3, p. 323-331, Feb 7 1997.
- LEVITES, Y. et al. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 21-29, 1/1/2002.
- LI, J. et al. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. **Food Chemistry**, v. 176, n. 0, p. 7-11, 6/1/2015.
- LI, R. et al. Phenolics and antioxidant activity of Saskatoon berry (Amelanchier alnifolia) pomace extract. **J Med Food**, v. 17, n. 3, p. 384-92, Mar 2014.
- LIAO, K.; YIN, M. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. **J Agric Food Chem,** v. 48, n. 6, p. 2266-70, Jun 2000.
- LIMA, A. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006-12 2006.
- LIN, C. C. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 229, n. 3, p. 386-98, Jun 15 2008.
- LIU, X. et al. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD. **J Pharm Biomed Anal**, v. 76, p. 70-4, Mar 25 2013.
- LOTITO, S. B.; FRAGA, C. G. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. **Free Radic Biol Med,** v. 24, n. 3, p. 435-41, Feb 1998.
- LU, Y. P. et al. Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. **Cancer Research**, v. 59, n. 18, p. 4591-4602, Sep 15 1999.
- LUO, D. et al. Effect of epigallocatechingallate on ultraviolet B-induced photo-damage in keratinocyte cell line. **Am J Chin Med,** v. 34, n. 5, p. 911-22, 2006.
- MA, T. et al. Fingerprint analysis of Hawk-tea by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry,** v. 129, n. 2, p. 551-556, 11/15/2011.
- MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of Acacia cornigera Willdenow, Byrsonima crassifolia Kunth, Sweetia panamensis Yakovlev and the leaves of Sphagneticola trilobata Hitchcock. **J Ethnopharmacol**, v. 122, n. 3, p. 430-3, Apr 21 2009.

MAMMONE, T. et al. Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. **Cell Biol Toxicol**, v. 16, n. 5, p. 293-302, 2000.

MANTENA, S. K.; KATIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappa B signaling in human epidermal keratinocytes. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 40, n. 9, p. 1603-1614, May 1 2006.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res,** v. 424, n. 1-2, p. 83-95, Mar 8 1999.

MARQUELE, F. D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 455-462, 9/15/2005.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **Int J Pharm**, v. 342, n. 1-2, p. 40-8, Sep 5 2007.

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*. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de Bauhinia forficata Link. **Química Nova,** v. 35, p. 517-522, 2012.

MARTI-MESTRES, G. et al. The "in vitro" percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **Int J Pharm,** v. 331, n. 1, p. 139-44, Feb 22 2007.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79-82, 7// 1999.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 298-308, Mar 15 2004.

MAVERAKIS, E. et al. Light, including ultraviolet. **J Autoimmun,** v. 34, n. 3, p. J247-57, May 2010.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem,** v. 52, p. 711-60, 1983.

MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 571, n. 1-2, p. 91-106, Apr 1 2005.

MELONI, M.; NICOLAY, J. F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicol In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 609-13, Oct-Dec 2003.

MITTELSTADT, P. R. et al. Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. **Cell Cycle,** v. 4, n. 9, p. 1189-92, Sep 2005.

MOHAMED, M. A. et al. Protective effect of Disporum sessile D.Don extract against UVB-induced photoaging via suppressing MMP-1 expression and collagen degradation in human skin cells. **J Photochem Photobiol B,** v. 133, p. 73-9, Apr 5 2014.

MONGA, J. et al. Topical (+)-catechin emulsified gel prevents DMBA/TPA-induced squamous cell carcinoma of the skin by modulating antioxidants and inflammatory biomarkers in BALB/c mice. **Food Funct,** v. 5, n. 12, p. 3197-207, Dec 2014.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 28, p. 3331-46, Oct 15 2009.

MOREIRA, D. D. L. et al. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de Pseudopiptadenia contorta (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 12, n. Suppl. v. 1, p. 124-125, 2002 2002.

MOREL, I. et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 13-19, 1/7/1993.

MORLIERE, P. et al. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. In: (Ed.). **Biochim Biophys Acta**. Netherlands, v.1084, 1991.

MORLIERE, P.; MOYSAN, A.; TIRACHE, I. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. **Free Radic Biol Med,** v. 19, n. 3, p. 365-71, Sep 1995.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **Eur J Pharm Biopharm,** v. 52, n. 2, p. 103-12, Sep 2001.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry,** v. 72, n. 2, p. 145-171, 2// 2001.

MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A. Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. **Photochem Photobiol,** v. 63, n. 4, p. 356-7, Apr 1996.

MULLER, K.; MEINEKE, V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. In: (Ed.). **Exp Hematol**. Netherlands, v.35, 2007. p.96-104.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res,** v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 15 2006.

NAKAO, M.; TAKIO, S.; ONO, K. Alkyl peroxyl radical-scavenging activity of catechins. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2379-2382, 12/20/ 1998.

NATARAJAN, V. T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nat Chem Biol,** v. 10, n. 7, p. 542-51, Jul 2014.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71-83, Mar 2010.

- NICOLAOU, A.; PILKINGTON, S. M.; RHODES, L. E. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. **Chem Phys Lipids,** v. 164, n. 6, p. 535-43, Sep 2011.
- OH, J. E. et al. A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced photoaging process. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, n. 3, p. 196-205, 12// 2014.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 6// 1979.
- ONOUE, S. et al. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **J Dermatol Sci,** v. 33, n. 2, p. 105-11, Nov 2003.
- PAGLIARA, A. et al. Evaluation and prediction of drug permeation. **J Pharm Pharmacol**, v. 51, n. 12, p. 1339-57, Dec 1999.
- PALLELA, R.; NA-YOUNG, Y.; KIM, S. K. Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. **Mar Drugs,** v. 8, n. 4, p. 1189-202, 2010.
- PAREJO, I. et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. **J Pharmacol Toxicol Methods,** v. 44, n. 3, p. 507-12, Nov-Dec 2000.
- PARK, H. M. et al. Extract of Punica granatum inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. **Int J Dermatol,** v. 49, n. 3, p. 276-82, Mar 2010.
- PERAZA-SANCHEZ, S. R. et al. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v. 78, n. 4, p. 315-8, Jun 2007.
- PERES, P. S. et al. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 103, n. 2, p. 93-97, 5/3/2011.
- PEUS, D. et al. Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. In: (Ed.). **Free Radic Biol Med**. United States, v.30, 2001. p.425-32.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod,** v. 63, n. 7, p. 1035-42, Jul 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. **Int J Cosmet Sci,** v. 27, n. 1, p. 17-34, Feb 2005.
- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 48, n. 1, p. 1-22, 1// 2003.
- PIZZOFERRATO, A. et al. Cell culture methods for testing Biocompatibility. **Clinical Materials,** v. 15, n. 3, p. 173-190, // 1994.
- POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. **Arch Biochem Biophys,** v. 476, n. 2, p. 196-204, Aug 15 2008.

- POTTS, R. Skin barrier: Principles of percutaneous absorption. **Archives of Dermatology,** v. 133, n. 7, p. 924-924, 1997.
- POTTS, R. O.; GUY, R. H. Predicting skin permeability. **Pharm Res,** v. 9, n. 5, p. 663-9, May 1992.
- RAHMANTO, A. S. et al. Cellular effects of photogenerated oxidants and long-lived, reactive, hydroperoxide photoproducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 10, p. 1505-1515, 11/30/2010.
- RAMIRO, E. et al. Flavonoids from Theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. **J Agric Food Chem,** v. 53, n. 22, p. 8506-11, Nov 2 2005.
- RAUT, S. et al. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 1, p. 8-15, 2/10/2012.
- RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 5// 2012.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v. 27, p. 771-780, 2004.
- RICE-EVANS, C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. **Proc Soc Exp Biol Med,** v. 220, n. 4, p. 262-6, Apr 1999.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science,** v. 2, n. 4, p. 152-159, 4// 1997.
- RITTIE, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Res Rev,** v. 1, n. 4, p. 705-20, Sep 2002.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 837-841, 3/1/1988.
- RODRIGUES, T. et al. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 1, p. 136-42, May 2002.
- RUBIO, L. et al. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. **Int J Dermatol,** v. 50, n. 7, p. 881-9, Jul 2011.
- SALIOU, C. et al. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 2, p. 154-60, Jan 15 2001.
- SANDER, C. S. et al. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 326-335, May 2004.
- SANDER, C. S. et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. **J Invest Dermatol,** v. 118, n. 4, p. 618-25, Apr 2002.
- SANTA-MARÍA, C. et al. Protection against free radicals (UVB irradiation) of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. Study using human keratinocyte monolayer and

