UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoquimiopreventivo do extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas

Ana Luiza Scarano Aguilera Forte

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoquimiopreventivo do extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas

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: Ana Luiza Scarano Aguilera Forte

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

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Melero Zaera

Ribeirão Preto

2016

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.

Forte, Ana Luiza Scarano Aguilera

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoquimiopreventivo do extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas. Ribeirão Preto, 2016.

166 p.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profª Drª Maria José Vieira Fonseca

Coorientadora: Profª Drª Ana Melero Zaera

1. Ácido clorogênico. 2. Fotoquimioprevenção. 3. Lipossomas flexíveis.
4. *Lychnophora salicifolia*. 5. Radiação ultravioleta

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Luiza Scarano Aguilera Forte

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoquimiopreventivo do extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas

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

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Melero Zaera

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimientos

À Profª Drª Maria José Vieira Fonseca, pela orientação e amizade. Agradeço por compartilhar conosco sua experiência e seus conhecimentos, por confiar em meu trabalho e pelo seu exemplo de profissionalismo. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Norberto Peporíne Lopes e à Drª Dayana Rubío Gouvea por disponibilizarem o extrato vegetal utilizado neste estudo.

À Profª Drª Ana Melero Zaera, por ter me recebido tão carinhosamente em seu grupo de pesquisa. Agradeço pelos ensinamentos, por nossos momentos de descontração e por todo seu apoio durante o período de estágio na Universitat de València. ¡Muchas Gracias!

À Profª Drª Teresa María Garrigues Pelufo, pela oportunidade de realizar o estágio de pesquisa no exterior, pela amizade e pelos ensinamentos.

Às queridas amigas do nosso grupo de pesquisa: Daniele, Dayane, Fernanda, Geórgia, Karini, Michele, Mirela, Rebeca, Sílvia, Sônia, Vanessa e Yris. Agradeço pelas discussões científicas enriquecedoras, pelo apoio nos experimentos e pelo companheirismo. Agradeço também ao amigo Rodrigo pelo auxílio no desenvolvimento dos lipossomas e nos estudos de reologia.

Ao técnico e amigo, José Roberto Jabor, por todo suporte para realização deste trabalho.

Aos queridos colegas do Departamento de Farmácia y Tecnología Farmacéutica da Universitat de València: Adrian, Alberto, Alejandro, Ana, Iris, Isabel, Juanjo, Lílíane, Márcia, Raul, Teresa, Valentina, Wilian e Yolanda pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração que muito me ensinaram e tornaram minha vida no exterior mais produtiva e agradável. Aos técnicos Carmina e José, e às secretárias Juana e Pilar por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores da FCFRP-USP, Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dr. Carlos Curti, Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, Dr^a Lusânia Maria Greggí Antunes, Dr^a Renata Fonseca Vianna Lopez, Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dr^a Yara Maria Lucisano Valim por estarem sempre com seus laboratórios de portas abertas para ajudar e ensinar, e por disponibilizarem equipamentos que foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos funcionários do biotério da FCFRP-USP 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.

À Rosana Florêncio, Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi, funcionários do Serviço de Pós-Graduação, pela atenção, gentileza e assistência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo 2011/23560-6), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE) (Processo BEX 2594/14-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado (Processo 141056/2012-6), e pelo suporte financeiro.

À minha família, por todo apoio e incentivo. A ela devo toda minha formação, pela qual serei eternamente grata.

Ao Dr. Leonardo Neves de Andrade, a quem admiro muito. Agradeço por todo amor, companheirismo, incentivo e dedicação. Muito obrigada por você estar presente nesta etapa tão importante da minha vida!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

*Las ideas no duran mucho.
Hay que hacer algo con ellas.*

Santiago Ramón y Cajal (1867-1934)

RESUMO

FORTE, A. L. S. A. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoquimiopreventivo do extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas. 2016. 166 f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A pele possui um grande número de mecanismos de defesa antioxidante. No entanto, a exposição prolongada à radiação ultravioleta (RUV), é capaz de aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocando um desequilíbrio antioxidante/oxidante. A geração de EROs pode levar ao fotoenvelhecimento e doenças, como o câncer. A administração tópica de antioxidantes é uma maneira eficiente de enriquecer o sistema protetor cutâneo endógeno e, assim, uma estratégia para reduzir os danos oxidativos causados pela RUV à pele. Entretanto, para fornecer a proteção adequada à pele, estas substâncias devem ultrapassar a barreira imposta pelo estrato córneo. O extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. possui compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória e analgésica, como o ácido clorogênico e a vicenina-2, sendo, portanto, um possível candidato à agente protetor dos danos induzidos pela radiação na pele. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial fotoquimiopreventivo deste extrato e do ácido clorogênico, bem como de formulações contendo o extrato e a substância isolada encapsulados em lipossomas. Para atingir tal objetivo, foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo* de atividade antioxidante e eficácia fotoquimiopreventiva para comprovação do potencial antioxidante e anti-inflamatório, estudos de liberação e estudos de penetração cutânea das formulações utilizando pele humana e pele de orelha de porco. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato possui atividade antioxidante *in vitro* e baixa citotoxicidade. A incorporação do extrato e da substância isolada em lipossomas foi bem sucedida, uma vez que estes demonstraram uma boa estabilidade físico-química e aumentaram a penetração dos compostos na pele de camundongos sem pelos. As formulações contendo lipossomas permitiram que os compostos do extrato e o ácido clorogênico isolado atravessassem o estrato córneo chegando até epiderme e derme na pele humana *ex vivo*. O acúmulo de partículas nos folículos pilosos parece não exercer influência neste processo. Os extrato foi capaz de sequestrar EROs intracelulares e evitar a depleção do antioxidante endógeno GSH tanto em cultura de células como nos experimentos *in vivo*. Também foi observada a inibição *in vivo* da metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), enzima ativada pela RUV e que tem a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular da pele. Além disso, o extrato apresentou atividade anti-inflamatória superior à do ácido clorogênico, verificada pela diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) *in vivo*. Portanto, o extrato parece ser um agente fotoquimiopreventivo promissor para uso tópico e, as formulações desenvolvidas, um sistema viável para liberação destas substâncias na pele.

Palavras-Chave: Ácido clorogênico, Fotoquimioprevenção, Lipossomas flexíveis, *Lychnophora salicifolia*, Radiação ultravioleta.

ABSTRACT

FORTE, A. L. S. A. ***In vitro* and *in vivo* photochemoprevent potential evaluation of *Lychnophora salicifolia* extract and chlorogenic acid free and entrapped in liposomes.** 2016. 166 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The skin has several defense mechanisms to avoid oxidant damages. However, a prolonged exposition under ultraviolet radiation (UVR) may increase reactive oxygen species (ROS) concentration causing antioxidant/oxidant imbalance. ROS generation can induce photoaging and skin cancer. Topical administration of antioxidants is an efficient way to fortify the endogenous protection system and to reduce the oxidative damage caused by UVR. Nevertheless, to be effective, these compounds need to pass through the skin barrier imposed by *stratum corneum*. *Lychnophora salicifolia* Mart. extract has antioxidant, antiinflammatory and analgesic compounds, such as chlorogenic acid and vicenin-2, and it may be a skin protector agent against UVR damage. Therefore, the aim of this study was to evaluate the photochemopreventive potential of this extract and chlorogenic acid, as well as their formulation containing liposomes. *In vitro* and *in vivo* tests were performed to prove antioxidant and antiinflammatory activity. Formulation release and skin penetration studies were also carried out in human and porcine ear skin. The results showed that the extract has antioxidant activity *in vitro* and low cytotoxicity. The extract and the isolated compound were successfully entrapped in liposomes, demonstrating a good physic and chemical stability and increasing the skin penetration in hairless mice. The formulations containing liposomes allowed that the extract compounds and chlorogenic acid passed through the *stratum corneum* and reached epidermis and dermis in human skin *ex vivo*. The hair follicle uptake of the particles do not influenced the penetration process. The extract was able to scavenge intracellular ROS and avoid the depletion of the endogenous GSH both in cell culture and *in vivo*, even as it inhibited matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), enzyme activated by UVR that degrades skin matrix extracellular components. The extract also presented larger antiinflammatory properties than chlorogenic acid, decreasing the cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) levels and the mieloperoxidase activity *in vivo*. Therefore, the results suggest the potential applicability of the extract as a photochemopreventive agent to topical use and the developed formulations seem to be a viable system to release these compounds to the skin.

Keywords: Chlorogenic acid, Photochemoprevention, Deformable liposomes, *Lychnophora salicifolia*, Ultraviolet radiation.

RESUMEN

FORTE, A. L. S. A. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del potencial fotoquimiopreventivo del extracto de *Lychnophora salicifolia* Mart. y del ácido clorogénico libres y formulados en liposomas. 2016. 166 f. Tesis (doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

La piel posee varios mecanismos de defensa antioxidante. Sin embargo, la exposición prolongada a la radiación ultravioleta (RUV) puede aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs) promoviendo un desequilibrio antioxidante/oxidante. La generación de EROs puede dar lugar a fotoenvejecimiento y a enfermedades, como cáncer. La administración tópica de antioxidantes es una manera efectiva de fortalecer el sistema protector cutáneo endógeno y, así, una estrategia para reducir los daños oxidativos causados por la RUV a piel. No obstante, para que la protección de la piel sea eficaz, esos activos deben atravesar la barrera del estrato córneo. El extracto de *Lychnophora salicifolia* Mart. posee compuestos con actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica, como el ácido clorogénico y la vicenina-2, siendo así un posible agente protector de la piel contra los daños producidos por la RUV. Por lo tanto, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el potencial fotoquimiopreventivo de ese extracto y del ácido clorogénico libres y formulados en liposomas. Para lograr tal objetivo, se ha llevado a cabo un estudio mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* para comprobar las actividades antioxidante y antiinflamatoria. Además, se ha llevado a cabo un estudio de liberación y absorción cutánea de los activos en piel humana y porcina. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto posee actividad antioxidante *in vitro* y baja citotoxicidad. La incorporación del extracto y del ácido clorogénico en liposomas ha sido posible, presentando una buena estabilidad físico-química y aumentando la penetración de los activos en la piel de ratones sin pelos. Las formulaciones con liposomas han permitido que los compuestos del extracto y el ácido clorogénico atravesasen el estrato córneo y llegasen hasta la epidermis y la dermis en la piel humana *ex vivo*. Sin embargo, la penetración a través de los folículos pilosos parece ejercer baja influencia en este proceso. El extracto ha sido capaz de recoger EROs intracelulares y evitar el descenso en los niveles del antioxidante endógeno GSH tanto en cultivos celulares como en los experimentos *in vivo*. También se ha observado la inhibición *in vivo* de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9), enzima activada por la RUV y que tiene la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular de la piel. Además, el extracto mostró actividad antiinflamatoria superior al ácido clorogénico, disminuyendo los niveles de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) y la actividad de la enzima mieloperoxidase (MPO) *in vivo*. Por lo tanto, el extracto puede ser considerado un agente fotoquimiopreventivo promisor para uso tópico y, las formulaciones desarrolladas, un sistema viable para la liberación de esos activos en la piel.

Palabras clave: Ácido clorogénico, Fotoquimiopreención, Liposomas deformables, *Lychnophora salicifolia*, Radiación ultravioleta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um corte transversal de pele.....	6
Figura 2. Representação esquemática dos lipossomas.	8
Figura 3. Mecanismos propostos para atuação dos lipossomas	9
Figura 4. Mecanismo de penetração das vesículas altamente deformáveis na pele seguindo o gradiente de hidratação transepidermal.....	10
Figura 5. A espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> em seu habitat natural	18
Figura 6. Esquema do protocolo utilizado para a determinação da fototoxicidade...28	
Figura 7. Representação esquemática do modelo de aplicação das formulações sobre a pele humana <i>ex vivo</i>	35
Figura 8. Representação esquemática da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB	37
Figura 9. Esquema dos estudos de eficácia <i>in vivo</i>	38
Figura 10. Cromatograma do extrato das folhas da espécie <i>L. salicifolia</i>	44
Figura 11. Via do ácido chiquímico para a biossíntese dos principais compostos fenólicos derivados da fenilalanina.....	46
Figura 12. Curvas de calibração dos padrões ácido clorogênico e vicenina-2.	50
Figura 13. Curva dos espectros de absorbância na região do UV do extrato irradiado e não irradiado	58

Figura 14. Viabilidade das células da linhagem L929 tratadas com diversas concentrações do extrato de <i>L. salicifolia</i> Mart.....	59
Figura 15. Inibição da intensidade de fluorescência causada pelo pré-tratamento com ácido clorogênico e com extrato de <i>L. salicifolia</i> nas células adicionadas de H ₂ O ₂	62
Figura 16. Inibição da intensidade de fluorescência causada pelo pré-tratamento com ácido clorogênico e com extrato de <i>L. salicifolia</i> nas células irradiadas	63
Figura 17. Representação esquemática do experimento utilizado para avaliar o potencial fotoprotetor e gráfico dos resultados obtidos	64
Figura 18. Quantificação de GSH em células da linhagem L929	65
Figura 19. Liberação de LDH nos diferentes grupos de células.	67
Figura 20. Representação da curva hormética ilustrando a relação entre intensidade de estresse e capacidade homeostática.	69
Figura 21. Representação esquemática da dupla camada elétrica e variação no potencial com a distância em relação à superfície da partícula suspensa em um meio.	74
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das dispersões de lipossomas.....	76
Figura 23. Avaliação da estabilidade dos lipossomas pela média do tamanho de partículas.....	80
Figura 24. Avaliação da estabilidade dos lipossomas pela peroxidação lipídica.....	81
Figura 25. Reogramas das formulações géis	85

Figura 26. Perfil de liberação do ácido clorogênico e da vicenina-2 das formulações géis contendo extrato de <i>L. salicifolia</i>	86
Figura 27. Perfil de liberação das formulações géis contendo ácido clorogênico.....	87
Figura 28. Gráficos de representação da equação de Higuchi dos géis contendo extrato de <i>L. salicifolia</i>	88
Figura 29. Gráficos de representação da equação de Higuchi dos géis contendo ácido clorogênico	89
Figura 30. Difusão do ácido clorogênico através de epiderme humana <i>in vitro</i>	91
Figura 31. Distribuição de vicenina-2 nas diversas camadas de pele humana <i>ex vivo</i> após 2 horas de incubação com as formulações géis contendo extrato	94
Figura 32. Distribuição de vicenina-2 nas diversas camadas de pele humana <i>ex vivo</i> após 4 horas de incubação com as formulações géis contendo extrato	95
Figura 33. Distribuição do ácido clorogênico nas diversas camadas de pele humana <i>ex vivo</i> após 2 horas de incubação com as formulações géis.....	97
Figura 34. Distribuição do ácido clorogênico nas diversas camadas de pele humana <i>ex vivo</i> após 4 horas de incubação com as formulações géis.....	98
Figura 35. Porcentual da dose de vicenina-2 recuperada por segmento de pele...	101
Figura 36. Perfis cromatográficos da penetração cutânea <i>in vivo</i> dos géis contendo ácido clorogênico	103
Figura 37. Perfis cromatográficos da penetração cutânea <i>in vivo</i> dos géis contendo extrato	104

Figura 38. Representação esquemática da interação <i>in vivo</i> entre vesículas elásticas e o estrato córneo da pele de camundongos sem pelos	105
Figura 39. Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina e avaliação da eficácia <i>in vivo</i> pela medida da atividade da MMP-9.....	107
Figura 40. Eletroforese das amostras de colágeno extraídas da pele de camundongos sem pelo	109
Figura 41. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) e pela recuperação dos níveis de GSH	111
Figura 42. Avaliação da eficácia anti-inflamatória <i>in vivo</i> pela quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos géis preparados.....	32
Tabela 2. Identificação dos sinais cromatográficos.....	45
Tabela 3. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos benzóico e cinâmico	46
Tabela 4. Estrutura química dos compostos identificados no extrato	48
Tabela 5. Valores dos limites de detecção e quantificação dos padrões.....	50
Tabela 6. Precisão e exatidão do método analítico	51
Tabela 7. Valores de foto-efeito médio (MPE) obtidos pela comparação estatística das curvas dose-resposta do extrato nas células da linhagem L929 não irradiadas e irradiadas em diferentes doses de RUV	61
Tabela 8. Caracterização dos lipossomas	72
Tabela 9. Análise do comportamento reológico e do pH das formulações	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical hidroxila
K	Índice de consistência
γ	Taxa de cisalhamento
τ	Tensão de cisalhamento
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
AAPH	Hidrocloreto de 2, 2' – azobis (2-amidinopropano)
AC	Ácido clorogênico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína ativadora-1
ASC	Área sob a curva
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHT	Hidroxibutiltolueno
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CaA	Ácido caféico
CAT	Catalase
CI	Grupo controle irradiado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração média determinada
CNI	Grupo controle não irradiado
CoA	Ácido p-cumárico
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CPD	Ciclobutanodipirimidinas
CV	Coeficiente de variação
Cryo-SEM	Microscopia eletrônica de varredura com criofixação da amostra

DCF	2', 7'-diclorofluoresceína
DCFH	2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
E+D	Epiderme viável + derme
EE	Eficiência de encapsulação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido Bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetra-acético
ELS	Extrato de <i>Lychnophora salicifolia</i>
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FA	Ácido ferúlico
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FPS	Fator de proteção solar
GPx	Glutational peroxidase
GRed	Glutational redutase
GSH	Glutational reduzida
GSSG	Glutational oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEC	Hidroxietil-celulose
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil-amônio
IAC	Grupo dos animais irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas com ácido clorogênico

IC ₅₀	Concentração de amostra que inibe 50% do sistema
IE	Grupo dos animais irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas com extrato de <i>Lychnophora salicifolia</i>
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP	Grupo dos animais irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas sem ativo
J	Valor de fluxo
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal
K _{o/a}	Coeficiente de partição n-octanol/água
Kp	Coeficiente de permeabilidade
LD	Limite de detecção
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO•	Radical alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPS	Lipopolissacarídeos
LQ	Limite de quantificação
LUV	Grandes vesículas unilamelares
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MLV	Vesículas multilamelares
MMP	Metaloproteinases da matriz
MMP-1	Colagenase 1 ou colagenase intersticial
MMP-2	Gelatinase-A
MMP-3	Estromelisina-1
MMP-9	Gelatinase-B

MPE	Foto-efeito médio
MPO	Mieloperoxidase
n	Índice de fluxo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
NI	Grupo controle não irradiado
NIAC	Grupo dos animais não irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas com ácido clorogênico
NIE	Grupo dos animais não irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas com extrato de <i>Lychnophora salicifolia</i>
NIP	Grupo dos animais não irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas sem ativo
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OH	Grupo hidroxila
OPT	O-ftalaldeído
PAL	Enzima fenilalanina amônia liase
PBS	Solução tampão fosfato
PdI	Índice de polidispersividade
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogênio
PLA2	Fosfolipase A2
PMNs	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados

RNA	Ácido ribonucleico
RUV	Radiação ultravioleta
SA	Ácido sinápico
SBC	<i>Sunburn cells</i>
SBF	Soro fetal bovino
SCCNFP	Comitê Científico em Cosméticos e Produtos Não-alimentícios
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SUV	Pequenas vesículas unilamelares
TBA	Ácido tiobarbitúrico
Temed	N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TIMP	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
Unicamp	Universidade de Campinas
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. Introdução	1
1.1. A função barreira da pele	5
1.2. Sistemas vesiculares altamente deformáveis.....	7
1.3. A radiação ultravioleta e os danos causados à pele.....	11
1.4. O extrato de <i>Lychnophora salicifolia</i> Mart. como fotoquimiopreventivo	16
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Material e Métodos.....	23
3.1. Obtenção do extrato vegetal e dos compostos isolados	24
3.2. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	24
3.2.1. Medida da atividade doadora de H ⁺ ao radical DPPH [•]	25
3.2.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina-oxidase (XOD)/luminol	25
3.2.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	25
3.3. Determinação da fotoestabilidade do extrato	26
3.4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	26
3.5. Avaliação da citotoxicidade e da fototoxicidade em cultura de células.....	27
3.5.1. Linhagem celular e cultivo	27

3.5.2.	Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro	27
3.5.3.	Determinação da fototoxicidade do extrato	27
3.6.	Avaliação do potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células	29
3.6.1.	Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular por medida fluorimétrica.....	29
3.6.2.	Avaliação da atividade antioxidante por quantificação de GSH	29
3.6.3.	Liberação de lactato desidrogenase (LDH)	30
3.7.	Preparação e avaliação de formulações para uso tópico	30
3.7.1.	Preparação dos lipossomas	30
3.7.2.	Caracterização dos lipossomas	30
3.7.3.	Avaliação da estabilidade física e química dos lipossomas	31
3.7.4.	Preparação das formulações géis.....	31
3.7.5.	Avaliação do pH e do comportamento reológico das formulações.....	33
3.7.6.	Determinação do perfil de liberação dos ativos.....	33
3.8.	Estudos <i>in vitro</i> de permeabilidade em epiderme humana.....	34
3.9.	Estudos de distribuição dos ativos em pele humana <i>ex vivo</i>	34
3.10.	Estudos de <i>tape-stripping</i> diferencial	35
3.11.	Estudos <i>in vivo</i>	36
3.11.1.	Estudos de penetração cutânea <i>in vivo</i>	36
3.11.2.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> contra os danos induzidos pela RUV.....	37
3.11.2.1.	Análise da atividade das metaloproteinases.....	39
3.11.2.2.	Extração do colágeno das amostras de pele	40
3.11.2.3.	Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	41
3.11.2.4.	Quantificação do antioxidante endógeno GSH	41
3.11.2.5.	Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	42

3.12. Análise estatística dos resultados	42
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1. O extrato de <i>Lychnophora salicifolia</i>	44
4.2. Validação do método analítico.....	49
4.3. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	52
4.3.1. Medida da atividade doadora de H ⁺ ao radical DPPH [•]	53
4.3.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol.....	54
4.3.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	55
4.4. Avaliação da fotoestabilidade do extrato	57
4.5. Avaliação da citotoxicidade e da fototoxicidade em cultura de células.....	58
4.6. Avaliação do potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células	61
4.6.1. Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular por medida fluorimétrica.....	61
4.6.2. Avaliação da atividade antioxidante por quantificação de GSH	64
4.6.3. Liberação de lactato desidrogenase (LDH)	66
4.7. Preparação e avaliação de formulações para uso tópico	70
4.7.1. Caracterização dos lipossomas	71
4.7.2. Avaliação da estabilidade física e química dos lipossomas	76
4.7.3. Avaliação do pH e do comportamento reológico das formulações.....	82
4.7.4. Determinação do perfil de liberação dos ativos.....	85
4.8. Estudos <i>in vitro</i> de permeabilidade em epiderme humana.....	90
4.9. Estudos de distribuição dos ativos em pele humana <i>ex vivo</i>	92
4.10. Avaliação da penetração transfolicular pelo método de <i>tape-stripping</i> diferencial.....	98
4.11. Estudos <i>in vivo</i>	102

4.11.1. Estudos de penetração cutânea <i>in vivo</i>	102
4.11.2. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> contra os danos induzidos pela RUV.....	105
4.11.2.1. Análise da atividade das metaloproteinases.....	105
4.11.2.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	109
4.11.2.3. Quantificação do antioxidante endógeno GSH	110
4.11.2.4. Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	111
5. Conclusões	115
6. Referências	118

1. Introdução

O excesso de exposição à radiação ultravioleta (RUV) natural ou artificial é apontado como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de todos os tipos de câncer de pele. Segundo a Associação Americana de Câncer, o câncer de pele é o mais diagnosticado nos Estados Unidos. Os tipos de câncer de pele não melanoma são os mais frequentes e possuem bom prognóstico, principalmente quando detectados precocemente. No entanto, estima-se que em 2015, somente nos Estados Unidos, foram diagnosticados 73.870 novos casos de câncer tipo melanoma. Apesar de representar apenas 2% entre todos os casos de câncer de pele, o câncer tipo melanoma é altamente letal e atinge principalmente à população caucasiana não hispânica. Nos últimos 30 anos, as taxas de incidência de melanoma aumentaram rapidamente e, embora o número de casos em jovens se mantenha constante, os casos em pessoas com mais de 50 anos crescem 2,6% a cada ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, o câncer de pele do tipo não melanoma é o mais incidente em ambos os sexos e, ainda que exista um sub-registro desta neoplasia em função do subdiagnóstico, corresponde a 25% de todos os tumores registrados no país. O câncer tipo melanoma representa 4% das neoplasias malignas registradas na pele. Estima-se que em 2016 serão diagnosticados mais de 80.000 novos casos de câncer de pele não melanoma em homens e mais de 94.000 em mulheres, e aproximadamente 6.000 novos casos de melanoma proporcionalmente distribuídos entre homens e mulheres, sendo que as maiores taxas estimadas estão no sul país onde a maior parte da população é caucasiana (INCA, 2015).

Como medidas de prevenção, a Organização Mundial de Saúde recomenda limitar à exposição solar das dez horas da manhã às quatro horas da tarde; manter-se na sombra; usar roupas protetoras, óculos de sol e chapéus; usar protetores solares de amplo espectro e fator de proteção solar (FPS) 15 ou superior; evitar o uso de câmaras de bronzamento artificial; e, principalmente, evitar a exposição de crianças ao sol, uma vez que elas são mais susceptíveis aos danos e que queimaduras solares na infância podem aumentar os riscos da ocorrência de câncer tipo melanoma na idade adulta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Apesar do aumento no consumo de protetores solares, a maneira como a população utiliza esses produtos, muitas vezes, faz com que não se alcance a eficácia desejada. Recomenda-se o uso da dose de $2\text{mg}/\text{cm}^2$ de pele, porém, Ou-

Yang e colaboradores (2012) observaram que os voluntários aplicavam em média $0,5\text{mg}/\text{cm}^2$ e, desta forma, uma formulação com valor de FPS 30 passa a FPS 7, e de FPS 15 passa a FPS 4. De acordo com a legislação brasileira, RDC 30 de 01/06/2012, um produto cosmético adequado para bronzear ou fotoproteger deve apresentar um FPS igual ou superior a 6 (BRASIL, 2012), portanto, nestas condições, a proteção estaria muito próxima ao limite aceitável ou seria insuficiente.

Como agravante da utilização de quantidades insuficientes de protetor solar, após a aplicação do produto, as pessoas tendem a ficarem expostas ao sol por um período de tempo prolongado porque não sentem os primeiros sinais de queimadura solar, já que a determinação do valor de FPS considera os efeitos causados pela radiação UVB (280-320nm) e UVA II (320-340nm) responsáveis por causar a vermelhidão e a queimadura solar, mas não oferece proteção contra os danos provocados pela radiação UVA I (340-400nm) e pela luz visível, responsáveis pelos danos cumulativos na pele principalmente devido à produção de radicais livres (SIVAMANI; GHIYA; MAIBACH, 2010). Por este motivo, atualmente, a maioria dos protetores solares comercializados associa filtros UVA e UVB, sendo que a proteção UVA deve ser no mínimo 1/3 do FPS declarado na embalagem (BRASIL, 2012). No entanto, nem todos os filtros solares possuem fotoestabilidade e com a exposição à RUV podem mudar seu espectro de ação ou atuar como oxidantes gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) quando em contato com a pele. Um estudo conduzido por Hojerová e colaboradores (2011) avaliou a estabilidade de quinze protetores solares comerciais de FPS 20 quando submetidos à radiação solar, os resultados demonstraram uma grande variabilidade entre os produtos em relação à proteção UVA. Após a exposição, sete produtos exibiram instabilidade em toda a faixa de RUV (290-400nm), apenas cinco mantiveram os níveis de proteção UVA preconizados pela Comissão Européia, somente um produto demonstrou excelente estabilidade e outros três mantiveram muito boa estabilidade na região da radiação UVA I, enquanto que oito produtos perderam a estabilidade frente a este tipo de radiação. Estes resultados enfatizam a importância da fotoestabilidade para manter a eficácia e segurança do produto.

Sem a proteção dos filtros solares, a energia eletromagnética inerente da RUV é absorvida pelos cromóforos celulares da pele e convertida em energia química. Os cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração de EROs (XU; FISHER, 2005). Além disso, um estudo conduzido por

Hanson e colaboradores (2006) demonstrou que, quando filtros solares químicos penetram nas camadas nucleadas da pele, eles podem aumentar os níveis de EROs além daqueles produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob à RUV. As EROs podem reagir com as moléculas orgânicas, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos, provocando a perda da integridade celular, da funcionalidade enzimática e da estabilidade genômica (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

Atualmente, muitos protetores solares comerciais têm incluído antioxidantes em suas fórmulas, principalmente derivados de vitamina E. Entretanto, para que estes antioxidantes tenham efeito no produto final, eles necessitam cumprir alguns requisitos, como ter uma capacidade antioxidante muito alta, estar em alta concentração, ser estável na formulação e ser capaz de atravessar o estrato córneo da pele (CHEN; HU; WANG, 2012). Um estudo feito com protetores solares comerciais adicionados de antioxidantes constatou que a atividade antioxidante em pele *ex vivo* era inexistente ou muito baixa, sugerindo que os antioxidantes presentes na formulação não exerciam efeito protetor na pele e que a maior proteção era devido ao bloqueio da radiação UVA, ou seja, por impedir a formação dos radicais e não pela neutralização dos mesmos (WANG; OSTERWALDER; JUNG, 2011).

A utilização de extratos de plantas como fonte de antioxidantes de origem natural em produtos de aplicação tópica tem se destacado como alternativa viável para proteger a pele dos danos provocados pela radiação solar (DINKOVA-KOSTOVA, 2008; GREGORIS et al., 2011; TUNDIS et al., 2015). O uso de agentes capazes de prevenir ou combater os efeitos adversos da RUV na pele é definido como fotoquimioprevenção (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003).

Para que as formulações tópicas apresentem efeito fotoquimiopreventivo é necessário que os compostos antioxidantes ultrapassem o estrato córneo e que fiquem retidos nas camadas mais inferiores da pele, onde ocorre a geração de EROs induzida pela RUV. No entanto, a penetração dos compostos antioxidantes encontrados nos extratos vegetais através da pele é limitada, e o sucesso no uso desses agentes por aplicação tópica depende do uso de formulações que possam aumentar sua penetração (NICHOLS; KATIYAR, 2010). Sistemas nanoestruturados, como os lipossomas, podem ser uma alternativa para veiculação tópica de compostos naturais, uma vez que esses sistemas são capazes de protegerem as

substâncias ativas da degradação e de facilitar a ultrapassagem da barreira imposta pelo estrato córneo (PINNELL, 2003). A encapsulação de polifenóis em lipossomas é capaz de aumentar sua atividade biológica e sua biodisponibilidade (FANG; BHANDARI, 2010), além de reduzir sua citotoxicidade (KRISTL et al., 2009).

Neste contexto, estudos com extratos vegetais e suas substâncias isoladas com potencial fotoquimiopreventivo que possam ser incorporados em sistemas de liberação para uso tópico vêm despertando muito interesse, ainda que o volume de trabalhos encontrados na literatura seja reduzido. Assim, neste trabalho serão discutido os diversos aspectos envolvidos no desenvolvimento de formulações fotoquimiopreventivas contendo substâncias de origem natural incorporadas em lipossomas.

1.1. A função barreira da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e uma excelente barreira biológica. Seus mecanismos de defesa evoluíram para inibir o ataque de micro-organismos, partículas ambientais, substâncias tóxicas e radiação ultravioleta (PROW et al., 2011).

Sua estrutura consiste em duas camadas principais denominadas derme e epiderme. A derme, camada mais profunda, é composta por elementos conectivos (colágeno, elastina, glicosaminoglicanas) e contém uma variedade de células (fibroblastos, mastócitos, leucócitos), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, unidades pilossebáceas e glândulas sudoríparas. A camada mais externa, a epiderme, é separada da derme pela membrana basal e está constituída de queratinócitos (cerca de 95%), melanócitos (produtores de melanina), células de Langerhans (células imunológicas) e células de Merkel (receptores de estímulos mecânicos). Os queratinócitos mais profundos estão ancorados na membrana basal por hemidesmossomos (MENON, 2002).

Os queratinócitos passam por um processo de queratinização pelo qual sofrem uma diferenciação celular movendo-se da camada basal (*stratum basale*) através das camadas espinhosa e granulosa (*stratum spinosum* e *stratum granulosum*), até atingirem a camada mais externa, o estrato córneo (*stratum corneum*). A etapa final na diferenciação está associada com uma mudança radical da estrutura dos queratinócitos resultando na sua transformação em corneócitos. Os corneócitos são

células mortas, achatadas, preenchidas com filamentos de queratina e água, as quais estão envolvidas por uma densa rede de proteínas interligadas (envelope celular) (BOUWSTRA; PONEC, 2006).

O estrato córneo é formado por *clusters* (grupos de 5 a 7 corneócitos empilhados) e compostos secretados pelos queratinócitos que lhe dão a aparência de uma parede de tijolos, sendo que os “tijolos” são os *clusters* de corneócitos e o “cimento” é constituído por múltiplas bicamadas lipídicas de ceramidas, ácidos graxos, colesterol e seus ésteres (BARRY, 2001). Este tipo de organização estrutural evita a perda excessiva de água e cria um caminho tortuoso que serve como obstáculo para a entrada de substâncias através da pele (figura 1). Além da sua conformação estrutural, o estrato córneo possui um mecanismo inerente para evitar a penetração de corpos estranhos, como micro-organismos e vírus, pelo qual as camadas mais externas estão em constante descamação, portanto, a epiderme é um tecido dinâmico em constante renovação, no qual a perda de células de superfície é balanceada pelo crescimento das células mais profundas (MATSUI; AMAGAI, 2015).

Figura 1. Representação esquemática de um corte transversal de pele. Barra = 100nm. Adaptado de BOUWSTRA et al., 2003.

O transporte de substância através do estrato córneo ocorre principalmente por difusão passiva por três possíveis rotas: transcelular, intercelular e através dos apêndices cutâneos (unidades pilossebáceas e glândulas sudoríparas) (PROW et al., 2011). A rota intercelular é a mais utilizada, uma vez que a rota transcelular requer não só a partição e difusão da substância através da queratina intracelular, mas também sua partição e difusão através dos lipídios intercelulares (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

Os compostos lipofílicos podem difundir-se através das camadas lipídica ou podem ser puxados ou empurrados por canais pré-existentes ou criados no estrato córneo. Substâncias hidrofílicas devem ser pequenas o suficiente para poderem atravessar por micro canais de 0,5 – 7nm. Se a substância não se encaixa nessas condições, tais canais podem ser ampliados com o uso de forças externas (ultrassom, alta voltagem, micro agulhas) ou se faz necessária a utilização de um sistema carreador (micelas, micro- e nanoemulsões, vesículas, nanopartículas), no entanto, a abertura de canais no estrato córneo pode ocasionar a entrada de micro-organismos e, portanto, deve ser evitada (CEVC; VIERL, 2010).

Embora a penetração através dos folículos pilosos tenha sido ignorada no passado, estudos recentes demonstram que esta pode ser uma importante via para a penetração intra- e transdermal de fármacos (LADEMANN et al., 2008). Além disso, os folículos pilosos atuam como reservatório para substâncias aplicadas topicamente, especialmente para materiais particulados (WOSICKA; CAL, 2010). Micro e nanopartículas acumuladas nos folículos pilosos ficam protegidas da descamação do estrato córneo e podem permanecer por vários dias antes de serem lentamente eliminadas pelo fluxo sebáceo, responsável pelo transporte das partículas até a superfície da pele (RANCAN; BLUME-PEYTAVI; VOGT, 2014; LADEMANN et al., 2013).

1.2. Sistemas vesiculares altamente deformáveis

Nas últimas décadas, a utilização de sistemas lipídicos vesiculares para liberação cutânea de drogas tem ganhado grande destaque, uma vez que eles possibilitam um ótimo efeito localizado com a mínima absorção sistêmica, ou a liberação transdermal objetivando um efeito sistêmico pronunciado (NEUBERT, 2011). As vesículas, também chamadas de lipossomas, são constituídas de uma

bicamada lipídica com núcleo aquoso que podem tanto incorporar ativos hidrofílicos no compartimento aquoso interno, quanto carregar moléculas anfifílicas, hidrofílicas carregadas e lipofílicas na bicamada lipídica por interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas (HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005).

Os lipossomas podem ser divididos de acordo com seu tamanho em três categorias: pequenas vesículas unilamelares (SUV, do inglês *small unilamellar vesicles*) com diâmetro de 20 a 100nm, grandes vesículas unilamelares (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*) maiores que 100nm, e vesículas multilamelares (MLV, do inglês *multilamellar vesicle*) com dimensões que ultrapassam 500nm (GILLET; EVRARD; PIEL, 2011). Devido à grande variabilidade de resultados encontrados na literatura, não é possível estabelecer um consenso de quanto o tamanho das partículas influencia sua penetração na pele.

A partir da década de 90, uma nova classe de vesículas começou a ser pesquisada como carreador de fármacos, as vesículas altamente deformáveis (elásticas, ultraflexíveis, Transferssomas[®]) (CEVC; BLUME, 1992). Estas vesículas são formadas de fosfolipídios com um "ativador da periferia" (em inglês *edge activator*), que geralmente é um surfactante de cadeia simples com a função de desestabilizar a bicamada lipídica das vesículas aumentando sua capacidade de deformação (figura 2). Os ativadores mais utilizados são: colato de sódio, desoxicolato de sódio, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 e glicirrizinato de dipotássio (ELSAYED et al., 2007).

Figura 2. Representação esquemática dos lipossomas. Lipossoma convencional (esquerda) e lipossoma altamente deformável (direita). Adaptado de HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005.

Um considerável número de trabalhos na literatura reporta a capacidade dos lipossomas flexíveis em aumentar a penetração cutânea de fármacos em relação aos lipossomas convencionais, porém, seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Os principais mecanismos sugeridos são: as vesículas atuam como um promotor de penetração facilitando a entrada das moléculas livres através do estrato córneo, ou as vesículas atuam como um sistema carreador passando intactas pelo estrato córneo (figura 3) (EL MAGHRABY; WILLIAMS; BARRY, 2006).

Figura 3. Mecanismos propostos para atuação dos lipossomas. Como carreadores (situação da esquerda) ou como promotores de absorção (situação da direita). Adaptado de HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2005.

Atuando como promotores de absorção, as vesículas poderiam modificar a estrutura lipídica da região intercelular do estrato córneo, como demonstrado por Hofland e colaboradores (2010). Os fosfolipídios da vesícula podem fundir-se com os lipídios do estrato córneo. Este colapso estrutural da vesícula em um meio no qual o fármaco pode ser pouco solúvel poderia, consequentemente, aumentar a atividade termodinâmica facilitando a liberação do fármaco (WILLIAMS; BARRY, 2012). A atividade termodinâmica de um soluto no veículo é um importante propulsor para sua liberação e distribuição na pele e, em soluções saturadas, a atividade termodinâmica é máxima (YUTANI et al., 2014).

O mecanismo que sugere que as vesículas flexíveis passam intactas pelo estrato córneo foi introduzido por Cevc e Blume (1992). Os autores sugerem que os lipossomas entram na pele por xerofobia (tendência a evitar ambientes secos), desta

forma, as vesículas transpassam a pele espontaneamente aproveitando o gradiente de hidratação transcutâneo *in vivo* (figura 4). Portanto, a aplicação oclusiva deste tipo de vesícula não seria recomendada por afetar o gradiente de hidratação transdermal, ou ainda porque a ultra hidratação poderia intumescer os corneócitos fechando ou diminuindo a rota de passagem das vesículas (EL MAGHRABY; WILLIAMS; BARRY, 2006).

Figura 4. Mecanismo de penetração das vesículas altamente deformáveis na pele seguindo o gradiente de hidratação transepidermal. Adaptado de KUMAR; PATHAK; BALI, 2012.

A principal diferença entre os lipossomas convencionais e os altamente deformáveis é a habilidade destes de passar entre as células do estrato córneo sem sofrer fragmentações e alterações de tamanho (CEVC; SCHÄTZLEIN; RICHARDSEN, 2002). Estudo conduzido por Honeywell-Nguyen e colaboradores (2004) confirmou que lipossomas com surfactantes não iônicos na membrana são capazes de penetrar rapidamente em camadas profundas do estrato córneo atingindo a junção com a epiderme viável em 1 hora. Porém, o perfil de distribuição do material demonstrou que o fármaco permaneceu associado às vesículas nas camadas superficiais e intermediárias, mas não nas camadas mais profundas, sugerindo sua liberação parcial das vesículas.

Ambos os mecanismos pelos quais as vesículas altamente deformáveis aumentam a penetração cutânea de substâncias estão suportados por dados da literatura, sendo que um ou outro pode ser predominante dependendo das características físico-químicas do fármaco. Para substâncias hidrofílicas, o efeito de promotor de absorção parece ser mais importante que para as substâncias lipofílicas. Fármacos hidrofílicos não necessitam estar incorporados nas vesículas para um efeito ótimo, pelo contrário, isto poderia ocasionar uma liberação mais lenta, já que os fosfolipídios da membrana formariam uma barreira extra, dificultando a liberação do fármaco. Por outro lado, a penetração de fármacos lipofílicos associados às vesículas pode ser importante para aumentar tanto a deposição na pele quanto a penetração transdermal (ELSAYED et al., 2007).