- reconstructed human epidermis. **Food and Chemical Toxicology,** v. 48, n. 1, p. 83-88, 1// 2010.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.
- SEKKAT, N.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. **J Pharm Sci**, v. 91, n. 11, p. 2376-81, Nov 2002.
- SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta,** v. 360, n. 3, p. 794-802, 2/15/2007.
- SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2058-70, Sep 2006.
- SHAH, H.; RAWAL MAHAJAN, S. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 3, n. 3, p. 161-169, 7// 2013.
- SHINDO, Y. et al. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **J Invest Dermatol,** v. 102, n. 4, p. 470-5, Apr 1994.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J Invest Dermatol,** v. 100, n. 3, p. 260-5, Mar 1993.
- SIERENS, J. et al. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutat Res,** v. 485, n. 2, p. 169-76, Mar 7 2001.
- SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-387, 7/1/2007.
- SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, // 2007.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-172, 1999.
- SIVAMANI, R. K.; MAIBACH, H. I. Fruits are rich in antioxidants and ripe for topical therapy. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 20, n. 4, p. 186-189, 2009.
- SMITH, M. L.; FORNACE, A. J. p53-mediated protective responses to UV irradiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 94, n. 23, p. 12255-12257, Nov 11 1997.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. In: (Ed.). **Biotechniques**. United States, v.38, 2005. p.73-83.

- SONG, X. Z.; BI, Z. G.; XU, A. E. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCaT cells. **Chin Med J (Engl),** v. 119, n. 4, p. 282-7, Feb 20 2006.
- SOOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200-213, 11/11/2005.
- SOUZA, J. N. S., Etude des propriétés antioxydantes in vitro d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Inga edulis* et caractérisation partielle des composés phénoliques. (Promoteurs : Larondelle Y., Rogez H.) 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**, v. 106, n. 1, p. 331-339, Jan 1 2008.
- SUN, H. B.; MALACINSKI, G. M.; YOKOTA, H. Promoter competition assay for analyzing gene regulation in joint tissue engineering. **Front Biosci**, v. 7, p. a169-74, Aug 1 2002.
- SURH, Y.-J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 480–481, n. 0, p. 243-268, 9/1/2001.
- SVOBODOVA, A.; VOSTALOVA, J. Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options. **International Journal of Radiation Biology,** v. 86, n. 12, p. 999-1030, Dec 2010.
- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub,** v. 150, n. 1, p. 25-38, Jul 2006.
- SVOBODOVA, A. et al. Flavonolignans from Silybum marianum moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes. **J Dermatol Sci,** v. 48, n. 3, p. 213-24, Dec 2007.
- TAN, F. et al. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 164-70, Feb 2008.
- TANAKA, K. et al. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor kappaB inhibitor, parthenolide. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 315, n. 2, p. 624-30, Nov 2005.
- TANAKA, K. et al. Magnolia ovovata extract and its active component magnolol prevent skin photoaging via inhibition of nuclear factor kappaB. **Eur J Pharmacol,** v. 565, n. 1-3, p. 212-9, Jun 22 2007.
- TERUI, T.; OKUYAMA, R.; TAGAMI, H. Molecular events occurring behind ultraviolet-induced skin inflammation. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 1, n. 5, p. 461-7, Oct 2001.
- THOMAS-AHNER, J. M. et al. Gender differences in UVB-induced skin carcinogenesis, inflammation, and DNA damage. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3468-3474, Apr 1 2007.
- TRUSH, M. A.; EGNER, P. A.; KENSLER, T. W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 1994.

- UITTO, J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. **J Drugs Dermatol**, v. 7, n. 2 Suppl, p. s12-6, Feb 2008.
- ULLRICH, S. E. The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation-induced immune suppression. **Photochem Photobiol**, v. 62, n. 3, p. 389-401, Sep 1995.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN ACKER, S. A. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic Biol Med, v. 20, n. 3, p. 331-42, 1996.
- VARANI, J. et al. Inhibition of Type I Procollagen Synthesis by Damaged Collagen in Photoaged Skin and by Collagenase-Degraded Collagen in Vitro. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 931-942, 3// 2001.
- VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 53-57, 2006.
- VAYALIL, P. K.; ELMETS, C. A.; KATIYAR, S. K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 5, p. 927-36, May 2003.
- VERSCHOOTEN, L. et al. New strategies of photoprotection. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 4, p. 1016-1023, Jul-Aug 2006.
- VERSTRAETEN, S. V. et al. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 84-92, 1/1/2003.
- VICENTINI, F. T. et al. Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 69, n. 3, p. 948-57, Aug 2008.
- VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Assessment of in vitro methodologies to determine topical and transdermal delivery of the flavonoid quercetin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 357-364, 2009.
- VICENTINI F. T.. M C.; GEORGETTI S. R.; JABOR J. R.; CARIS J. A.; BENTLEY M. V. L. B.; FONSECA M. J. V. Photostability of Quercetin under Exposure to UV irradiation. Latin American Journal of Pharmacy, p.119-124, 2007
- VICENTINI, F.T.M.C.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: A liquid crystalline formulation. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, p.805-810, 2007b
- WEINSTOCK, M. A. Do sunscreens increase or decrease melanoma risk: an epidemiologic evaluation. **J Investig Dermatol Symp Proc,** v. 4, n. 1, p. 97-100, Sep 1999.
- WERTZ, P. W. Current understanding of skin biology pertinent to skin penetration: skin biochemistry. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 26, n. 4-6, p. 217-26, 2013.