1.3. A radiação ultravioleta e os danos causados à pele

A radiação ultravioleta emitida pelo sol é dividida em: UVC (200 – 280nm), UVB (280 – 320nm), UVA II (320 – 340nm) e UVA I (340 – 400nm). A radiação UVC, de maior energia e, conseqüentemente, a mais danosa biologicamente, é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e, assim, seu papel nas patologias humanas causadas pela exposição à radiação solar é mínimo (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). Os raios UVB, os mais energéticos comprimentos de onda que atingem a Terra, podem induzir lesões diretamente no DNA. Já os raios UVA são menos energéticos que os UVB, mas têm maior poder de penetração na pele (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

Assim, as radiações UVB e UVA diferem quanto aos seus sítios de ação na geração de lesões. Os danos causados pela radiação UVA estão mais associados à imunossupressão, ao envelhecimento da pele e a alterações no DNA pela produção de radicais livres. Por outro lado, a radiação UVB é responsável por produzir mutações diretas em genes supressores de tumores e oncogenes, como, por exemplo, a proteína p53 responsável pela reparação do DNA ou, em casos extremos, pela apoptose celular a fim de evitar que as mutações sejam transmitidas às células filhas (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). Tanto a radiação UVB quanto a UVA podem atuar como carcinógenos completos, atuando nos três estágios de formação do tumor (iniciação, promoção e progressão), no entanto, a radiação UVB é de 1000 a 10000 vezes mais carcinogênica (BACHELOR;

BOWDEN, 2004) e 1000 vezes mais efetiva na indução de queimaduras solares que a UVA (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

A exposição à radiação UVB causa, portanto, maior impacto biológico na pele que à UVA em doses similares. Por outro lado, a exposição diária da pele à radiação UVA é muito maior que à UVB, pois, embora uma quantidade substancial de radiação UVB alcance a superfície da Terra ao redor do meio-dia, a proporção UVA/UVB nestes horários é 10/1. Além disso, nos demais períodos do dia, a proporção de UVA é ainda maior, já que a radiação UVB, ao ter que passar por um caminho mais longo através da atmosfera, é fortemente absorvida, enquanto a UVA atravessa a atmosfera praticamente sem ser absorvida (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

Os danos diretos causados pela UVB no DNA geram ciclobutanodipirimidinas (CPDs) e (6-4) fotoprodutos, os quais induzem mutações nas células epidermais que levam ao desenvolvimento de células cancerosas (ICHIHASHI et al., 2003). Quando o dano causado ao DNA e/ou outros cromóforos é severo e irreparável, ocorre a formação de *sunburn cells* (SBC), o que assegura o descarte das células lesionadas. As SBC são queratinócitos apoptóticos que serão posteriormente eliminados por células fagocitárias do sistema imune de modo a evitar o aparecimento de um fenótipo canceroso. Apesar de ser um mecanismo de proteção, a formação de grande quantidade SBC pode, inevitavelmente, levar a perda da capacidade germinativa da camada basal e provocar o desequilíbrio da homeostasia na pele (VAN LAETHEM et al., 2005).

Afortunadamente, queratinócitos são mais resistentes aos efeitos danosos da radiação UVB que os fibroblastos e removem CPDs de maneira mais eficiente. Da mesma forma, o queratinócitos também são mais resistentes aos efeitos de agentes oxidantes que os fibroblastos, possuindo uma alta capacidade antioxidante e alta suscetibilidade à apoptose induzida por EROs (D'ERRICO et al., 2007). Assim, a capacidade antioxidante da epiderme humana é maior que a da derme, sendo considerada, portanto, a primeira linha de defesa da pele contra danos oxidativos causados por EROs (GODIC et al., 2014).

A energia proveniente da RUV é absorvida pelos cromóforos celulares (DNA, porfirinas, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos) e é convertida em energia química. Os cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs, dentre os quais destacam-se os radicais hidroxila

($\bullet\text{OH}$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (XU; FISHER, 2005).

Dentre as moléculas orgânicas, os lipídios são, provavelmente, as mais susceptíveis a serem atacadas pelas EROs (İNAL; KANBAK; SUNAL, 2001), pois as membranas biológicas contêm consideráveis quantidades de lipídios altamente insaturados e são banhadas por fluidos ricos em oxigênio e metal (CATALÁ, 2010).

A peroxidação lipídica pode conduzir a uma desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios que atuam sinergicamente com o aumento das atividades da fosfolipase A2 (PLA2) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) induzidas pela radiação UV, resultando em níveis maiores de produção de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E2 (PGE2), responsáveis pela inflamação epitelial. A primeira resposta observada na pele após exposição ao sol é, portanto, a inflamação, caracterizada por eritema, edema e calor, e pela elevação dos níveis de prostanóides (HRUZA; PENTLAND, 1993; KANG-ROTONDO et al., 1993; WILGUS et al., 2003). As funções presumíveis do processo inflamatório instalado na pele após a exposição à RUV são de remover e reparar os tecidos e células danificadas (RIJKEN et al., 2006).

O processo inflamatório promove a liberação de fatores de crescimento, de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos. As citocinas liberadas pela exposição à radiação UV atuam sobre as células da epiderme e os leucócitos infiltrados, estimulando a sinalização intracelular e alterando a expressão gênica. Por exemplo, a interleucina-1 (IL-1), liberada de células epidermais expostas à RUV e de células inflamatórias, pode prontamente induzir o passo de sinalização intracelular de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (JANSSENS; BEYAERT, 2003). As MAPK compreendem um grande número de proteínas serina/treonina quinases envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, como proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

A ativação de subfamílias multi-membros das MAPK, como a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38, 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 um complexo denominado fator de transcrição proteína ativadora AP-1. (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; XU; FISHER, 2005).

A atividade aumentada de AP-1 leva à indução de membros chave da família das metaloproteinases da matriz (MMP), uma família de zinco endopeptidases capaz de degradar estruturas protéicas como o colágeno, elastina e outras proteínas presentes na matriz extracelular da pele (LAHMANN et al., 2007; VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Sob condições fisiológicas normais, as MMPs ativadas são controladas por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP) e são geralmente expressas em baixos níveis. No entanto, os níveis de algumas destas MMPs podem ser elevados rapidamente quando o tecido é submetido à radiação UV (FISHER et al., 1996, 1997), durante a inflamação, a cicatrização de feridas e câncer no estágio de progressão (STERNLICHT; WERB, 2001; ZUCKER et al., 2003).

A ativação enzimática pode ser um reflexo da geração de EROs, porque oxidantes são potentes ativadores de MMPs. Este episódio talvez seja a maior causa dos danos observados no fotoenvelhecimento. Sugere-se que a MMP-8 e a MMP-13 pouco contribuem para os danos estruturais do fotoenvelhecimento (BRENNAN et al., 2003), enquanto que a MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial), que degrada fibras de colágeno tipo I e III, a MMP-3 (estromelisin-1) que degrada colágeno tipo IV e a MMP-9 (gelatinase-B) que degrada fragmentos de colágeno gerados pela MMP-1, juntas, têm a capacidade de degradar a maior parte das proteínas estruturais que compõem o tecido conectivo dérmico (FISHER et al., 2001; XU; FISHER, 2005). As MMPs ativadas são controladas pelos TIMPs que são capazes de interagir com as MMPs solúveis formando complexos TIMP-MMP que se tornam incapazes de ligar-se ao substrato. Os TIMPs são regulados por citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) e fatores de crescimento semelhantes aos que controlam a expressão das MMPs (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; DASU et al., 2003; SUN, 2010). Embora a RUV promova um aumento de TIMP-1 na pele, a indução de MMPs excede a de TIMPs promovendo a degradação da matriz extracelular (XU; FISHER, 2005).

Além de ser a principal sinalizadora da expressão de MMPs em queratinócitos e fibroblastos, induzindo a transcrição das mesmas, a AP-1 também tem demonstrado inibir a expressão gênica de pró-colágeno tipo I, pela ligação direta em sítios de regulação negativa de promotores de genes de colágeno (KIM et al., 2005; XU; FISHER, 2005).

A exposição à RUV também causa uma alteração no perfil de secreção das isoformas do fator de crescimento transformador β (TGF- β). As formas TGF- β 1 e

TGF- β 2 estimulam a síntese de colágeno e proteoglicanas e previnem sua quebra, enquanto que a forma TGF- β 3 reduz a deposição de tecido conectivo. A pele humana protegida da RUV expressa níveis de TGF- β 1, β 2 e β 3 na razão de 1:5:3. Após a exposição solar, os níveis de TGF- β 1 e β 3 aumentam, enquanto que os níveis TGF- β 2 diminuem expressivamente. A diminuição do TGF- β 2 concomitante ao aumento do TGF- β 3 promovem uma modulação negativa da expressão de colágeno tipos I e III observada após a exposição solar, resultando em um acúmulo de material amorfo elástico, condição esta denominada elastose (FISHER et al., 2001; GAUGLITZ et al., 2011; LAHMANN et al., 2007).

A inflamação da pele causada pela RUV causa a migração de leucócito para o tecido lesado. Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) infiltrados, principalmente neutrófilos, possuem grânulos ricos em mieloperoxidase (MPO), collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-9 e MMP-2) e elastases. A MPO é uma enzima H_2O_2 oxidorreductase que contribui para a atividade bactericida dessas células. Durante a ação dos neutrófilos no organismo, elétrons são transferidos do oxigênio pela enzima NADPH oxidase para o fagossomo ou para o meio extracelular gerando $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , que atuam como desencadeantes da formação de outros radicais mais potentes. Na presença de H_2O_2 e de um haleto (cloreto, brometo, tiocianato), a MPO catalisa a formação de poderosos intermediários reativos, como os ácidos hipocloroso, bromoso, hipotiocianoso, radical tirosil e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), efetivos contra micro-organismos e células tumorais. Os produtos da MPO também estão envolvidos na iniciação da peroxidação lipídica (ARNHOLD, 2004; JAIN et al., 2014; KUMAR; SHARMA, 2010; PULLI et al., 2013; TRUSH; EGNER; KENSLER, 1994).

Para proteger a pele dos efeitos causados pela radiação UV, numerosos mecanismos de defesa antioxidante evoluíram para limitar os níveis intracelulares de radicais livres e impedir a indução de danos (HENSLEY et al., 2000). Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como a glutathione (GSH), ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e ácido retinóico, agem *in vivo* por inibição da geração de EROs, ou diretamente pelo sequestro de radicais livres. Os níveis endógenos de antioxidantes podem ser regulados pelo aumento da expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). SOD removem $O_2^{\cdot -}$ acelerando sua conversão a H_2O_2 .

CAT convertem H_2O_2 em água e O_2 . No entanto, as enzimas mais importantes na remoção de H_2O_2 das células humanas são as GPx (ARUOMA, 2003).

Sob tensão normal de oxigênio, esses mecanismos de defesa antioxidante são suficientes para manter a homeostasia, removendo os radicais livres produzidos. Contudo, em condições pró-oxidantes, como a exposição prolongada à RUV, a concentração de radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (SIERENS et al., 2001). Baixas concentrações de EROs no organismo são indispensáveis nos processos de sinalização celular e na defesa contra micro-organismos. Porém, a presença em altas concentrações e/ou a remoção inadequada dessas EROs podem levar à disfunções metabólicas e danos às macromoléculas biológicas (SOHAL; ORR, 2012). A exposição à radiação UV causa depleção dos sistemas antioxidantes endógenos e faz com que os efeitos deletérios não sejam completamente prevenidos, o que resulta em danos oxidativos aos componentes celulares. O monitoramento dos níveis de antioxidantes endógenos pode, portanto, ser utilizado como um índice precoce do estresse oxidativo na pele e a sua proteção pode ser uma estratégia na prevenção de danos (CASAGRANDE et al., 2006; DINKOVA-KOSTOVA, 2008; MASELLA et al., 2005).

1.4. O extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. como fotoquimiopreventivo

A busca por novos compostos com potencial para prevenir o estresse oxidativo têm atraído grande interesse. As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes que podem combater os danos causados pelas EROs na pele, dentre as quais destacam-se os compostos fenólicos (MUKHERJEE et al., 2011). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e à estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os compostos intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo. Estima-se que o país concentra mais de 40.000 espécies de plantas, o que representa 20% da flora

mundial. Porém, esta riqueza vegetal não é totalmente conhecida nem aproveitada de maneira adequada devido a sua complexidade. Uma vez que as vias metabólicas secundárias dos vegetais são excelente fonte de matérias-primas na busca de novas drogas, o Brasil possui um patrimônio genético de valor econômico e estratégico inestimáveis, no entanto, as constantes transformações sofridas pelos ecossistemas brasileiros desde a chegada dos colonizadores portugueses causaram a perda de muitas espécies nativas e de conhecimentos sobre seus usos na medicina popular. Além disso, a intensa miscigenação de culturas ao longo dos séculos popularizou o uso medicinal de espécies vegetais exóticas e importadas (OLIVEIRA et al., 2012). Um levantamento realizado em 2003 constatou que 80% das plantas utilizadas no Brasil eram nativas de outros continentes (BRANDÃO et al., 2008).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, abrigando uma grande diversidade de espécies animais e vegetais (SIMON et al., 2009). Myers e colaboradores (2000) estimaram que das 10.000 espécies vegetais encontradas no Cerrado, 44% eram endêmicas, o que corresponde a, aproximadamente, 1,5% das espécies endêmicas do planeta. Apesar de sua grande importância, a expansão de pastagens e lavouras comerciais tem causado elevadas taxas de desmatamento deste bioma. Desta forma, a conservação da diversidade genética do Cerrado e estudos de sua flora são de fundamental importância.

As plantas do gênero *Lychnophora* sp. são endêmicas do Cerrado e destacam-se por estarem entre as plantas mais utilizadas na medicina popular brasileira no tratamento de contusões, dores e reumatismo, sendo comumente denominadas “arnica brasileira” ou “falsa arnica”, devido aos seus efeitos farmacológicos. A colheita indiscriminada destas espécies tem causado a diminuição populacional e aumentado o risco de extinção (BRANDÃO et al., 2008; FERRAZ FILHA et al., 2006; KELES et al., 2010; VIEIRA, 2002).

A espécie vegetal *Lychnophora salicifolia* Mart. (Vernonieae, Asteraceae) (figura 5), conhecida popularmente como “arnicão” (RUBIO et al., 2012), apresenta-se como arvoreta ou arbusto candelabroforme, crescendo em declives de rochas de arenito e quartzito, sobre o campo rupestre aberto. É encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás (COILE; JONES, 1981). Estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie tem sido estimulados devido aos seus usos etnofarmacológicos como anti-inflamatório e analgésico tópico. O perfil fitoquímico da espécie *L. salicifolia* foi amplamente estudado com a identificação de vários

metabólitos secundários (RUBIO et al., 2012). Entre seus compostos já identificados estão a vicenina-2 (apigenina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo) e o ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico).

Figura 5. A espécie *Lychnophora salicifolia* em seu habitat natural. (fotos: Norberto Peporine Lopes e Leonardo Gobbo-Neto)

Estudos conduzidos por Gobbo-Neto e colaboradores (2005) comprovaram as atividades antioxidante e anti-inflamatória do composto vicenina-2, no entanto, os autores não atribuem o efeito anti-inflamatório em edema de pata em ratos induzido por carragenana à atividade antioxidante do composto. Por outro lado, o efeito da vicenina-2 foi similar ao efeito do anti-inflamatório indometacina, desta forma, os autores sugerem que a atividade anti-inflamatória do composto estudado está relacionada à inibição da síntese das COX-1 e COX-2, inibindo assim a síntese de prostaglandinas pela quebra do ácido aracdônico.

Marrassini e colaboradores (2011) demonstraram *in vitro* que a vicenina-2 foi capaz de diminuir os níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α) em macrófagos ativados com lipopolissacarídeos (LPS) de forma inversamente proporcional à concentração, baixas concentrações do composto (0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 μ g/mL)

diminuíram significativamente os níveis de TNF- α , enquanto que concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ aumentaram de 62 a 100% os níveis desta citocina em comparação ao grupo tratado com LPS. Da mesma forma, o composto estudado também reduziu a liberação de óxido nítrico (NO), sendo que as concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ reduziram as concentrações de NO a níveis basais, enquanto que as concentrações mais altas tiveram pouco ou nenhum efeito. Os autores também observaram que a vicenina-2 (100 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir a translocação nuclear de NF-kB (ativador da AP-1). Como TNF- α e NF-kB são alvos para novos tratamentos de processos inflamatórios crônicos, os autores sugerem a eficácia da vicenina-2 como um novo agente anti-inflamatório.

A atividade anticarcinogênica da vicenina-2 também foi comprovada por Nagaprashantha e colaboradores (2011). Neste estudo, os autores demonstraram *in vitro* e *in vivo* que o tratamento com o composto foi efetivo em inibir a proliferação e a migração de carcinoma de próstata andrógeno dependente e independente.

Diversos trabalhos na literatura destacam as propriedades antioxidantes do ácido clorogênico (MARINOVA; TONEVA; YANISHLIEVA, 2009; SATO et al., 2011; XU; HU; LIU, 2012), alguns deles já confirmaram sua atividade contra os danos produzidos pela radiação ultravioleta. Cha e colaboradores (2014) observaram que o pré-tratamento de queratinócitos (linhagem HaCat) com ácido clorogênico protegeu o DNA das células dos danos causados pela UVB, aumentou a viabilidade celular, e diminui os corpos apoptóticos. Kitagawa e colaboradores (2011) demonstraram que a aplicação de microemulsão o/a contendo ácido clorogênico em cobaias preveniu a formação de eritemas pela radiação UVB. Bhattacharyya e colaboradores (2014) demonstraram que o pré-tratamento de ratos com formulações contendo complexos de ácido clorogênico com fosfolípidios evitou a depleção das enzimas antioxidantes GPx, SOD e CAT, e reduziu os níveis de peroxidação lipídica causados pela radiação UVA.

Considerando tais informações, a utilização do extrato de *Lychnophora salicifolia* como fotoquimiopreventivo em formulações tópicas pode ser considerada promissora, uma vez que as atividades antioxidante e anti-inflamatória de seus compostos isolados podem atuar prevenindo os danos causados pela RUV na pele.

Estudos que conduzam a um maior conhecimento do potencial terapêutico e tóxico e que comprovem a segurança e eficácia de espécies vegetais da biodiversidade brasileira, tem despertado muito interesse, já que estas espécies são

utilizadas pela população de maneira empírica. Além disso, a busca por substâncias antioxidantes que tenham efeito fotoquimiopreventivo pode ser de grande utilidade na prevenção de câncer de pele e do fotoenvelhecimento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial fotoquimiopreventivo do extrato hidroetanólico das folhas da espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. e do ácido clorogênico livres e incorporados em lipossomas por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o potencial antioxidante do extrato empregando diferentes métodos de formação de radicais livres *in vitro*.
- Determinar a fotoestabilidade e a fototoxicidade do extrato *in vitro*.
- Determinar a citotoxicidade do extrato e do ácido clorogênico.
- Avaliar o potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células.
- Preparar formulações de uso tópico contendo o extrato e o ácido clorogênico e avaliar sua estabilidade preliminar.
- Determinar o perfil de liberação das formulações utilizando células de difusão de Franz e membrana sintética.
- Avaliar a penetração dos compostos *in vitro* utilizando células de difusão de Franz e epiderme humana.
- Investigar a distribuição dos compostos do extrato e do ácido clorogênico nas diferentes camadas da pele humana *ex vivo*.
- Avaliar a penetração dos componentes do extrato e do composto isolado na pele de camundongos sem pelos.
- Investigar a eficácia fotoquimiopreventiva do extrato e do ácido clorogênico *in vivo*.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção do extrato vegetal e dos compostos isolados

O extrato de *Lychnophora salicifolia* Mart. e a vicenina-2 isolada do extrato (99% pura) foram, gentilmente, fornecidos pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

As folhas de *Lychnophora salicifolia* foram coletadas em Piatã, Bahia (S13°06'11.3" W41°51'20.3") e identificadas pelo Prof. Dr. João Semir do departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (Unicamp). A planta foi depositada no herbário desta unidade sob o código de identificação NPL 327. O material vegetal coletado foi seco em estufa ventilada a 40°C por 48h e, em seguida, pulverizado em moinho de facas. O pó obtido foi extraído exaustivamente com etanol 50%. O extrato etanólico seco foi ressuspendido em metanol 90% e, então, particionado com hexano para retirada do material mais apolar. A fração Metanol:Água foi, então, seca até a completa eliminação do solvente.

O ácido clorogênico padrão foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA) (pureza $\geq 95\%$). Este composto foi utilizado como controle dos experimentos por ser um dos compostos majoritários do extrato utilizado e pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já bem descritas na literatura.

3.2. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante *in vitro* foi avaliado por métodos que simulam a formação de radicais livres. A atividade antioxidante é expressa pela porcentagem de inibição em função da concentração da amostra no meio reacional. Assim, o valor de IC₅₀ é a concentração de amostra que causa 50% de inibição do sistema e, portanto, quanto menor o valor de IC₅₀, maior a atividade antioxidante. A porcentagem de inibição foi determinada pela equação: % inibição = 100 – [(Resposta da amostra/Resposta do grupo controle) x 100] (FONSECA et al., 2010).

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

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pela diminuição da absorbância da solução alcoólica do radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) utilizando o método descrito por Blois (1958). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1mL de tampão acetato de sódio (0,1M) pH 5,5, 1mL de etanol, 50µL de amostra (extrato [3,0 a 0,5mg/mL] e ácido clorogênico [2,5 a 0,08mg/mL]) e 500µL de solução alcoólica de DPPH[•] (200µM).

Depois de 15 minutos, a leitura foi realizada a 517nm em espectrofotômetro (Hitachi U2001). O controle corresponde à absorbância máxima (100%).

3.2.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/xantina-oxidase (XOD)/luminol

A medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol foi realizada pelo método descrito por Girotti e colaboradores (2000). Em tubos de ensaio apropriados para o equipamento foram adicionados 400µL de solução de EDTA (1mM) em tampão glicina (0,1M) pH 9,4, 150µL de xantina (6mM), 10µL de amostra (extrato [500 a 25µg/mL]) e 10µL da solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 100µL de solução recém preparada de XOD (20mU/mL). A medida da quimioluminescência foi realizada em luminômetro (Autolumat LB953) durante 5 minutos a 25°C. A porcentagem de inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida da área sob a curva (ASC) do gráfico de fótons (y) por minutos (x).

3.2.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A medida da inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. O MDA é um aldeído que reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Em 1mL de meio reacional contendo KCl (130mM) e Tris-HCl (10mM) pH 7,4, foram adicionados 10µL de citrato de sódio (200mM), 10µL de amostra (extrato [5,0 a 2,0mg/mL]), suspensão de mitocôndria

(1mg de proteína) e 10 μ L de sulfato ferroso amoniacal (50mM). Em seguida, incubou-se a 37°C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1mL de TBA (1%) preparado em NaOH (50mM), 100 μ L de NaOH (10M) e 500 μ L de H₃PO₄ (20%) foram adicionados, seguido por incubação de 20 minutos a 85°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol e a leitura da absorbância foi realizada a 535nm em espectrofotômetro (BUEGE; AUST, 1978). As mitocôndrias utilizadas foram, gentilmente, cedidas pelo Laboratório de Bioquímica da FCFRP – USP coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Curti.

3.3. Determinação da fotoestabilidade do extrato

O extrato foi exposto às mesmas doses de radiação utilizadas nos estudos de eficácia *in vitro* e *in vivo* (20J/cm² de radiação UVA ou 2,87J/cm² de radiação UVB) e em seguida foram diluídos em metanol/água 50% (v/v) a uma concentração de 500 μ g/mL e analisados por espectrofotômetro e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VILELA et al., 2012). Os perfis espectrofotométricos e cromatográficos do extrato irradiado e não irradiado foram comparados.

3.4. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A metodologia utilizada nas análises por CLAE foi previamente desenvolvida e validada por Rubio e colaboradores (2012). As análises foram realizadas no equipamento CLAE-DAD Shimadzu LC-6AD, equipado com detector SPD-M10Avp e injetor automático Sil-10AF controlado pelo software CLASS-VP 6.14. A separação cromatográfica foi realizada por gradiente de eluição com fluxo de 1mL/min em coluna BDS Hypersyl C18 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4,6 mm) (ThermoScientific, Alemanha) acoplada com uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (99:1, solvente A) e metanol:ácido acético (99:1, solvente B) com o gradiente: 0 min, 15% B; 20 min, 25% B; 30 min, 30% B; 35 min, 35% B; 80 min, 55% B; 100 min, 65%B; 110 min, 70% B; 120 min, 80% B; 125 min, 100% B; e 130 min, 100% B. Todos os solventes utilizados foram grau CLAE/UV (JT Baker, EUA). O ácido clorogênico e a vicenina-2 foram detectados a 300nm.

A metodologia analítica foi validada de acordo com o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003

(BRASIL, 2003). Os parâmetros analisados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade.

3.5. Avaliação da citotoxicidade e da fototoxicidade em cultura de células

3.5.1. Linhagem celular e cultivo

As células da linhagem L929 (fibroblastos de camundongo), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), penicilina (100U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL) e anfotericina B (0,25µg/mL)(meio de crescimento); e incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.5.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro

O ensaio de viabilidade pelo método do vermelho neutro é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis não injuriadas (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). As células da linhagem L929 foram semeadas, 24 horas antes do tratamento, em placas de 96 poços a uma confluência de $0,5 \times 10^5$ células/poço em meio de crescimento e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O tratamento foi realizado com diferentes concentrações de extrato (0,98 a 500µg/mL), de ácido clorogênico (0,01 a 5000µg/mL) e de vicenina-2 (0,015 a 2000µg/mL) em meio não suplementado com SBF (meio de tratamento) e as células foram novamente incubadas. Após 24 horas, foram adicionados 200µL do corante vermelho neutro (50µg/mL) em cada poço e a placa foi incubada na estufa por 3 horas. Após este período, o meio foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% e CaCl₂ 1%. Em seguida, foram adicionados 200µL de etanol com 1% de ácido acético para extrair o corante. A leitura foi realizada após 15 minutos de agitação a 540nm.

3.5.3. Determinação da fototoxicidade do extrato

O teste de fototoxicidade foi realizado de acordo com o protocolo INVITTOX nº 78 (DB-ALM, 2008). Para cada experimento, as células da linhagem L929 foram

semeadas em duas placas conforme descrito no item 3.5.2. Vinte e quatro horas depois, o tratamento foi realizado igualmente nas duas placas com várias concentrações de extrato em meio de tratamento (1,9 a 250 µg/mL). Após uma hora, uma das placas foi mantida no escuro enquanto a outra foi exposta à radiação UVA (5, 10 e 20 J/cm²) ou UVB (0,1 J/cm²). As placas foram então lavadas e incubadas por 24 horas com meio de tratamento e, após esse período, foram submetidas ao ensaio do vermelho neutro conforme descrito no item 3.5.2. Os resultados foram avaliados utilizando o software Phototox Versão 2.0. A figura 6 representa um esquema do protocolo realizado.

Figura 6. Esquema do protocolo utilizado para a determinação da fototoxicidade.

3.6. Avaliação do potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células

3.6.1. Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular por medida fluorimétrica

As células da linhagem L929 foram semeadas conforme descrito no item 3.5.2. Após 24 horas, o meio foi eliminado e foram adicionados, em cada poço, 100µL de uma solução de Diacetato de 2', 7'- Diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (5µM). Trinta minutos depois, a solução foi descartada e foram adicionadas as amostras de extrato (2,0; 10,0; 20,0 e 40,0µg/mL) e ácido clorogênico (0,25; 0,50; 1,0 e 2,0µg/mL) em solução tampão fosfato (PBS) ou somente PBS nos poços de controle. Após 30 minutos, foram adicionados 20µL de H₂O₂ (100mM) em cada poço, excluindo os controles negativos, ou a placa foi submetida a 20J/cm² de radiação UVA. Uma hora depois, as placas foram lidas em fluorímetro em excitação de 488nm e emissão de 525nm (WANG; JOSEPH, 1999).

3.6.2. Avaliação da atividade antioxidante por quantificação de GSH

As células L929 foram cultivadas em placas de 6 poços a confluência de 8 x 10⁵ células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Vinte e quatro horas depois, foi realizado o tratamento com o extrato (20,0 e 40,0µg/mL) ou com o ácido clorogênico (5,0 e 10,0µg/mL) em solução de Hank. Uma hora após o tratamento, as células foram expostas, ou não, a 20J/cm² de radiação UVA. Após a irradiação, a solução de Hank foi substituída por meio de crescimento e as células foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram recolhidas das placas e lisadas em 200µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo EDTA (1mM), PMSF (1mM), pepstatina (1µg/mL), leupeptina (1µg/mL) e 0,25% de Nonidet[®] P-40. Em seguida, 100µL da fração sobrenadante foram adicionados a 1mL de NaH₂PO₄ (0,1M, pH 8,0), contendo EGTA (5mM), e 100µL de o-ftalaldeído (OPT) (1mg/mL em metanol). A fluorescência foi determinada após 15 minutos em 350 e 420nm, para excitação e emissão, respectivamente (HISSIN; HILF, 1976). Para determinação dos níveis de GSH nas amostras, foi utilizada a equação de regressão linear da curva analítica de µM de

GSH padrão (Sigma-Aldrich, EUA) por unidades de fluorescência. Os resultados foram expressos em μM de GSH por mg de proteína. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.6.3. Liberação de lactato desidrogenase (LDH)

As células foram cultivadas e tratadas conforme descrito no item 3.6.2. Após 24 horas da exposição à radiação, foram coletados 100 μL do meio aos quais, no momento da reação, foram adicionados 50 μL de piruvato sódico (4,8mM) e 50 μL de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) (1,44mM), diluídos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4). A diminuição da fluorescência, correspondente à reação da oxidação da NADH, foi medida durante 3 minutos a 37°C em fluorímetro de placa, com excitação de 488nm e emissão de 525nm.

3.7. Preparação e avaliação de formulações para uso tópico

3.7.1. Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Ácido clorogênico ou extrato de *L. salicifolia* foram solubilizados em metanol e acrescentados à mistura de fosfatidilcolina (Phospholipon® 90G, Lipoid, Alemanha) e tween 20 (4:1 p/p) em um balão de fundo redondo que foi levado à rotaevaporação. A proporção de ativo:fosfatidilcolina foi de 1:5. O filme lipídico foi hidratado com um volume apropriado de tampão McIlvaine (pH 5,0). Da mesma forma, também foram preparados lipossomas sem os princípios ativos. Após a completa hidratação do filme e formação dos lipossomas, a dispersão de vesículas foi colocada em um sonificador de haste por 3 ciclos de 1 minutos, até que a dispersão estivesse completamente límpida. Finalmente, a dispersão foi filtrada em filtros de 0,45 μm (AGRAWAL; KAUR, 2010; FANG et al., 2006; MOURTAS et al., 2008a).

3.7.2. Caracterização dos lipossomas

A caracterização dos lipossomas foi feita pela distribuição do tamanho de partículas, índice de polidispersividade (Pdl) e determinação do potencial zeta

utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Reino Unido). As imagens dos lipossomas foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com criofixação das amostras (Cryo-SEM) (microscópio modelo JSM 5410, Jeol, EUA). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada pela centrifugação das dispersões lipossomais em filtros Amicon® 50k (Millipore, EUA) que permitiram a separação de ativos não encapsulados (filtrado) dos encapsulados (retido no filtro). O filtrado foi analisado por CLAE e a EE foi determinada pela equação: $EE = [(quantidade\ de\ ativo\ utilizado - quantidade\ de\ ativo\ livre) / quantidade\ de\ ativo\ utilizado] \times 100$.

3.7.3. Avaliação da estabilidade física e química dos lipossomas

Para avaliação da estabilidade, as dispersões de lipossomas foram armazenadas às temperaturas de 4, 40 e -20°C por 7 meses, sendo avaliadas todos os dias durante os 15 primeiros dias (BRASIL, 2004) e, em seguida, com intervalos de 15 ou 30 dias quanto aos seguintes parâmetros: distribuição do tamanho de partículas e peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação do malondialdeído (MDA) e seus precursores formados durante o armazenamento nas dispersões lipossomais da seguinte forma: 0,1mL da dispersão de lipossomas foram adicionados a 0,1mL de BHT (0,2% em etanol), 0,1mL de cloreto férrico hexahidratado em solução aquosa (2,7g/L), 1,5mL de tampão glicina/HCl (0,2M, pH 3,6) e 1,5mL de reagente TBA (5g/L de TBA e 3g/L de SDS em água). A mistura foi aquecida a 100°C por 15 minutos e resfriada em gelo. Em seguida, foram adicionados 1mL de ácido acético e 2mL de clorofórmio, e as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas para separar as fases. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 532nm (LANG; VIGO-PELFREY, 1993). Para a curva de calibração foi utilizado 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como padrão.

3.7.4. Preparação das formulações géis

Para preparação das formulações géis, hidroxietil-celulose (HEC) (Natrosol®, Ashland, EUA) foi adicionada ao tampão McIlvaine (pH 5,0) ou à dispersão de lipossomas contendo, ou não, os ativos sob constante agitação em um agitador

magnético. Como coadjuvantes, foram utilizados propilenoglicol (umectante) e uma solução de parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno) em fenoxietanol (Phenova[®], Croda, Reino Unido) como conservante. As formulações sem lipossomas foram adicionadas de 0,5% (p/p) de ácido clorogênico ou 2,5% (p/p) do extrato no tampão Mcllvaine (pH5,0), de forma que as concentrações dos ativos fossem as mesmas tanto nas formulações com lipossomas, quanto nas que continham os ativos não encapsulados. Também foram preparadas formulações com os ativos não encapsulados nas quais foi adicionado Tween 20 na mesma proporção presente na formulação com a dispersão de lipossomas equivalente. A tabela 1 detalha a composição das formulações e a quantidade de cada componente (em gramas) em 30g de formulação preparada.

Tabela 1. Composição dos géis preparados.

Componentes (g)	Formulações (30g)							
	Gel Placebo	Gel AC	Gel ELS	Gel AC+T	Gel ELS+T	Gel Lipo BCO	Gel Lipo AC	Gel Lipo ELS
Hidroxietil-celulose	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Propilenoglicol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Phenova [®]	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Tween 20	-	-	-	0,19	0,94	-	-	-
Ácido clorogênico	-	0,15	-	0,15	-	-	-	-
Extrato de <i>L. salicifolia</i>	-	-	0,75	-	0,75	-	-	-
Dispersão de lipossomas*	-	-	-	-	-	27,75	-	-
Dispersão de lipossomas com ácido clorogênico**	-	-	-	-	-	-	27,75	-
Dispersão de lipossomas com extrato***	-	-	-	-	-	-	-	27,75
Tampão Mcllvaine (pH 5,0)	27,75	27,6	27,0	27,41	26,06	-	-	-

* Fosfatidilcolina (0,75g) + Tween 20 (0,19g) + Tampão Mcllvaine (26,81g)

** Fosfatidilcolina (0,75g) + Tween 20 (0,19g) + AC (0,15g) + Tampão Mcllvaine (26,66g)

*** Fosfatidilcolina (3,75g) + Tween 20 (0,94g) + ELS (0,75g) + Tampão Mcllvaine (22,31g)

3.7.5. Avaliação do pH e do comportamento reológico das formulações

A avaliação do pH foi realizada pela medida direta do pH em peagômetro Digimed DM20, utilizando solução aquosa das amostras a 10% (DI MAMBRO; BORIN; FONSECA, 2003).

O ensaio para avaliar o comportamento reológico das formulações géis foi realizado a 25°C usando um reômetro tipo prato/prato (R/S Plus Brookfield, Co. Middleboro, EUA) com *spindle* P-25. Uma quantidade de amostra necessária para cobrir toda a superfície do sistema foi colocada sobre a placa. Os parâmetros foram estabelecidos pelo software RHEOCALC 2000. O gradiente de cisalhamento foi de 1 a 150rpm (curva ascendente) e 150 a 1rpm (curva descendente) por um tempo total de 300s. Os gráficos obtidos relacionam os valores de gradiente de cisalhamento (s^{-1}) no eixo das abscissas, com os valores de tensão de cisalhamento (Pa) no eixo das ordenadas. Os reogramas foram ajustados à equação de Ostwald's: $\tau = k\dot{\gamma}^n$ onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, e n é o índice de fluxo. A viscosidade aparente foi determinada na taxa de cisalhamento de $150s^{-1}$. O software RHEOCALC versão V 1.01 foi usado para obter os valores de viscosidade aparente, índice de fluxo e tixotropia (MARTINS et al., 2013).

3.7.6. Determinação do perfil de liberação dos ativos

Os estudos de liberação dos ativos das formulações géis foram realizados em células de difusão de Franz com $1,77\text{ cm}^2$ de área de difusão. O compartimento receptor foi preenchido com 12mL de PBS (pH 7,4). No compartimento doador foram colocados 0,5g de cada gel e separando os compartimentos foi colocada uma membrana de diálise (4 Spectra/Por® Dialysis membrane 12-14kD – Spectrum Laboratories, EUA). As células foram mantidas a 32°C com agitação mecânica constante durante todo o experimento (MELERO et al., 2008). As amostras foram coletadas do compartimento receptor a cada hora e analisadas por CLAE. A quantidade coletada foi repostada por PBS a cada coleta.

3.8. Estudos *in vitro* de permeabilidade em epiderme humana

Os estudos de permeabilidade foram realizados em células de difusão de Franz, conforme descrito no item anterior, sendo a membrana de diálise substituída por epiderme humana (MELERO et al., 2008). A epiderme foi obtida de peles sadias retiradas em cirurgias estéticas realizadas no Hospital 9 de Octubre (Valência, Espanha) com o consentimento prévio das voluntárias. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da *Universitat de València* (Procedimento nº H1426171308981). Após a remoção do excesso de tecido adiposo, as peles foram armazenadas a -20°C por, no máximo, seis meses, e descongeladas no momento do experimento. Para separar a epiderme por calor, a pele foi submersa em água a 60°C por 45 segundos e, então, o tecido foi separado cuidadosamente com a ajuda de pinças. A epiderme foi então colocada nas células de Franz com o estrato córneo voltado para a formulação gel no compartimento doador (0,5g). As amostras foram coletadas do compartimento receptor a cada duas horas e analisadas por CLAE. A quantidade de amostra recolhida foi reposta por PBS em cada coleta. O valor do fluxo (J) é igual à inclinação do perfil de permeação linear e foi calculado a partir da curva experimental.

3.9. Estudos de distribuição dos ativos em pele humana *ex vivo*

Os estudos de distribuição dos compostos ativos nas distintas camadas da pele foram realizados em pele humana utilizando o modelo de Saarbrücken com modificações (MELERO et al., 2009). Em pequenas câmaras circulares de alumínio de 18mm de diâmetro (Finn Chambers® on Scanpor, Smart Practice, EUA), foram depositados 0,1g de formulação gel. Estes dispositivos foram fixados sobre a pele previamente descongelada, a qual foi levada para incubação por 2 e 4 horas a 32°C (figura 7). Após a incubação, o excesso de formulação foi retirado com algodão e a pele foi submetida ao processo de *tape-stripping* utilizando 20 fitas adesivas. Uma vez eliminado o estrato córneo, a pele restante foi congelada a -80°C e seccionada em cortes de 40µm paralelos à superfície utilizando um micrótomo. Os compostos foram extraídos das fitas e dos cortes com metanol/água 70% (v/v) e, posteriormente, analisados por CLAE. Um estudo de recuperação foi realizado

através da extração de todos os componentes do experimento, incluindo a câmara de alumínio, o algodão e os restos de pele.

Figura 7. Representação esquemática do modelo de aplicação das formulações sobre a pele humana ex vivo.

3.10. Estudos de *tape-stripping* diferencial

Os estudos de *tape-stripping* diferencial foram realizados em pele de orelhas de porco obtidas do biotério do Centro de Suporte à Pesquisa da *Universitat de València*. No momento da utilização, os pelos foram cuidadosamente cortados para não danificar a superfície da pele, e foi delimitada uma circunferência de 8mm de diâmetro. Cinquenta miligramas de formulação gel foram aplicadas na área delimitada seguido por uma massagem de 2 minutos com o dedo indicador. As peles foram incubadas a 32°C por 2, 4 e 6 horas. Após o período de incubação, o excesso de formulação foi removido com algodão e foi realizada a técnica de *tape-stripping* com 20 fitas adesivas. Uma vez eliminado o estrato córneo, uma gota de cola de contato (Imedio, Espanha) foi colocada sobre a pele e, após sua polimerização, foi retirada com uma fita adesiva levando consigo um molde dos folículos pilosos (RABER et al., 2014). Os compostos foram extraídos das fitas com metanol/água 70% (v/v) e, posteriormente, analisados por CLAE. Um estudo de recuperação foi realizado através da extração de todos os componentes do experimento, incluindo a dedeira utilizada no processo de massagem, o algodão e os restos de pele.

3.11. Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos sem pelos, machos ou fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 30g, da linhagem HRS/J laboratório Jackson (Bar Harbor, EUA). Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25°C, com livre acesso a água e comida, 4 trocas de ar/hora e ciclos claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Biotério da FCFRP-USP, com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (Certificado 11.1.1575.53.0.).

3.11.1. Estudos de penetração cutânea *in vivo*

Em primeiro lugar, a recuperação do processo de extração dos componentes do extrato da pele foi avaliada pela adição de ácido clorogênico padrão. Para isto, amostras de pele retiradas do dorso de camundongos sem pelos, eutanasiados por overdose de dióxido de carbono (CO₂), foram submetidas ao procedimento de *tape stripping* com 10 fitas adesivas para extração do estrato córneo e, em seguida, receberam 180µg/mL de extrato enriquecido com 12,5µg/mL de ácido clorogênico padrão. Em seguida, foram picotadas e submetidas ao processo de extração com 5mL de metanol/água 70% (v/v) em banho de ultra-som por 20 minutos e agitação em vórtex por 1 minuto. O meio extrator foi, então, filtrado e analisado por CLAE. A porcentagem de recuperação foi calculada pela equação: $R\% = [(C_f - C_u)/C_s] \times 100$, onde C_f é a concentração dos compostos da solução do extrato adicionada dos padrões, C_u é a concentração dos compostos na solução do extrato e C_s é a concentração teórica dos padrões adicionados, conforme determinado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

Para realização dos estudos de penetração *in vivo*, 0,5g das formulações géis contendo extrato e ácido clorogênico encapsulados em lipossomas, ou não, foram aplicadas na pele do dorso de cada animal. Uma hora após a aplicação, os animais foram eutanasiados por overdose de CO₂ e a área da pele em que a formulação foi aplicada foi removida. Uma área da pele de 2,9cm² foi delimitada e submetida ao procedimento de *tape-stripping*. A pele foi, então, submetida aos mesmos processos de extração e análise descritos acima. Os sinais cromatográficos

do extraído de pele foram identificados através da comparação com os tempos de retenção dos padrões.