- WESOŁOWSKA, O. et al. Interaction of the chemopreventive agent resveratrol and its metabolite, piceatannol, with model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes**, v. 1788, n. 9, p. 1851-1860, 9// 2009.
- WHITE, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. **Genes & Development,** v. 10, n. 1, p. 1-15, Jan 1 1996.
- WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respir Physiol,** v. 128, n. 3, p. 379-91, Nov 15 2001.
- WISEMAN, S.; MULDER, T.; RIETVELD, A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. **Antioxid Redox Signal,** v. 3, n. 6, p. 1009-21, Dec 2001.
- WITTGEN, H. G.; VAN KEMPEN, L. C. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. **Melanoma Res**, v. 17, n. 6, p. 400-9, Dec 2007.
- WOOD, L. C. et al. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 106, n. 3, p. 397-403, Mar 1996.
- WRIGHT, T. I.; SPENCER, J. M.; FLOWERS, F. P. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, n. 6, p. 933-46; quiz 947-50, Jun 2006.
- WU, J. H. et al. Phenolic antioxidants from the heartwood of Acacia confusa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, n. 15, p. 5917-5921, Jul 27 2005.
- WU, W.-B. et al. (+)-Catechin prevents ultraviolet B-induced human keratinocyte death via inhibition of JNK phosphorylation. **Life Sciences**, v. 79, n. 8, p. 801-807, 7/17/2006.
- XIA, J. et al. UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. **Int J Mol Med,** v. 16, n. 5, p. 943-50, Nov 2005.
- XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of Myeloperoxidase in Leukocyte-Containing Tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 245, n. 1, p. 93-96, 1997.
- XU, Y. R.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science**, p. S1-S8, Dec 2005.
- YANG, C. S.; MALIAKAL, P.; MENG, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 42, p. 25-54, 2002.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **J Agric Food Chem,** v. 52, n. 2, p. 255-60, Jan 28 2004.
- YOUNG, A. R. Acute effects of UVR on human eyes and skin. **Prog Biophys Mol Biol,** v. 92, n. 1, p. 80-5, Sep 2006.
- YU, B. P.; YANG, R. Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 786, p. 1-11, Jun 15 1996.
- ZAMBETTI, G. P.; LEVINE, A. J. A COMPARISON OF THE BIOLOGICAL-ACTIVITIES OF WILD-TYPE AND MUTANT-P53. **Faseb Journal,** v. 7, n. 10, p. 855-865, Jul 1993.

ZHANG, J. et al. Inhibition of lipid oxidation by phenolic antioxidants in relation to their physicochemical properties. Pharmacologyonline v. 1, p. 180-189 (2007).

ZHOU, B. R. et al. Baicalin protects human skin fibroblasts from ultraviolet A radiation-induced oxidative damage and apoptosis. **Free Radic Res**, v. 46, n. 12, p. 1458-71, Dec 2012.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clin Dermatol**, v. 29, n. 1, p. 3-14, Jan-Feb 2011.

7 Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus de Ribeirão Preto

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.496.53.1), intitulado "Estudo fotoquimioprotetor *in vitro* e *in vivo* de extratos de plantas amazônicas", de autoria de Rebeca Oliveira de Souza e Maria José Vieira Fonseca, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/11/2013.

Colaborador: Hervé Rogez

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.496.53.1), entitled: "Estudo fotoquimioprotetor *in vitro* e *in vivo* de extratos de plantas amazônicas", by **Rebeca Oliveira de Souza and Maria José Vieira Fonseca** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, November, 4 2013.

Ribeirão Preto, 05 de novembro de 2013.

Presidente da CEUA

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA

Vanessa Bombonato Garcia