3.11.2. Avaliação da eficácia *in vivo* contra os danos induzidos pela RUV

Os animais foram irradiados em uma lâmpada ultravioleta fluorescente modelo Philips TL40W/12 RS (Medical, Holanda), instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para esse tipo de experimento (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática 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 podiam se movimentar livremente na caixa plástica ficando com o dorso diretamente exposto à RUV. A parte superior das caixas foi coberta com uma tela metálica para manter os animais dentro das mesmas durante as induções. Nestas condições a irradiância foi de $0,34\text{mW/cm}^2$, determinada por radiômetro IL 1700 (International Light, EUA), da qual aproximadamente 80% correspondem à radiação UVB. A dose de radiação utilizada ($2,87\text{J/cm}^2$) foi reportada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da FCFRP-USP por Casagrande e colaboradores (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) como sendo a dose capaz de induzir a depleção de GSH.

Os animais foram divididos em oito grupos de cinco animais da seguinte forma:

- animais não irradiados e não tratados (controle não irradiado - **CNI**);
- animais irradiados e não tratados (controle irradiado - **CI**);
- animais não irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas sem ativos (**NIP**);

- animais irradiados e tratados com a formulação contendo lipossomas sem ativos (**IP**);
- animais não irradiados e tratados com formulação contendo lipossomas com ácido clorogênico (**NIAC**);
- animais irradiados e tratados com formulação contendo lipossomas com ácido clorogênico (**IAC**);
- animais não irradiados e tratados com formulação contendo lipossomas com extrato (**NIE**);
- animais irradiados e tratados com formulação contendo lipossomas com extrato (**IE**).

O tratamento consistiu na aplicação de 0,5g de formulação gel no dorso de cada animal 1h antes do início da irradiação. Seis horas após a irradiação, os animais foram eutanasiados por inalação de CO₂. Amostras do tecido cutâneo do dorso dos animais foram coletadas, lavadas com NaCl 0,9%, e armazenadas a -80°C. A figura 9 representa um esquema dos estudos de eficácia *in vivo*.

Figura 9. Esquema dos estudos de eficácia *in vivo*.

3.11.2.1. Análise da atividade das metaloproteínases

As amostras de pele foram picotadas e diluídas 1:4 em tampão Tris/HCl (50mM) e CaCl_2 (10mM) pH 7,4 adicionado de 1% da mistura inibidora de proteinases (Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizadas com auxílio de um Ultra-Turrax[®] (modelo T25, IKA, Alemanha) a 21500rpm por 2 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada. Alíquotas de 50 μL das frações sobrenadantes foram adicionadas a 10 μL de tampão não redutor (Tris/HCl 0,1M, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,001%; pH 6,8). Após homogeneização, 10 μL das amostras foram aplicados em uma placa de gel de acrilamida contendo SDS e gelatina e foram submetidos à eletroforese, conforme o método descrito por Vicentini e colaboradores (2008).

Na montagem das placas de eletroforese, foram utilizados um gel de concentração (10%) e um gel de separação:

- Gel de separação – água (5,8mL), Tris/HCl (1,5M) com SDS (0,4%) pH 8,8 (11,25mL), Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 (5mL), Gelatina 100mg/mL (375 μL), Persulfato de amônio 10% (50 μL) e Temed (10 μL).
- Gel de concentração - água MiliQ (4,06 mL), Tris/HCl (0,5M) com SDS (0,4%) pH 6,8 (1,67mL), Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 (860 μL), Persulfato de amônio 10% (33 μL) e Temed (6,6 μL).

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

Ao término da eletroforese, o gel foi lavado por 1 hora com Triton X-100 2,0% sob agitação e, posteriormente, foi incubado por 12 horas a 37°C em tampão de reação constituído de 50mM Tris/HCl, pH 7,4, 10mM CaCl_2 e 0,02% de azida sódica (DEMACQ et al., 2008). Após este período, o gel foi colocado por 1 hora na solução de corante Coomassie Blue R 350 0,1% em ácido acético 20%. A atividade proteolítica foi observada após a descoloração do gel em solução de ácido acético 20% pela formação de bandas translúcidas relativas à degradação da gelatina pelas metaloproteinases.

3.11.2.2. Extração do colágeno das amostras de pele

A extração do colágeno solúvel em ácido das amostras de pele foi realizada utilizando ácido acético segundo descrito por Hema e colaboradores (2013). As peles foram picotadas, pesadas e deixadas por 24 horas, sob agitação magnética constante, em 30 volumes de NaOH (0,1N) para remover as proteínas não colagênicas. As amostras de pele foram, então, centrifugadas e lavadas por 2 vezes em água gelada. Em seguida, as peles foram processadas em Ultra-Turrax® a 2000rpm, por 2 minutos, com 30 volumes de ácido acético (0,5M). O homogeneizado foi deixado por 24 horas sob agitação magnética constante e então o sobrenadante foi recolhido por centrifugação e o resíduo foi novamente extraído com 30 volumes de ácido acético (0,5M) por 24 horas. O colágeno solúvel em ácido encontra-se nos sobrenadantes coletados. Às amostras coletadas foram adicionados 10% do volume de NaCl cristalino e mantidas por 24 horas sob agitação mecânica. Após este período, as amostras foram centrifugadas, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Tris/Glicina (50mM) com NaCl (0,2M) pH7,4 e submetido ao processo de diálise por 24 horas em tampão fosfato (0,02M, pH7,4). Todo o processo de extração foi realizado a 4°C. As amostras dialisadas foram congeladas e liofilizadas para obtenção do colágeno em pó.

O colágeno obtido e o padrão de colágeno solúvel em ácido (Sigma-Aldrich, EUA) foram submetidos ao processo de eletroforese para separação e identificação das bandas características do colágeno. Para isso, 1mg das amostras foi solubilizada em 1mL de solução de SDS (50g/L) e colocada em banho-maria a 85°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e 50µL do sobrenadante foram adicionados a 50µL de tampão não redutor (descrito no item 3.11.2.1). Os géis utilizados na eletroforese possuíam a seguinte composição:

- Gel de separação – água (6,175mL), Tris/HCl (1,5M) com SDS (0,4%) pH 8,8 (11,25mL), Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 (5mL), Persulfato de amônio 10% (50µL) e Temed (10µL).
- Gel de largada – água (4,06 mL), Tris/HCl (0,5M) com SDS (0,4%) pH 6,8 (1,67mL), Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 (860µL), Persulfato de amônio 10% (33µL) e Temed (6,6µL).

O tampão usado nas cubas foi Tris/glicina (25mM) pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi de 20mA. Ao término da

eletroforese, o gel foi fixado em uma solução de metanol (500mL/L) com ácido acético (100mL/L) por 30 minutos. Após este período, o gel foi incubado por 1 hora na solução de corante Coomassie Blue R 350 0,1% (50mL/L) em metanol (150mL/L) e ácido acético (50mL/L). Em seguida, o gel foi descolorido por 1 hora com uma solução de metanol (300mL/L) com ácido acético (100mL/L). As bandas reveladas foram comparadas ao marcador de massa molecular utilizado.

3.11.2.3. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

As amostras de pele coletadas do dorso dos animais foram armazenadas a -80°C em microtubos contendo tampão K_2HPO_4 (50mM) adicionado de brometo de hexadecil trimetil-amônio (HTAB) 0,5% (p/v), pH 6,0. Posteriormente, as amostras foram picotadas, diluídas a 50mg/mL utilizando o mesmo tampão, homogeneizadas em Ultra-Turrax® a 21500rpm por 2 minutos e, em seguida, centrifugadas. A fração sobrenadante foi coletada (60µL) e adicionadas a 200µL de tampão K_2HPO_4 (50 mM, pH 6,0) contendo 0,167mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de H_2O_2 . A leitura foi realizada após 15 minutos em 450nm utilizando espectrofotômetro de placas (BRADLEY et al., 1982). A atividade de MPO das amostras foi determinada através da curva analítica da enzima MPO padrão (Sigma-Aldrich, EUA). Os resultados foram expressos em unidade de MPO por miligrama de pele.

3.11.2.4. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

As amostras de pele foram picotadas e adicionadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo EDTA (1mM), PMSF (1mM), pepstatina (1µg/mL) e leupeptina (1µg/mL) na concentração de 50mg/mL, homogeneizadas em Ultra-Turrax® a 21500rpm por 2 minutos e, em seguida, centrifugadas. A quantificação do GSH foi realizada em 100µL da fração sobrenadante das amostras conforme descrito no item 3.6.2. Os resultados foram expressos em µM de GSH por mg de pele.

3.11.2.5. Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α

As amostras de pele foram processadas conforme descrito no item 3.11.2.4. A quantificação das citocinas no sobrenadante foi realizada por ensaio colorimétrico utilizando um kit comercial e seguindo as instruções do fabricante (Elisa Ready-SET-Go![®], eBioscience, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.12. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPadPrism[®] (versão 5.01, 2007). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ 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 Tukey ou Bonferroni.

4. *Resultados e Discussão*

4.1. O extrato de *Lychnophora salicifolia*

A escolha do extrato de *Lychnophora salicifolia* foi baseada em seus principais usos etnofarmacológicos: anti-inflamatório e analgésico. As folhas da espécie são utilizadas pela população em solução alcoólica, especialmente para uso tópico. Além disso, algumas substâncias identificadas do extrato, como o ácido clorogênico e a vicianina-2, apresentam propriedades antioxidante e anti-inflamatória comprovadas. Neste contexto, a utilização do extrato de *L. salicifolia* como fotoquimiopreventivo é bastante promissora.

O perfil fitoquímico do extrato das folhas de *L. salicifolia* utilizado neste estudo foi amplamente estudado e o método analítico foi validado por Rubio e colaboradores (2012). Desta forma, comparando os cromatogramas obtidos nos dois estudos, nas mesmas condições cromatográficas, podemos identificar alguns dos principais compostos do extrato pelo tempo de retenção (figura 10 e tabela 2).

Figura 10. Cromatograma obtido na análise por CLAE do extrato das folhas da espécie *L. salicifolia* em 300 nm e os respectivos sinais cromatográficos identificados.

Tabela 2. Identificação dos sinais cromatográficos.

Sinal cromatográfico	Composto	Tempo de retenção (min)	Área (%)
1	Ácido protocatecuico	10,072	1,36
2	Ácido 5-O-cafeoilquínico	18,303	11,64
3	Ácido 5-O-p-cumaroilquínico	27,677	4,25
4	Vicenina-2	35,776	19,73
5	Ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	50,062	15,31
6	Ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico	59,250	10,52
7	Ácido 3,5-di-O-p-cumaroilquínico	65,565	4,23
8	Ácido 4,5-di-O-p-cumaroilquínico	76,688	4,73

As substâncias identificadas no extrato pertencem ao grupo dos compostos fenólicos ou polifenóis. Os polifenóis são produtos do metabolismo secundários dos vegetais. Este grupo é composto por uma variedade de substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos e vão desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até moléculas altamente polimerizadas, como os taninos (BRAVO, 1998).

Os fenilpropanóides e seus derivados formam a maior classe de polifenóis produzidos através da via do ácido chiquímico (figura 11). Estes compostos são formados por ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que transforma a fenilalanina em ácido cinâmico, sendo este precursor da biossíntese de muitos outros compostos como, por exemplo, os flavonóides, as cumarinas e as lignanas (KORKINA et al., 2008).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos têm estrutura comum, C6–C1 como, por exemplo, os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico. Já os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3) como, por exemplo, os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico (tabela 3). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002).

Figura 11. Via do ácido chiquímico para a biossíntese dos principais compostos fenólicos derivados da fenilalanina. Reproduzido de <<http://www.oleos essenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>> Site visitado em: 03/03/2016.

Tabela 3. Estrutura química dos principais derivados dos ácidos benzóico e cinâmico.

Ácidos hidroxibenzoicos	Ácidos hidroxicinâmicos
R ₁ = OH Ácido Salicílico	R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ = H Ácido Cinâmico
R ₁ = R ₄ = OH Ácido Gentístico	R ₁ = OH Ácido o-cumárico
R ₃ = OH Ácido p-hidroxibenzoico	R ₂ = OH Ácido m-cumárico
R ₂ = R ₃ = OH Ácido Protocatecuico	R ₃ = OH Ácido p-cumárico
R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = OH Ácido Vanílico	R ₂ = R ₃ = OH Ácido Caféico
R ₂ = R ₃ = R ₄ = OH Ácido Gálico	R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = OH Ácido Ferúlico
R ₂ = R ₄ = OCH ₃ ; R ₃ = OH Ácido Siríngico	R ₂ = R ₄ = OCH ₃ ; R ₃ = OH Ácido Sinápico

Hidroxicinamatos são produtos intermediários na via sintética dos fenilpropanóides e podem ocorrer na forma livre, esterificados ou eterificados (SHAHIDI; CHANDRASEKARA, 2010). A esterificação do ácido quínico com os ácidos trans-cinâmicos (cinâmico, caféico, ferúlico e dimetoxicinâmico) dá origem à família dos ácidos clorogênicos, sendo que o ácido quínico pode ser esterificado em uma ou mais das suas hidroxilas gerando diferentes isômeros (CLIFFORD, 2000). As principais classes de ácidos clorogênicos encontrados na natureza são os ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, e, em menor proporção os ácidos feruloilquínicos, sendo que cada grupo possui pelo menos três isômeros (MARQUES; FARAH, 2009).

Entre os ácidos clorogênicos, o ácido 5-O-cafeoilquínico ocorre naturalmente em maior concentração, é o mais disponível comercialmente e, conseqüentemente, é o mais estudado quanto às suas atividades biológicas (BUENO et al., 2010; DAWIDOWICZ; TYPEK, 2011). Assim, o ácido 5-O-cafeoilquínico é comumente denominado ácido clorogênico. Este composto ocorre naturalmente em todas as plantas desempenhando um importante papel em sua resposta ao estresse. O ácido clorogênico em solução aquosa é sensível ao aquecimento e variações de pH. Durante seu aquecimento em solução aquosa, foram encontrados mais de nove compostos (derivados do ácido clorogênico e seus produtos de reação com a água) (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2010). A formação de cada componente depende do tempo de aquecimento, da temperatura, e do pH. Em uma solução aquosa alcalina, o ácido clorogênico pode sofrer isomerizações e transformações mesmo em temperatura ambiente. Em uma solução aquosa de pH = 8, aquecida por 5 horas, foram encontrados os seguintes compostos: ácido quínico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico e ácido caféico praticamente nas mesmas proporções, sugerindo que o aumento do pH e da temperatura aceleram a hidrólise do ácido clorogênico em ácido quínico e ácido caféico. A transformação do ácido quínico em ácido protocatecuico é mais pronunciado na faixa de pH entre 6 e 8, e é favorecida pelo tempo de aquecimento (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2011).

Além dos ácidos clorogênicos e do ácido protocatecuico, o composto identificado em maior concentração no extrato foi a vicenina-2. Este composto pertence ao grupo dos flavonóides, substâncias caracterizadas por uma estrutura C6-C3-C6 divididas nos seguintes sub-grupos: flavononas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas e flavanas, dependendo da oxidação do anel C3

(PETERSON; DWYER, 1998). Os flavonóides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e, assim como muitos outros polifenóis, são excelentes sequestradores de radicais livres porque são altamente reativos como doadores de hidrogênio ou elétrons (SEYOUM; ASRES; EL-FIKY, 2006). Podem ocorrer na formas livre (agliconas) ou conjugados com açúcares (glicosídeos), que podem estar na forma O-glicosilada (açúcares ligados a uma hidroxila da aglicona) ou C-glicosilada (açúcares ligados diretamente a um carbono da aglicona) (WARIDEL et al., 2001). A vicenina-2 é uma di-C-glicosilflavona, sendo a apigenina sua aglicona correspondente. As estruturas químicas dos principais compostos identificados no extrato estão representadas na tabela 4.

Tabela 4. Estrutura química dos compostos identificados no extrato.

Composto	Estrutura química
Ácido protocatecuico
Ácido 5-O-cafeoilquínico
Ácido 5-O-p-cumaroilquínico
Vicenina-2

Ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico

Ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico

Ácido 3,5-di-O-p-cumaroilquínico

Ácido 4,5-di-O-p-cumaroilquínico

A partir das curvas de calibração dos padrões, foi possível calcular o teor dos compostos ácido clorogênico e vicianina-2 no extrato. Em 200µg de extrato, foram encontrados 1,93µg do ácido clorogênico e 17,4µg de vicianina-2 que correspondem a 0,97 e 8,7% da massa de extrato.

4.2. Validação do método analítico

Para assegurar a confiabilidade dos resultados, o método analítico cromatográfico foi novamente validado seguindo o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003). Os seguintes parâmetros foram analisados: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade.

A linearidade é a capacidade da metodologia de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Neste estudo, para determinação da linearidade foram escolhidos os padrões ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico) e vicenina-2, no intervalo de 0,1 à 200µg/mL (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0µg/mL). As curvas de calibração e as respectivas equações da reta obtidas encontram-se na figura 12.

Figura 12. Curvas de calibração dos padrões ácido clorogênico e vicenina-2.

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os limites de detecção e quantificação dos padrões ácido clorogênico e vicenina-2 foram estimados pelas fórmulas: $LD = [(DP_a \times 3)/IC]$ e $LQ = [(DP_a \times 10)/IC]$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de 3 curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003). Os limites encontrados (tabela 5) estão de acordo com o necessário para a análise das amostras no decorrer do trabalho.

Tabela 5. Valores dos limites de detecção e quantificação obtidos para os padrões.

	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Ácido clorogênico	0,90	5,75
Vicenina-2	1,73	2,98

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas utilizando os padrões ácido clorogênico e vicenina-2 em três concentrações, uma baixa (10,0µg/mL), uma média (50,0µg/mL) e uma alta (100,0µg/mL).

A precisão do método foi calculada pela repetibilidade, definida como a precisão intracorridas, dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003). O coeficiente de variação (CV) foi obtido pela fórmula $[CV(\%) = (DP/CMD) \times 100]$, onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 6. O método pode ser considerado preciso, uma vez que os valores de CV estão abaixo de 5%, como preconizado pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

A exatidão do método é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente: $[Exatidão = (concentração\ média\ experimental / concentração\ teórica) \times 100]$ (BRASIL, 2003). Os resultados expressos na tabela 6 indicam a exatidão do método, uma vez que os valores encontrados para os padrões estão dentro do limite de $100 \pm 15\%$.

Tabela 6. Precisão e exatidão do método analítico. Valores do coeficiente de variação e exatidão obtidos para os padrões em concentrações baixa, média e alta.

Composto	Coeficiente de Variação (%)			Exatidão (%)		
	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Ácido clorogênico	0,07	0,15	0,14	91,3	101,7	101,1
Vicenina-2	1,51	0,63	0,77	104,5	101,6	101,3

A seletividade do método, ou seja, a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003), foi avaliada com relação às formulações e aos homogeneizados de pele. Em ambos os casos, não foram observados picos cromatográficos que coeluiram com os picos dos componentes do extrato, portanto, o método foi considerado seletivo.

Considerando os resultados dos ensaios de validação, o método analítico cromatográfico para quantificação do ácido clorogênico e da vicenina-2 apresentou linearidade, precisão, exatidão e seletividade, e, assim, mostrou ser adequado para realização das análises propostas neste trabalho.

Após conhecer os compostos do extrato e em posse de um método analítico adequado, seguiu-se a análise do potencial fotoquimiopreventivo do extrato em comparação ao ácido clorogênico isolado.

4.3. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

Nas últimas décadas, a fotoquimioprevenção vem sendo apreciada como uma maneira eficiente de reduzir a ocorrência de câncer de pele. O uso de agentes de origem vegetal, especialmente aqueles presentes em alimentos e bebidas, tem recebido considerável atenção (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). Pequenas moléculas encontradas nas plantas são excelentes candidatas para o desenvolvimento de protetores multifuncionais para aplicação na pele devido aos seus múltiplos efeitos que podem evitar os danos causados pela RUV, como absorção direta da RUV, inibição da inflamação crônica, modulação da imunossupressão, indução de apoptose, e efeito antioxidante direto (como o sequestro de espécies intermediárias de oxigênio e nitrogênio) e indireto (como a indução de citoprotetores intrínsecos que eliminam oxidantes e eletrófilos) (DINKOVA-KOSTOVA, 2008).

O desenvolvimento do câncer de pele envolve três estágios: iniciação, promoção e progressão, sendo que cada um deles é mediado por alterações celulares, bioquímicas e moleculares. De maneira geral, todo o processo de desenvolvimento de câncer de pele envolve: estimulação da síntese de DNA, danos e proliferação do DNA, inflamação, imunossupressão, hiperplasia da epiderme, desregulação do ciclo celular, depleção das defesas antioxidantes, danos na transdução das vias sinalizadoras, indução de ciclo-oxigenases, aumento da síntese de prostaglandinas e indução da ornitina descarboxilase (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). A geração de EROs causada pela exposição tanto à radiação UVA, como também à UVB, está direta ou indiretamente relacionada aos eventos envolvidos no desenvolvimento câncer de pele. As EROs causam danos permanentes ao DNA, aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores

de crescimento, ativam citocinas responsáveis pela imunossupressão e interferem na sinalização celular normal (CHEN; HU; WANG, 2012). Portanto, uma das grandes vantagens do uso de agentes fotoquimiopreventivos é que eles podem intervir em todos os estágios do processo fotocarcinogênico (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). Assim, substâncias naturais com potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico, anticancerígeno, propriedades imunomodulatórias, e que tem a habilidade de exercer um pronunciado efeito inibitório em diversos eventos celulares e moleculares, vem sendo intensamente investigadas e cada vez mais produtos com ingredientes naturais são colocados no mercado (AFAQ, 2011).

Considerando o papel das EROs no desenvolvimento de danos causados pela RUV, a determinação da atividade antioxidante é um importante passo no processo de avaliação do potencial fotoquimiopreventivo de um extrato vegetal. Assim, a atividade antioxidante do extrato de *L. salicifolia* foi avaliada por três métodos distintos: atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$, inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol, e inibição da peroxidação lipídica.

4.3.1. Medida da atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$

A solução alcoólica do radical DPPH $^{\bullet}$ apresenta absorbância máxima no comprimento de onda de 517nm, no entanto, na presença de moléculas doadoras de H^+ na solução, ocorre a redução do DPPH $^{\bullet}$ para DPPH – H diminuindo a absorbância (BLOIS, 1958). A variação da absorbância, proporcionada pelas amostras de extrato, de ácido clorogênico e do antioxidante sintético hidroxibutiltolueno (BHT), foi comparada à absorbância do controle (apenas DPPH $^{\bullet}$) que corresponde à absorbância máxima (100%).

Os valores de IC_{50} encontrados para o extrato de *L. salicifolia*, ácido clorogênico e BHT foram de 30,25 μ g/mL, 3,65 μ g/mL e 269,78 μ g/mL, respectivamente. Estes valores demonstram o potencial antioxidante que o extrato e uma de suas substâncias isoladas possuem frente ao BHT e a outros extratos vegetais como, por exemplo, o chá verde, reconhecido por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, que necessita de 2mg para reduzir 59,4% da absorbância do radical DPPH $^{\bullet}$ (YEN; CHEN, 1995). Chen e Ho (1997) encontraram resultados similares quando compararam o efeito doador de H^+ de vários ácidos

hidroxicinâmicos e seus derivados sobre o radical DPPH[•] com o efeito do antioxidante BHT.

A capacidade doadora de H⁺ dos polifenóis está correlacionada com o número e a posição dos grupos hidroxilas (OH) em suas estruturas químicas (SEYOUM; ASRES; EL-FIKY, 2006). O aumento do número de grupos OH na estrutura dos flavonóides pode estar relacionado com a habilidade de abstração de átomos H ou a capacidade de doação de elétrons, aumentando assim a capacidade de sequestro de radicais livres. Por outro lado, a glicosilação dos flavonóides leva, principalmente, a diminuição da atividade antioxidante (AMIC[•] et al., 2007). Assim, um glicosídeo da apigenina, como a vicianina-2, deve ter sua capacidade antioxidante reduzida em relação à aglicona. No caso dos ácidos hidroxicinâmicos, o grupo –CH=CH-COOH ligado ao anel fenólico pode estabilizar o radical por ressonância e, por esta razão, a sua habilidade doadora de H⁺ e consequente estabilização do radical é maior que a do grupo –CH₂-COOH dos ácidos hidroxibenzoicos, como, por exemplo, o ácido protocatecuico (CAI et al., 2006).

Embora o método do DPPH seja amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, o radical DPPH[•] é um radical sintético e estável, diferentemente dos radicais peróxila (LOO[•]) envolvidos na peroxidação lipídica que são altamente reativos, transitórios e estão presentes no organismo. Muitos antioxidantes que reagem rapidamente com LOO[•] podem reagir lentamente ou serem inertes com o DPPH[•] (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Os radicais LOO[•] e alcóxila (LO[•]), envolvidos na peroxidação lipídica, e o ânion superóxido (O₂^{•-}), radical que tem sua presença exacerbada relacionada a alguns tipos de câncer (PIETTA, 2000), são importantes EROs geradas no processo de estresse oxidativo. Assim, o extrato também foi avaliado quanto à capacidade de inibir a peroxidação lipídica e de sequestrar EROs geradas no sistema xantina/XOD/luminol.

4.3.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol

A reação da enzima XOD com a xantina ou hipoxantina é conhecida como um sistema de geração substancial de EROs (TATSUMI; TSUCHIYA; SAKAMOTO, 2014). Utilizando o sistema xantina/XOD/luminol é possível determinar a capacidade do extrato de sequestrar radicais superóxido. A oxidação do luminol, causada pelo

ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzido pela XOD, emite luz proporcionalmente à produção de ânions, desta forma, o sequestro de $O_2^{\cdot-}$ ou a inibição da enzima XOD podem promover a inibição de quimioluminescência (GIROTTI et al., 2000).

No organismo, o $O_2^{\cdot-}$ não é considerado um oxidante forte, no entanto, ele pode reagir com o óxido nítrico e produzir peroxinitrito, o qual é um potente oxidante capaz de atacar várias moléculas orgânicas e causar danos diretos às células (NIMSE; PAL, 2015). Além disso, em condição de estresse oxidativo, o $O_2^{\cdot-}$ pode favorecer a produção do radical hidroxila ($\cdot OH$) a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $\cdot OH$ é altamente reativo e, quando produzido próximo ao DNA, pode reagir com todos os componentes que fazem parte da sua estrutura causando danos à molécula (VALKO et al., 2006). As radiações UVA e UVB também são potentes indutores de EROs (ICHIHASHI et al., 2003), portanto, a capacidade de eliminar $O_2^{\cdot-}$ é uma característica desejável em substâncias candidatas a fotoquimiopreventivos.

O extrato foi capaz de inibir a quimioluminescência de forma dose-dependente. O valor de IC_{50} encontrado foi $0,1\mu g/mL$. O ácido clorogênico e as flavonas hidroxiladas na posição 7, como a apigenina e a vicianina-2, são inibidores efetivos da XOD (ÖZYÜREK et al., 2009). Ferraz Filha e colaboradores (2006) comprovaram que outras espécies do gênero *Lychnophora* também possuem uma excelente atividade inibidora de XOD. Assim, a inibição da XOD parece ser o principal mecanismo para a inibição da quimioluminescência causada pelo extrato, o que explicaria o menor valor de IC_{50} comparado com os outros testes antioxidantes realizados. No entanto, o sequestro de radicais também pode colaborar na inibição da quimioluminescência.

4.3.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A enzima superóxido dismutase (SOD) acelera a depleção de $O_2^{\cdot-}$ através de uma reação de dismutação, gerando H_2O_2 , o qual reage com Fe^{2+} e pela reação de Fenton [$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$] forma radicais hidroxila ($\cdot OH$) (VALKO et al., 2007). Estes radicais podem oxidar ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) presentes nas membranas celulares, processo conhecido como peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é um processo de reação em cadeia, no qual, a oxidação dos PUFA, gera radicais alcóxila ($LO\cdot$) e peróxila ($LOO\cdot$) que reagem com novas moléculas de PUFA produzindo

hidroperóxidos lipídicos (LOOH) capazes de se transformar em espécies mais reativas e produtos secundários tais como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonenal e principalmente malondialdeído (MDA), que podem difundir e atacar outras estruturas celulares (NIMSE; PAL, 2015).

A peroxidação lipídica é geralmente associada com os processos inflamatórios e pró-carcinogênicos na pele, isto porque ela aumenta a produção de prostaglandinas (PG), incluindo a PGE2 que causa inflamação do tecido. As células inflamatórias produzem EROs que podem promover a mutação de genes e diminuir a reparação do DNA, promovendo assim a carcinogênese (HALLIDAY, 2005).

Portanto, a capacidade de inibir a peroxidação lipídica é uma característica muito apreciada nos agentes fotoquimiopreventivos. Os antioxidantes podem inibir a peroxidação lipídica atuando das seguintes formas: prevenindo a formação de EROs, sequestrando e removendo os oxidantes; reparando os danos e excretando os produtos tóxicos; inibindo a ativação ou reação enzimática; e, inibindo o início ou a propagação da reação em cadeia e/ou acelerando seu término (NIKI et al., 2005).

O extrato inibiu a peroxidação lipídica de maneira dose-dependente verificada através da inibição da formação de espécies reativas ao TBA, sendo o valor de IC_{50} 20,27 μ g/mL.

O valor encontrado é muito diferente da IC_{50} de outros extratos avaliados anteriormente em nosso laboratório utilizando a mesma metodologia, como o extrato de calêndula (IC_{50} = 350 μ g/mL) (FONSECA et al., 2010) e o extrato de etanólico de própolis (IC_{50} = 0,016 μ L/mL) (MARQUELE et al., 2005), por exemplo. No entanto, ambos os extrato apresentaram atividade fotoquimiopreventiva contra os danos produzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelos (FONSECA et al., 2010; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2007). A atividade inibidora da peroxidação lipídica depende não só da atividade antioxidante dos compostos presentes no extrato, mas também da solubilidade destes no meio reacional.

O resultado obtido também pode ter sido influenciado pelas condições experimentais (pH 7,4 e aquecimento a 37°C) que favorecem à hidrólise dos ácidos clorogênicos do extrato, gerando ácido quínico, ácido caféico e ácido p-cumárico. A atividade inibidora da peroxidação lipídica pelos derivados do ácido hidroxicinâmico foi avaliada por Cheng e colaboradores (2007). Em seu estudo, os autores demonstraram que os ácidos caféico (CaA), clorogênico (AC), sinápico (SA), ferúlico (FA) e p-cumárico (CoA) inibiram a peroxidação da lipoproteína de baixa densidade

humana (LDL) quando esta foi iniciada tanto por hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) quanto por íons Cu^{2+} , na seguinte ordem $\text{CaA} \approx \text{AC} > \text{SA} > \text{FA} > \text{CoA}$ e $\text{CaA} \approx \text{AC} > \text{SA} \approx \text{FA} \approx \text{CoA}$, respectivamente. Nos dois experimentos, as atividades do ácido caféico e do ácido clorogênico foram equivalentes, porém o ácido p-cumárico foi o que apresentou a menor atividade. Desta forma, a hidrólise dos ácidos clorogênicos não causaria a perda da atividade inibidora da peroxidação lipídica do extrato, mas pode diminuir sua intensidade.

4.4. Avaliação da fotoestabilidade do extrato

Uma vez que se tem o objetivo de desenvolver formulações fotoquimiopreventivas, a avaliação da fotoestabilidade do extrato é de grande importância, a fim de evitar que produtos da fotodegradação causem danos à pele. Os fotoprodutos em contato direto com a pele podem comportar-se como foto-oxidantes e promover a fototoxicidade ou fotoalergias, além disso, a interação destes produtos com os excipientes da formulação ou com os componentes da pele podem formar novas moléculas com propriedade toxicológicas desconhecidas (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). Composto que absorvem a RUV, como os compostos fenólicos e os filtros solares, são potencialmente propensos a criar reações fotobiológicas (fototoxicidade, fotoalergia, fotogenotoxicidade, fotocarcinogenicidade) (HENRY; FOTI; ALSANTE, 2009).

Por isso, soluções de extrato expostas a doses de UVA ($20\text{J}/\text{cm}^2$) ou UVB ($2,87\text{J}/\text{cm}^2$) foram analisadas por espectrofotômetro e CLAE, e, então, comparadas às soluções não irradiadas. A figura 13 apresenta o gráfico de absorbância das diferentes soluções do extrato.

A razão da área sob a curva (ASC) da solução irradiada pela ASC da solução não irradiada foi 0,92. Um protetor solar é considerado fotoestável quando esta razão é $\geq 0,8$ (GONZALEZ et al., 2007). Além disso, não foram observadas mudanças nos perfis cromatográficos das soluções de extrato irradiadas em relação às soluções não irradiadas. Portanto, podemos considerar que o extrato estudado é fotoestável. A fototoxicidade do extrato também foi avaliada e será discutida na sequência.

Figura 13. Curva dos espectros de absorvância na região do UV do extrato não irradiado (ELS NI), exposto a $20\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UVA (ELS UVA) e exposto a $2,87\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UVB (ELS UVB).

4.5. Avaliação da citotoxicidade e da fototoxicidade em cultura de células

O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a medida da viabilidade celular. A citotoxicidade do extrato *L. salicifolia* foi investigada na linhagem de células L929 de fibroblastos de camundongo utilizando o método do vermelho neutro. O ensaio de viabilidade pelo método do vermelho neutro é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). O corante vermelho neutro passa através da membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hidrofóbicas 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 vivas e as danificadas, pela medida da intensidade da cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003). A escolha deste método foi devido à menor interferência das amostras na leitura da absorvância.

Os resultados sugerem que em concentrações muito baixas do extrato, menores que $1,9\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio de cultura, há um pequeno aumento da proliferação e/ou aumento do metabolismo celular. Entre $1,9$ a $125\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato, não foram observadas alterações na viabilidade celular e, em concentrações mais elevadas, o extrato começou a demonstrar-se citotóxico, sendo que $250\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziu a viabilidade celular pela metade, em relação ao controle sem tratamento considerado

100% de viabilidade (figura 14). Entretanto, podemos observar que nas concentrações que apresentaram atividade antioxidante, o extrato não foi citotóxico, o que viabiliza sua aplicação como fotoquimiopreventivo. Também foi avaliada a citotoxicidade das substâncias isoladas do extrato: vicenina-2 e ácido clorogênico. Observou-se que 2,0mg/mL de vicenina-2 reduziu 25% da viabilidade celular e 2,5mg/mL de ácido clorogênico reduziu 60% da viabilidade celular, no entanto, nestas altas concentrações os polifenóis podem alterar o pH do meio de cultivo das células e assim os resultados obtidos não podem ser levados em consideração. Portanto, admitimos que, nas concentrações encontradas no extrato, estas substâncias não são tóxicas para células da linhagem L929.

Figura 14. Viabilidade das células da linhagem L929 tratadas com diversas concentrações do extrato de *L. salicifolia* Mart.

A determinação da fototoxicidade do extrato é de grande importância quando se está avaliando seu potencial fotoquimiopreventivo, uma vez que o extrato estará em contato direto com a pele quando esta for exposta à radiação solar. A fototoxicidade é definida como a resposta tóxica de uma substância aplicada sobre a pele, a qual é revelada ou aumenta após exposições consecutivas a luz; ou que é induzida pela irradiação da pele após a administração sistêmica da substância (OECD, 2004a).

O teste padronizado como método alternativo *in vitro* para avaliação da fototoxicidade tem como princípio avaliar o potencial fototóxico de uma substância, induzido pela excitação química após a exposição à luz, através da redução da

viabilidade de células expostas à substância na presença versus na ausência de luz. A dose de radiação utilizada não deve causar efeitos deletérios excessivos no sistema celular. A radiação UVA está, usualmente, associada a reações de fototoxicidade *in vivo*, enquanto a UVB possui menor relevância, mas é altamente citotóxica (OECD, 2004a). A recomendação do protocolo oficial é uma dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA, no entanto, neste estudo foram testadas também doses maiores até a dose utilizadas para os experimentos de eficácia fotoquimiopreventiva em cultura de células ($20\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA) na qual os parâmetros bioquímicos utilizados podem ser satisfatoriamente quantificados sem a perda da viabilidade celular. Estudos realizados em nosso laboratório constaram que células da linhagem L929 irradiadas com doses de 26,58 e $53,16\text{J}/\text{cm}^2$ de radiação UVA mantiveram a viabilidade celular em, aproximadamente, 92% em relação às células não irradiadas, 24 horas após a irradiação. Por outro lado, a sensibilidade das células da linhagem L929 é muito maior à radiação UVB, sendo que $0,09\text{J}/\text{cm}^2$ diminui 50% da viabilidade celular (FIGUEIREDO et al., 2014).

O valor de foto-efeito médio (MPE, do inglês *mean photo effect*), valor obtido pela comparação estatística das curvas dose-resposta obtidas da substância teste com e sem a irradiação, foi utilizado para prever a fototoxicidade. Segundo o protocolo 432 da OECD (OECD, 2004a) substâncias com valores de MPE menores que 0,1 são consideradas “não fototóxicas”, valores de MPE entre 0,1 e 0,15 predizem “provável fototoxicidade”, e valores de MPE maiores que 0,15 predizem “fototoxicidade”. Os resultados obtidos (tabela 7) indicam que o extrato não é fototóxico quando exposto a 5 e $10\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA ou $0,1\text{J}/\text{cm}^2$ de UVB, porém, a exposição das células tratadas a $20\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA prediz “fototoxicidade”. Estes resultados, no entanto, devem ser analisados com cautela, pois dependem de outros fatores como, por exemplo, a penetração dos compostos na pele. A avobenzona, por exemplo, substância amplamente utilizada como filtro solar para radiação UVA, mostrou ter uma pronunciada fototoxicidade dose-dependente ao UVA (GASPAR et al., 2012).

Tabela 7. Valores de foto-efeito médio (MPE) obtidos pela comparação estatística das curvas dose-resposta do extrato nas células da linhagem L929 não irradiadas e irradiadas em diferentes doses de RUV.

	UVA (J/cm ²)			UVB (J/cm ²)
	5	10	20	0,1
MPE	0,06	-0,05	0,24	-0,036

Conhecendo os valores de IC₅₀ dos testes antioxidantes *in vitro* e o perfil citotóxico e fototóxico do extrato, foi possível selecionar as concentrações mais adequadas para avaliar seu potencial fotoquimiopreventivo em cultura de células.

4.6. Avaliação do potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células

Para determinar o potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico em cultura de células, as células pré-tratadas com os ativos foram expostas à situação de estresse oxidativo e, então, avaliadas quanto aos danos causados em relação às células não tratadas. Foram realizados ensaios de atividade sequestradora de EROs intracelular induzida por adição de H₂O₂ ou exposição à radiação UVA, de quantificação do antioxidante endógeno GSH e de liberação da enzima LDH induzida por UVA.

4.6.1. Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular por medida fluorimétrica

A atividade sequestradora de EROs intracelular foi avaliada pelo método que utiliza a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) como sonda fluorescente. Este método é amplamente utilizado para detectar H₂O₂ intracelular e estresse oxidativo. O diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) é um composto não fluorescente com capacidade de atravessar a membrana celular graças ao seu caráter apolar. No interior das células viáveis, por ação das esterases, ocorre a desacetilação da molécula resultando em 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), composto não fluorescente e estável dentro da célula por algumas horas. A oxidação da DCFH resulta em um composto fluorescente (DCF) (KALYANARAMAN et al., 2012). Inicialmente, pensava-se ser uma sonda específica para H₂O₂, porém,

estudos já demonstraram que a DCFH é oxidada por outras EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005).

O tratamento das células com H_2O_2 (controle positivo) duplicou a intensidade da fluorescência emitida em comparação com as células não tratadas (controle negativo). Por outro lado, o pré-tratamento com ácido clorogênico (2 $\mu\text{g/mL}$) e extrato (10 $\mu\text{g/mL}$) diminuiu, significativamente, este aumento (figura 15).

Figura 15. Inibição da intensidade de fluorescência causada pelo pré-tratamento com ácido clorogênico (A) e com extrato de *L. salicifolia* (B). C⁻: células não tratadas. C⁺: células tratadas apenas com H_2O_2 . * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (C⁻) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Em um segundo experimento, a intensidade de fluorescência apresentada pelas células expostas à radiação UVA (controle positivo) foi cerca de 8 vezes maior que a das células que permaneceram no escuro (controle negativo). Neste caso, o aumento exacerbado da fluorescência emitida pode ser atribuído tanto à oxidação da sonda pelas espécies reativas intracelulares formadas, quanto à fotoreação da DCFH com a UVA (SIK, 2003). No entanto, o pré-tratamento com ácido clorogênico (2 $\mu\text{g/mL}$) e extrato (10 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir em cerca de 70% a intensidade de fluorescência emitida pelo controle positivo (figura 16).

Figura 16. Inibição da intensidade de fluorescência causada pelo pré-tratamento com ácido clorogênico (A) e com extrato de *L. salicifolia* (B). C-: células não tratadas e não irradiadas. C+: células não tratadas e irradiadas com 20J/cm² de UVA. *p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (C+) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Embora o extrato absorva radiação nos comprimentos de onda da região do UV (figura 13), foi observado que o efeito na inibição da fluorescência depende da presença dos compostos nas células. Um experimento foi realizado para verificar o potencial fotoprotetor do extrato e do ácido clorogênico. Para isso, o extrato (2,5%) e o ácido clorogênico (0,5%) foram incorporados em formulações gel, conforme descrito no item 3.7.4., e aplicados sobre uma placa de quartzo que deixa passar a RUV. Foram aplicados 2mg de formulação por cm², quantidade recomendada para garantir a eficácia na aplicação de protetores solares, formando um filme homogêneo. A placa de quartzo foi, então, posicionada sobre a placa de células tratadas com DCFH-DA e o sistema foi exposto a 20J/cm² de UVA conforme descrito por Figueiredo e colaboradores (2014) e esquematizado na figura 17A. Como controle positivo, uma formulação comercial de protetor solar (FPS 30) também foi aplicada. Após a irradiação, a intensidade de fluorescência foi mensurada e comparada a das células que permaneceram no escuro. Os resultados demonstraram que os géis com extrato e com ácido clorogênico não causaram uma inibição significativa da fluorescência como o filtro solar comercial (figura 17B). Assim, podemos sugerir que estes compostos não agem como fotoprotetores nas concentrações utilizadas.

Figura 17. Representação esquemática do experimento utilizado para avaliar o potencial fotoprotetor (A), adaptado de FIGUEIREDO et al. (2014). Gráfico da inibição da intensidade de fluorescência (B). C-: células não irradiadas, C+: células irradiadas em 20J/cm² de UVA, GEL Placebo: formulação gel sem ativos, GEL AC: formulação gel com ácido clorogênico, GEL ELS: formulação gel com extrato, FS 30: filtro solar comercial FPS 30. *p<0,05 diferença significativa comparado ao controle irradiado (C+) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Portanto, os resultados sugerem que a inibição da fluorescência produzida pela adição de H₂O₂ e pela radiação UVA e a consequente proteção celular conferida pelo extrato e pelo ácido clorogênico deve estar relacionada ao seu potencial antioxidante e sequestrador de EROs. Adicionalmente, os compostos fitoquímicos são, em sua maioria, substâncias estranhas às células dos mamíferos e ativam sistemas de desintoxicação e excreção celular. Desta forma, ocorre a ativação das defesas moleculares contra o estresse oxidativo causado por estas substâncias, como, por exemplo, as enzimas antioxidantes. (MURAKAMI, 2014). Assim, os polifenóis poderiam modular a sinalização e outros processos celulares, independentemente de suas habilidades de reagirem com oxidantes (DINKOVA-KOSTOVA, 2008; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que os benefícios dos compostos fitoquímicos à saúde provêm da ativação de uma ou mais vias de adaptação ao estresse celular (MATTSON; CHENG, 2006; MATTSON, 2008a; RAMASSAMY, 2006).

4.6.2. Avaliação da atividade antioxidante por quantificação de GSH

As células possuem vários sistemas de defesa para evitar o estresse oxidativo. Dentre eles, o sistema GSH pode ser considerado um dos mais

importantes. A enzima glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos a seus alcoóis correspondentes pela conversão da glutathiona em sua forma reduzida (GSH) para sua forma oxidada (GSSG). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathiona redutase (GRed), uma etapa crucial para manter a integridade dos sistemas de proteção celular (MASELLA et al., 2005). Petersen e colaboradores (2000) demonstraram em células HaCat (queratinócitos humanos) que os danos no DNA causados pela radiação UVA foram maiores quando um bloqueador da síntese de GSH foi utilizado. O bloqueio da síntese de GSH fez com que a concentração de H_2O_2 intracelular aumentasse, enfatizando o papel do H_2O_2 como um dos principais mediadores dos danos ao DNA causados pela UVA.

No presente estudo, a irradiação das células da linhagem L929 com $20\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA (controle positivo) ocasionou a depleção de 80% dos níveis de GSH em relação às células não expostas à radiação (controle negativo). O pré-tratamento das células com ácido clorogênico (5 e $10\mu\text{g}/\text{mL}$) não resultou em uma recuperação significativa dos níveis de GSH em relação ao controle irradiado. Por outro lado, o pré-tratamento com o extrato ($40\mu\text{g}/\text{mL}$) recuperou 112% dos níveis de GSH (figura 18).

Figura 18. Quantificação de GSH em células da linhagem L929. C-: células não tratadas e não irradiadas. C+: células não tratadas e irradiadas com $20\text{J}/\text{cm}^2$ de UVA. * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle irradiado (C+) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A preservação dos sistemas antioxidantes endógenos cutâneos, como o GSH, é considerada um possível mecanismo de fotoquimioproteção, uma vez que estes sistemas são responsáveis por manter o equilíbrio antioxidante/oxidante e evitar os danos celulares. Diversos estudos têm sugerido que as propriedades anticarcinogênicas dos polifenóis se devem não só às suas habilidades de sequestro de EROs, mas também ao fortalecimento dos sistemas de defesas endógenos (AMBOTHI; PRASAD; BALUPILLAI, 2015; BALUPILLAI et al., 2015; BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; FIANDER; SCHNEIDER, 2000; MASELLA et al., 2004).

4.6.3. Liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática estável em células viáveis que catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*). A liberação de LDH para o meio extracelular ocorre devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular, indicando que as células estão lesadas ou necrosadas, e, portanto, a LDH é um marcador amplamente empregado em estudos de toxicidade (WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005).

A dose de radiação UVA de 20J/cm² aumentou a liberação de LDH pelas células L929 em 30% em relação às células não expostas à radiação. Estes resultados corroboram com o estudo de Larsson e colaboradores (2005) no qual a irradiação de queratinócitos e melanócitos com doses de UVA de 2, 6 e 10J/cm² provocou danos substanciais na membrana imediatamente após a irradiação, aumentando a liberação de LDH para o meio extracelular. No entanto, os autores observaram que os danos provocados à membrana não levaram à morte celular por necrose ou apoptose. Podda e colaboradores (1998) também observaram um aumento significativo na liberação de LDH em pele humana equivalente irradiada a 16,8 J/cm² (UVA+UVB), que foi atribuído aos danos causados na membrana celular.

As células tratadas com diferentes concentrações de extrato e de ácido clorogênico e não irradiadas não apresentaram alterações de liberação de LDH em relação às células não tratadas e não irradiadas (controle não irradiado).

Já as células irradiadas que receberam pré-tratamentos com extrato (5, 10, 20 e 40 µg/mL) diminuíram a liberação de LDH em, aproximadamente, 40, 39, 30 e 20%, respectivamente, em relação ao controle irradiado. O mesmo foi observado

nas células pré-tratadas com ácido clorogênico (5 e 10 µg/mL) que diminuíram a liberação de LDH em aproximadamente 40 e 30%, respectivamente, em relação ao controle irradiado (figura 19).

Figura 19. Liberação de LDH nos diferentes grupos de células. Controle: células não tratadas com os ativos. Demais grupos: células tratadas com extrato (A) e células tratadas com ácido clorogênico (B). * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle irradiado utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A peroxidação lipídica nas membranas celulares pode causar o aumento da liberação da LDH para o meio extracelular. Os lipídios são importantes componentes da membrana celular na forma de fosfolipídios. A peroxidação lipídica das cadeias de ácidos graxos insaturados pelas EROs gera hidroperóxidos lipídicos (LOOH) como produtos primários. Estes lipídios peroxidados tendem a acumular na membrana celular, proporcionalmente, à dose cumulativa de radiação UVA recebida. Concentrações substanciais de LOOH perturbam a integridade das membranas e do envoltório celular (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Catalá (2012) descreve como os fosfolipídios oxidados assumem uma conformação diferente dos não-oxidados e alteram o desenho de “mosaico fluido” de membrana. A oxidação dos fosfolipídios altera sua polaridade e seu formato, e, conseqüentemente, altera as ligações lipídio-lipídio e lipídio-proteína modificando também a função das proteínas da membrana. A conformação da membrana celular é modificada porque os fosfolipídios oxidados são projetados para a superfície e lembram bigodes de gato crescendo a partir da membrana celular (*Lipid Whisker Model*). As principais consequências da peroxidação lipídica e da desestruturação da membrana celular são: alteração da

fluidez e aumento da permeabilidade, alteração no transporte de íons, inibição de processos metabólicos e disfunção dos receptores ligados à membrana (CATALÁ, 2010).

O efeito protetor da membrana celular pode ser atribuído à atividade antioxidante do extrato e do ácido clorogênico. A redução dos níveis da peroxidação lipídica reduz a acumulação dos hidroperóxidos lipídicos e os danos causados por estes produtos na integridade da membrana celular, evitando assim a liberação da LDH para o meio extracelular.

Fu e colaboradores (2000) também verificaram que os polifenóis do chá verde inibiram a liberação de LDH, diminuíram os níveis da peroxidação lipídica, aumentaram a atividade da glutathione peroxidase, e inibiram a ocorrência de apoptose em queratinócitos primários exposto tanto à radiação UVA ou quanto a EROs geradas pelo sistema xantina/XOD, sendo que o efeito de ambos agressores foram parecidos, confirmando que os danos causados pela radiação UVA são, em sua maioria, decorrentes da geração de EROs.

Estudo conduzido por Polte e Tyrrell (2004) demonstrou que a peroxidação lipídica e a produção de peróxidos são uma importante via para a sinalização e ativação da MMP-1 causada pela radiação UVA em fibroblastos, e que a pré-incubação das células com antioxidantes (BHT e Trolox) foi capaz de reduzir o aumento da MMP-1 causado pela UVA. Assim, é possível sugerir que a redução da peroxidação lipídica das membranas pelo extrato e pelo ácido clorogênico também poderia diminuir os danos causados pela MMP-1 no processo de fotoenvelhecimento e na progressão de tumores na pele.

Interessantemente, o efeito protetor do extrato e do ácido clorogênico diminuiu com o aumento da dose aplicada. Efeito semelhante foi encontrado por Fu; Jin e Wei (2000) em fibroblastos e queratinócitos tratados com polifenóis do chá verde. Em concentrações entre 0,01 e 0,1% observou-se uma diminuição dose-dependente da liberação de LDH em relação à liberação basal das células, porém uma dose de 0,5% causou um aumento abrupto na liberação da enzima para o meio extracelular, indicando algum efeito adverso para as células.

Estes resultados poderiam ser explicados pelo fenômeno hormético descrito para os polifenóis. O termo hormese é amplamente utilizado para descrever um efeito dose-resposta bifásico, onde doses baixas promovem um efeito benéfico e altas doses promovem um efeito tóxico. Sugere-se que a exposição a baixas doses

de um agente químico que seja tóxico em altas doses, induz um efeito adaptativo benéfico na célula ou no organismo (MATTSON, 2008b). Este processo está representado esquematicamente na figura 20. Altas doses de polifenóis podem ter efeitos negativos pela geração de metabólitos mais reativos e prejudiciais, principalmente por meio da interação com as respostas desintoxicantes e a indução de genes (CHIRUMBOLO, 2011).

Figura 20. Representação da curva hormética ilustrando a relação entre intensidade de estresse e capacidade homeostática. Adaptado de MURAKAMI (2014).

Como exemplo, alguns trabalhos verificaram esse efeito com ácido protocatecuico, composto presente no extrato. A aplicação tópica do ácido protocatecuico em doses baixas exerceu um efeito benéfico sobre tumores de pele induzidos por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos, por outro lado, a aplicação do composto em doses altas, aumentou o número de tumores (NAKAMURA et al., 2000). O pré-tratamento com o mesmo composto em altas doses, também aumentou a resposta inflamatória crônica induzida por TPA, incluindo a formação de edema, a infiltração de leucócitos e o aumento dos níveis de substâncias reativas com o TBA (NAKAMURA; TORIKAI; OHIGASHI, 2001). Os autores atribuíram esse efeito ao metabolismo do ácido protocatecuico pela tirosinase produzindo subprodutos sem efeito antioxidante e/ou com potencial para promoção de tumores. A ativação do composto pela tirosinase também aumentou sua citotoxicidade e o consumo de GSH intracelular.

Outros polifenóis como os polifenóis do chá verde, o resveratrol, o canferol e principalmente a quercetina já tiveram a hormese investigada e confirmada (CALABRESE; MATTSON; CALABRESE, 2010; KIM; QUON; KIM, 2014; OH; KIM; CHUNG, 2006; VARGAS; BURD, 2010).

Através de métodos *in vitro*, especialmente a utilização da cultura de células, foi possível comprovar o potencial fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico e, assim, dar continuidade ao trabalho.

4.7. Preparação e avaliação de formulações para uso tópico

Uma vez constatado o potencial fotoquimiopreventivo *in vitro* do extrato e do ácido clorogênico, a etapa seguinte foi desenvolver formulações para aplicação tópica dos mesmos. Formulações contendo extratos vegetais e suas substâncias isoladas que visem a fotoquimioprevenção devem permitir que os compostos ativos presentes no extrato possam alcançar as camadas celulares da pele onde ocorre a produção de radicais livres (VICENTINI et al., 2008). Além disso, os compostos utilizados neste estudo não apresentaram atividade fotoprotetora, ressaltando a importância do desenvolvimento de formulações que promovam sua penetração cutânea.

A utilização de novos sistemas nanoestruturados para liberação de compostos provenientes de extratos vegetais tem se mostrado promissora por aumentar a atividade e diminuir os problemas associados a estas substâncias. Dentre os sistemas nanoestruturados, a escolha pelos lipossomas foi baseada em suas principais vantagens: alta biocompatibilidade, facilidade de preparo, versatilidade química que permite carregar compostos hidrofílicos, anfifílicos e lipofílicos, e a simples modulação de suas propriedades farmacocinéticas através da combinação dos componentes formadores da bicamada. Devido a suas características únicas, os lipossomas são capazes de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade; aumentar a captação celular; alterar a farmacocinética e a biodistribuição; e, aumentar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* dos compostos carregados (AJAZUDDIN; SARAF, 2010).

A principal limitação para utilização de lipossomas está relacionada à estabilidade dos mesmos durante o armazenamento. No entanto, a encapsulação de polifenóis favorece a estabilidade e a estocagem dos lipossomas uma vez que as

propriedades antioxidantes destes compostos inibem a oxidação dos lipídios insaturados das vesículas. Desta forma, a encapsulação de polifenóis em lipossomas é duplamente benéfica (MIGNET; SEGUIN; CHABOT, 2013).

Alguns estudos vêm demonstrando que a incorporação de polifenóis em lipossomas pode aumentar sua penetração na pele e sua eficácia fotoquimiopreventiva. Fang e colaboradores (2006), por exemplo, demonstraram que a incorporação de catequinas do chá verde em lipossomas flexíveis aumentou sua permeação cutânea. Caddeo e colaboradores (2008) observaram que a incorporação de resveratrol em lipossomas inibiu sua citotoxicidade em altas concentrações e aumentou a proliferação celular e a viabilidade celular sob condições de estresse oxidativo causado pela radiação UVB em comparação à substância não encapsulada. Agrawal e Kaur (2010) comprovaram que a aplicação tópica de curcumina encapsulada em lipossomas flexíveis foi mais eficaz em proteger a pele de camundongos dos efeitos deletérios causados pela exposição crônica à radiação ultravioleta que a curcumina não encapsulada. Neste caso, a aplicação do composto encapsulado evitou a formação de lesões e outras alterações cutâneas; amenizou a perda da elasticidade da pele; e, restaurou o equilíbrio oxidante/antioxidante avaliado pela peroxidação lipídica, atividade da catalase e quantificação de GSH.

Desta forma, a encapsulação de polifenóis e extratos vegetais em lipossomas parece ser uma alternativa promissora para liberação destes ativos na pele para que atuem como fotoquimiopreventivos. Foram, então, preparadas dispersões de lipossomas sem ativos, lipossomas contendo ácido clorogênico e lipossomas contendo extrato de *L. salicifolia*. As dispersões foram caracterizadas e avaliadas quanto à sua estabilidade para, em seguida, serem incorporadas em formulações géis. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

4.7.1. Caracterização dos lipossomas

A caracterização das dispersões de lipossomas recém preparadas foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: média do tamanho de partículas, potencial zeta, índice de polidispersividade (Pdl) e eficiência de encapsulação (EE). Os resultados estão representados na tabela 8.

Tabela 8. Caracterização dos lipossomas.

	Dispersão de lipossomas sem ativos	Dispersão de lipossomas com ácido clorogênico	Dispersão de lipossomas com extrato
Tamanho médio de partículas (d.nm)	65,78 ± 0,87	63,42 ± 0,18	114,12 ± 1,54
Índice de polidispersividade	0,36 ± 0,005	0,25 ± 0,005	0,22 ± 0,015
Potencial zeta (mV)	-2,64 ± 0,12	-1,87 ± 0,19	-5,11 ± 0,50
Eficiência de encapsulação (%)	-	33 ± 7,83	51,34 ± 10,9 [*] 53,98 ± 8,84 ^{**}

^{*}Ácido clorogênico

^{**}Vicenina-2

Analisando o tamanho médio das partículas, observamos que a adição de ácido clorogênico não alterou o diâmetro das partículas em comparação com as partículas sem ativo. Por outro lado, a adição do extrato aumentou o tamanho das partículas em relação às aquelas sem ativo e incorporadas de ácido clorogênico. Este efeito pode ser atribuído a mudanças na estrutura das vesículas, como, por exemplo, a curvatura da bicamada lipídica e a disposição lamelar, ocasionadas pela interação com os diferentes compostos presentes no extrato. Efeito semelhante foi observado por Castangia e colaboradores (2015) quando compararam lipossomas de extrato das raízes de *Glycyrrhiza glabra* e de sua substância isolada glicirrizina, os lipossomas com extrato apresentaram quase o dobro do tamanho (≈100nm) em relação à substância isolada (≈59nm).

Quanto ao índice de polidispersividade, o valor 0,0 indica que o sistema é muito homogêneo e o valor 1,0 indica que é muito heterogêneo (HONEYWELL-NGUYEN; BOUWSTRA, 2003). Assim, os valores de Pdl obtidos para todas as dispersões indicam a homogeneidade dos sistemas desenvolvidos, principalmente após a adição dos ativos.

O potencial zeta é um dos mais importantes parâmetros a serem avaliados na caracterização das partículas coloidais, pois ele interfere em várias propriedades dos sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados (HONARY; ZAHIR, 2013a). Quando uma partícula coloidal, como um lipossoma, se dispersa em uma fase contínua aquosa adquire em sua superfície uma carga elétrica. Esta carga pode ter

diferentes origens: ionização dos grupos funcionais das partículas dispersas, adsorção de íons presentes no meio de dispersão, fricções entre as partículas e o meio de dispersão. Para manter sua neutralidade, as partículas coloidais atraem íons de carga contrária (contra-íons) e repelem íons de mesma carga (co-íons), este fenômeno, unido à agitação térmica, produz uma distribuição de cargas formando uma dupla camada elétrica. A camada mais próxima à superfície da partícula (camada rígida ou Camada de Stern) é formada por íons fortemente ligados à superfície por forças eletrostáticas e não sofre influência da agitação térmica. A segunda camada (camada difusa) é constituída de uma atmosfera iônica que contém co-íons e contra-íons e o efeito térmico permite a movimentação destes íons. (AUTON, 2005; LOZANO; CÓRDOBA; CÓRDOBA, 2012).

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano de cisalhamento (ou deslizamento), ou seja, no plano onde se rompe a distribuição elétrica quando uma diferença de potencial adequada é aplicada e a partícula se coloca em movimento (figura 21). O potencial zeta pode, então, ser determinado experimentalmente, pois representa a energia mínima por unidade de carga necessária para separar a partícula de sua atmosfera iônica (AUTON, 2005; LOZANO; CÓRDOBA; CÓRDOBA, 2012).

A formação da dupla camada é consequência da atuação de duas forças contrárias: a atração de Coulomb que arrasta todos os íons contrários para a superfície da partícula, e a agitação térmica que tende a dispersá-los pela solução. A dupla camada, portanto, produz forças de repulsão entre as partículas de modo que as mantém separadas, no entanto, dependendo do tipo e da concentração de íons no meio, a espessura da dupla camada pode atingir um tamanho crítico no qual as forças de atração predominam sobre as forças de repulsão, ocorrendo, assim, a coagulação do colóide. Portanto, a presença e a magnitude ou a ausência de carga nas partículas coloidais, é um fator condicionante da estabilidade do sistema coloidal e o potencial zeta determina o equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas. Desta forma, valores de potencial zeta próximos a zero são considerados críticos (LOZANO; CÓRDOBA; CÓRDOBA, 2012).

Figura 21. Representação esquemática da dupla camada elétrica e variação no potencial com a distância em relação à superfície da partícula suspensa em um meio. Adaptado de LIESE; HILTERHAUS, 2013.

Todas as dispersões de lipossomas preparadas apresentaram potencial zeta negativo com valores muito próximos a 0. Valores na faixa de -5,0 a +5,0 indicam rápida agregação das partículas (HONARY; ZAHIR, 2013b). A presença do tensoativo não iônico Tween 20 na formulação dos lipossomas pode influenciar no baixo valor do potencial zeta. Por outro lado, mesmo na ausência de um potencial zeta significativo, a presença do Tween 20 pode manter a estabilidade das dispersões através da estabilização estérica (AUTON, 2005), já que não foram observadas mudanças de tamanho das partículas nos testes de estabilidade, como será discutido na próxima seção. Além disso, a adsorção de moléculas grandes (como os polifenóis presentes no extrato) à superfície da partícula poderia deslocar o plano de cisalhamento para longe da superfície da partícula levando à redução na medida do potencial zeta mesmo que a superfície da partícula esteja fortemente carregada (HONARY; ZAHIR, 2013b).

A eficiência de encapsulação (EE) de polifenóis em lipossomas depende principalmente da estrutura do polifenol e da composição lipídica. De modo geral, a técnica de hidratação do filme lipídico, apesar de ser a técnica mais utilizada para a preparação de lipossomas com polifenóis, não proporciona altas porcentagens de

encapsulação destes ativos (MIGNET; SEGUIN; CHABOT, 2013). Os resultados obtidos estão dentro dos valores esperados. Comparando a EE do ácido clorogênico e da vicenina-2 presentes no extrato, apesar das estruturas serem bem diferentes, não houve diferença significativa entre a EE destas duas substâncias nos lipossomas de extrato. A EE do ácido clorogênico isolado foi menor quando comparada a EE do ácido clorogênico no extrato, no entanto, a concentração encapsulada foi cerca de 110 vezes maior, pois, o ácido clorogênico se encontra em pequena quantidade no extrato.

As dispersões de lipossomas também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (Cryo-SEM). As imagens obtidas estão apresentadas na figura 22. Devido ao reduzido diâmetro dos lipossomas formados (entre 63 e 115nm), com o equipamento utilizado não foi possível observar a bicamada lipídica, no entanto, foi possível comprovar a formação das partículas indicadas com as setas brancas.

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das dispersões de lipossomas. Lipossomas sem ativos (A e B), lipossomas com ácido clorogênico (C e D) e lipossomas com extrato (E e F).

4.7.2. Avaliação da estabilidade física e química dos lipossomas

A estabilidade de formulações contendo lipossomas é consideravelmente mais complexa que a das formulações tradicionais, uma vez que nas formulações

contendo lipossomas, a caracterização físico-química do carreador também deve ser considerada (LANG; VIGO-PELFREY, 1993).

A degradação oxidativa dos fosfolípidios que compõe sua bicamada tem sido considerada como um dos principais limitantes para a estabilidade de prateleira de produtos contendo lipossomas. Os fosfolípidios possuem uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados e, por isso, são muito susceptíveis à oxidação (BREWER, 2011). A degradação oxidativa dos lipossomas pode ter um importante efeito na permeabilidade da bicamada lipídica. O armazenamento a baixas temperaturas e ao abrigo da luz e do oxigênio pode ser uma forma de evitar a oxidação, além disso, a adição de antioxidantes pode aumentar a proteção contra a oxidação (GRIT; CROMMELIN, 1993).

Os principais fenômenos associados à instabilidade dos lipossomas em dispersões aquosas durante o armazenamento por longos períodos são: hidrólise e oxidação dos fosfolípidios, perda de substância encapsulada e agregação ou fusão das vesículas (GHANBARZADEH; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2013). Desta forma, a estabilidade física dos lipossomas foi avaliada por alteração no tamanho das partículas e a estabilidade química pela formação de produtos resultantes da peroxidação lipídica.

Os testes de estabilidade foram conduzidos de acordo o “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004). Com o objetivo de reduzir o tempo de análise, foram empregadas condições extremas de temperatura (estufa, geladeira e freezer) visando acelerar possíveis reações e sinais de instabilidade. Como as dispersões lipossomais são consideradas sistemas “frágeis” às condições de armazenamento, as formulações foram avaliadas diariamente por um período de 15 dias, e posteriormente em intervalos maiores de tempo até completar 7 meses.

Os resultados obtidos demonstraram que, de modo geral, não houve alteração de tamanho dos lipossomas durante o armazenamento à temperatura de 4°C. Nos lipossomas sem ativo e com ácido clorogênico armazenados a 40°C, houve um pequeno aumento de diâmetro que foi acentuado no quarto mês, o que poderia estar relacionado ao aumento da peroxidação lipídica observada neste tempo de análise. Por outro lado, as partículas armazenadas a -20°C sofreram uma alteração drástica de tamanho logo no primeiro dia de avaliação da estabilidade (figura 23). As alterações observadas nas vesículas armazenadas a -20°C podem

ser atribuídas ao estresse mecânico decorrente da formação de cristais de gelo que causa danos nas membranas dos lipossomas (STARK; PABST; PRASSL, 2010).

Os resultados dos testes de peroxidação lipídica, nas três temperaturas de armazenamento testadas, demonstraram que as dispersões de lipossomas contendo os ativos apresentaram menor concentração de MDA, um produto da peroxidação lipídica, do que as dispersões de lipossomas sem a adição de ativos, confirmando a atividade antioxidante dos compostos. A dispersão de lipossomas sem ativo, na temperatura de 40°C, foi a que apresentou maior concentração de MDA. O armazenamento em estufa favorece a peroxidação lipídica, no entanto, a dispersão contendo extrato não apresentou aumento nos níveis de MDA durante os 7 meses. Já a dispersão de lipossomas com ácido clorogênico, a partir do quarto mês em estufa, apresentou um aumento dos níveis de MDA em relação à dispersão contendo extrato, coincidindo com o aumento no diâmetro das vesículas. Este resultado sugere a relação da oxidação dos fosfolípidios com a desestruturação da membrana dos lipossomas. Os resultados mostrados na figura 24 foram expressos em nM de MDA/mM de lípidios.

A preparação das dispersões de lipossomas em tampão pH 5,0 foi pensada de modo a reduzir a hidrólise do ácido clorogênico. Ainda assim, o aumento dos níveis de produtos da peroxidação lipídica na dispersão de lipossomas com ácido clorogênico pode indicar a perda da atividade antioxidante pela degradação do ativo, uma vez que a temperatura e o tempo possuem grande influencia neste processo (DAWIDOWICZ; TYPEK, 2011). Chang e colaboradores (2006) observaram a degradação do ácido clorogênico em frutos e em uma bebida a base de *Crataegus pinnatifida* (espinheiro branco), quando armazenados a 40°C por seis meses. A perda de ácido clorogênico nos frutos e na bebida foi de aproximadamente 60 e 30%, respectivamente.

Por outro lado, os níveis de MDA nas dispersões contendo extrato foram mantidos, mesmo quando armazenada a 40°C por um longo período de tempo, indicando que a atividade antioxidante do extrato pode ser atribuída à sua mistura complexa de substâncias antioxidantes. Outros polifenóis encontrados em grande quantidade no extrato, como a vicenina-2 e os ácidos dicafeoilquínicos, podem ter colaborado na manutenção da integridade dos lípidios da membrana. Xu; Hu e Liu (2012) verificaram que a atividade antioxidante dos ácidos dicafeoilquínicos, como o 3,5-dicafeoilquínico e o 4,5-dicafeoilquínico presentes no extrato de *L. salicifolia*, foi

superior à dos ácidos cafeoilquínicos, inclusive do ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico), principalmente devido ao maior número de grupos OH presentes nas moléculas.

A incorporação de extratos vegetais com atividade antioxidante parece ser uma maneira eficiente de aumentar a estabilidade de lipossomas de fosfatidilcolina. Estudo conduzido por Atrooz (2007) avaliou os efeitos na estabilidade de lipossomas de três extratos (*Canna indica*, *Hordium sativum* e *Capsicum annuum*) que apresentaram atividade doadora de H^+ ao radical DPPH $^{\bullet}$ e quantidades significativas de flavonóides e polifenóis. Os resultados demonstraram que a adição dos extratos aumentou a estabilidade prevenindo a oxidação e a agregação dos lipossomas. A diferença na porcentagem de agregação das vesículas sem ativo e com os extratos incorporados foi maior a 37°C, sugerindo, novamente, a relação entre a peroxidação lipídica e a agregação dos lipossomas.

Figura 23. Avaliação da estabilidade dos lipossomas pela média do tamanho de partículas. Lipossomas sem ativo (Branco), lipossomas com ácido clorogênico (AC) e lipossomas com extrato (ELS) durante o armazenamento em diferentes temperaturas: 4°C (A), 40°C (B) e -20°C (C).

Figura 24. Avaliação da estabilidade pela concentração de malondialdeído (MDA) formado nas dispersões de lipossomas sem ativo (Branco), com ácido clorogênico (AC) e com extrato (ELS) durante o armazenamento em diferentes temperaturas: 4°C (A), 40°C (B) e -20°C (C).

4.7.3. Avaliação do pH e do comportamento reológico das formulações

A aplicação tópica das dispersões de lipossomas é limitada devido ao seu caráter líquido, no entanto, a viscosidade desejada para aplicação na pele pode ser alcançada pela incorporação em um veículo adequado. Géis hidrofílicos são comumente utilizados como veículos de dispersões lipossomais. Lipossomas são bastante compatíveis com agentes doadores de viscosidade como os derivados da celulose e os polímeros derivados do ácido acrílico (GUPTA et al., 2012).

Além disso, a viscosidade elevada proporcionada pelo hidrogel atua como um mecanismo de proteção para as vesículas. Mourtas e colaboradores (2008b) observaram que a adição de excipientes, como propilenoglicol, transcutol[®] CG ou cremophor[®] EL, afetavam a integridade das vesículas resultando em uma rápida liberação do conteúdo encapsulado. No entanto, este efeito foi significativamente reduzido nas dispersões de lipossomas incorporadas em diferentes hidrogéis, sugerindo a redução no rompimento das membranas lipossomais.

Uma vez confirmada a estabilidade das dispersões de lipossomas armazenadas em geladeira, foram preparadas formulações géis para aplicação tópica. As formulações foram preparadas utilizando hidroxietil-celulose (HEC), um polímero não iônico, com o objetivo de minimizar o efeito de cargas sobre a estabilidade dos lipossomas. As formulações foram, então, avaliadas quanto aos valores de pH e seu comportamento reológico. Os resultados estão expressos na tabela 9.

As formulações desenvolvidas apresentaram valores de pH entre 4,8 e 5,4. A manutenção dos valores de pH já era esperada, uma vez que estas foram preparadas em solução tampão (pH 5,0). Estes valores são considerados compatíveis com o pH da pele saudável que é levemente ácido com valores entre 4,6 e 5,8 (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

A análise reológica é de fundamental importância no desenvolvimento, na caracterização físico-química e no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e cosméticos. As propriedades reológicas de formulações tópicas podem influenciar na absorção dos ativos. O aumento da viscosidade, por exemplo, diminui a absorção de fármacos pela pele. Sistemas coloidais ou dispersos, como as emulsões, suspensões e géis, possuem comportamento de fluido não-newtoniano, ou seja, a viscosidade do fluido varia com o gradiente de cisalhamento (AUTON, 2005).

O índice de fluxo na equação de Ostwald's (n) indica fisicamente o afastamento do fluido do modelo newtoniano, quando o valor de " n " se aproxima de 1,0 o fluido está próximo do comportamento newtoniano, ou seja, a viscosidade não varia com o gradiente de cisalhamento. Fluidos com índice de fluxo entre 0 e 1, possuem comportamento pseudoplástico (MELO; DANTAS; NETO, 2013). Hidrocolóides, como os géis, costumam apresentar este tipo de comportamento. As moléculas longas, de elevada massa molecular, em solução, permanecem embaraçadas em associação com o solvente imobilizado, sob influência de tensão, as moléculas tendem a se tornar menos embaraçadas e alinham-se na direção do fluxo e, assim, oferecem menos resistência ao fluxo. A diminuição da resistência e a liberação do solvente aprisionada contribuem para a diminuição da viscosidade (AUTON, 2005).

Como esperado, o índice de fluxo de todas as formulações géis foi menor que 1,0, indicando comportamento pseudoplástico. As formulações sem lipossomas apresentaram um índice de fluxo de aproximadamente 0,2. A adição de lipossomas nas formulações causou o aumento do índice de fluxo em comparação com as formulações com os ativos não encapsulados. A formulação contendo lipossomas com ácido clorogênico e extrato apresentaram índice de fluxo de 0,32 e 0,49, respectivamente. Quando um número considerável de partículas é incorporado em um gel, qualquer deformação do complexo, sob uma magnitude específica de estresse aplicada, é provavelmente diferente da deformação do gel controle. A quantidade de partículas e sua rigidez faz com que o gel não possa ser tão facilmente deformado como o gel controle, resultando na modificação do fluxo e das propriedades elásticas em comparação com o gel controle (MOURTAS et al., 2008a).

Por outro lado, a adição de lipossomas com ácido clorogênico à formulação não alterou a viscosidade aparente em relação à formulação com ativo não encapsulado. No entanto, a adição de lipossomas de extrato reduziu significativamente a viscosidade aparente da formulação em relação à formulação com extrato não encapsulado. A redução da viscosidade pode facilitar a liberação dos ativos do gel favorecendo, assim, a penetração dos ativos na pele.

Tabela 9. Análise do comportamento reológico e do pH das formulações.

Amostra	Viscosidade Aparente (Pa)	Índice de fluxo	Tixotropia (Pa/s)	pH
Gel Placebo	2,72 ^a	0,21 ^d	668,81 ^h	5,38
Gel AC	3,26 ^b	0,17 ^e	1772,39 ⁱ	4,99
Gel ELS	4,61 ^c	0,20 ^{d,e}	837,45 ^{h,i,j}	5,21
Gel Lipo AC	3,47 ^b	0,32 ^f	583,09 ^h	4,80
Gel Lipo ELS	2,32 ^a	0,49 ^g	230,26 ^{h,j}	5,11

Valores representados por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) utilizando o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni.

Todas as formulações apresentaram comportamento tixotrópico. A tixotropia é definida como a redução da viscosidade aparente sob pressão seguido de uma recuperação gradual quando a pressão é removida. O valor de tixotropia representa a área formada entre a curva ascendente obtida pelo aumento gradativo da tensão de cisalhamento e a curva descendente obtida pela diminuição gradativa da tensão de cisalhamento (LEE; MOTURI; LEE, 2009). A tixotropia é importante na aplicação do produto sobre a pele. Formulações tópicas com caráter tixotrópico deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluídas e facilitando o espalhamento na pele. No momento em que se encerra a aplicação, a formulação recupera a viscosidade inicial, o que evita que o produto escorra. Portanto, um valor elevado de tixotropia pode levar ao escorrimento do produto após a aplicação, enquanto que um valor muito baixo pode atrapalhar a espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003). Com a redução da tensão de cisalhamento, as formulações contendo lipossomas apresentaram a habilidade de recuperar sua estrutura original (figura 25).

Diante dos resultados podemos sugerir que a incorporação de lipossomas contendo ácido clorogênico e extrato não alterou as características desejáveis em formulações para uso tópico. Tanto o pH como as propriedades reológicas da formulações podem influenciar o perfil de liberação dos ativos e a penetração na pele, assim, estes parâmetros foram avaliados na sequência.

Figura 25. Reogramas das formulações géis.

4.7.4. Determinação do perfil de liberação dos ativos

A penetração de fármacos na pele para a promoção de um efeito local é um processo complexo que envolve três principais etapas: (1) liberação do fármaco do veículo, (2) penetração no estrato córneo e (3) partição do estrato córneo para atingir os alvos na epiderme viável e derme. A primeira etapa depende das propriedades físico-químicas do fármaco e do veículo e pode ser otimizada pelo correto delineamento da formulação. As segunda e terceira etapas também dependem das propriedades físico-químicas e do grau de saturação do fármaco no veículo, assim como da partição do fármaco entre o veículo e a pele (JENSEN; PETERSSON; NIELSEN, 2011). Desde forma, para avaliar a penetração dos ativos na pele, o primeiro passo é conhecer o perfil de liberação dos ativos das formulações géis.

O perfil de liberação dos ativos foi determinado em células de difusão de Franz utilizando membrana de diálise entre os compartimentos doador e receptor. O pH 7,4 do meio receptor garante a solubilidade dos ativos, uma vez que polifenóis levemente ácidos são mais solúveis em pH acima de 7,0 que em pH 5,0 (ZILLICH et al., 2013).

Os resultados dos estudos do perfil de liberação dos ativos mostraram que as formulações géis contendo lipossomas (Gel Lipo AC e Gel Lipo ELS) mantêm a liberação dos compostos ativos por um maior período de tempo em comparação com os géis contendo os compostos não encapsulados (Gel AC e Gel ELS). As formulações géis adicionadas de Tween 20 (Gel ELS+T e Gel AC+T) mantiveram uma liberação intermediária.

Em um período de 10 horas, o gel contendo extrato não encapsulado liberou quase 100% da dose aplicada de vicenina-2, enquanto que o gel contendo extrato em lipossomas liberou apenas 60% no mesmo período. Em 7 horas de experimento, o gel contendo lipossomas de extrato liberou menos da metade do ácido clorogênico que o gel com extrato não encapsulado (figura 26). A diferença entre a liberação de vicenina-2 e ácido clorogênico das formulações géis contendo extrato pode ser atribuída à menor concentração de ácido clorogênico no extrato e/ou à instabilidade deste composto no meio receptor, já que este possui pH 7,4 e está aquecido a 32°C.

Figura 26. Perfil de liberação do ácido clorogênico (A) e da vicenina-2 (B) das formulações géis contendo extrato de *L. salicifolia*.

A formulação gel contendo ácido clorogênico não encapsulado liberou 100% da dose de ativo aplicada em 8 horas de experimento e, no mesmo período, o gel contendo ácido clorogênico em lipossomas liberou apenas 60% da dose aplicada (figura 27).

Figura 27. Perfil de liberação das formulações géis contendo ácido clorogênico.

A liberação mais lenta dos ativos pelas formulações géis contendo lipossomas pode ser atribuída ao maior número de barreiras conferido pelas vesículas para a difusão dos ativos. Os ativos necessitam, primeiramente, atravessar esses compartimentos para então difundirem na rede do polímero circundante e depois para o meio externo (ALI, 2011). A velocidade de liberação intermediária dos compostos pelos géis com Tween 20 adicionado, sugere a formação de micelas do tensoativo no meio aquoso que incorporam os ativos.

Os resultados de liberação obtidos estão de acordo com outros estudos na literatura. Mourtas e colaboradores (2007), utilizando calceína como modelo de substância hidrofílica, observaram a liberação mais lenta do composto encapsulado em lipossomas que seu respectivo gel, e que a rigidez da membrana das vesículas é um fator importante para a determinação da taxa de liberação para fármacos hidrossolúveis, a membrana mais rígida promoveu uma liberação mais lenta. Pavelić; Škalco-Basnet e Schubert (2001) também observaram a liberação mais lenta da calceína quando incorporada em lipossomas veiculados em gel que a substância livre no gel e o efeito protetor do hidrogel sobre a estabilidade dos lipossomas, mesmo após 24 horas de liberação, mais de 80% da calceína encapsulada permanecia nos lipossomas em comparação com os 60% encontrados no gel com a substância livre.

Nas condições estabelecidas para os experimentos de determinação do perfil de liberação, assumisse-se a condição *sink*, na qual a liberação dos ativos do veículo determina o passo limitante. Assim, o veículo funciona como um mecanismo controlador da velocidade de liberação e o gradiente de concentração desenvolve-se apenas na formulação aplicada. Nestas condições, a liberação pode seguir o modelo

proposto por Higuchi (SIEPMANN; PEPPAS, 2011). O modelo de Higuchi é utilizado para cinéticas de liberação controladas pela matriz polimérica (BROPHY; DEASY, 1987).

Todas as formulações foram consideradas de liberação controlada pelo modelo de Higuchi, uma vez que todas apresentaram equações com R^2 muito próximo a 1, ou seja, a quantidade de ativo liberado é proporcional à raiz quadrada do tempo e o fluxo é uma função inversa do tempo (figuras 28 e 29).

Figura 28. Gráficos de representação da equação de Higuchi. Liberação de ácido clorogênico (A, C e E) e de vicenina-2 (B, D e F) das formulações géis contendo extrato.

Figura 29. Gráficos de representação da equação de Higuchi. Liberação de ácido clorogênico da formulação Gel Lipo AC (A), da formulação Gel AC (B) e da formulação Gel AC+T (C).

Desta forma, podemos considerar que o polímero presente no gel é responsável pelo controle da liberação e pode ser favorecido pela presença do tensoativo, provavelmente devido à formação de micelas e, em maior proporção pelos lipossomas.

A liberação mais lenta dos ativos pelas formulações contendo lipossomas pode ser considerada uma vantagem porque a formulação atua como um sistema reservatório que mantém a liberação dos ativos na pele por mais tempo após a aplicação. Considerando que os efeitos do estresse oxidativo causado pela RUV na pele continuam mesmo após a exposição solar, principalmente devido à geração de EROs, a liberação sustentada pode prolongar o efeito protetor dos ativos. Premi e colaboradores (2015), por exemplo, verificaram que a geração de CPDs nos melanócitos permanece por mais de 3 horas após a exposição à radiação UVA, sendo que estas CPDs são gerados quando EROs e ERNs geradas pela UVA se combinam com elétrons excitados de fragmentos de melanina.

Após conhecer o perfil de liberação dos ativos, a seguinte etapa foi avaliar sua absorção cutânea. Em primeiro lugar, foram realizados estudos *in vitro* utilizando pele humana para determinar a permeabilidade dos ativos através do estrato córneo e a distribuição dos ativos nas diferentes camadas da pele. Em seguida, o método de *tape-stripping* diferencial em pele de orelhas de porco foi utilizado para avaliar a penetração transfolicular dos ativos. E, finalmente, foi realizado um estudo de penetração *in vivo* em camundongos sem pelo para garantir a presença dos compostos na pele durante os testes de eficácia.

4.8. Estudos *in vitro* de permeabilidade em epiderme humana

Os ensaios de permeabilidade foram realizados utilizando epiderme humana como membrana entre o compartimento doador e o compartimento receptor em células de difusão de Franz. As formulações géis foram colocadas no compartimento doador em contato com o estrato córneo de maneira não oclusiva. Para alcançar o compartimento receptor, os ativos necessitam passar pelas três etapas que envolvem a penetração cutânea discutidas anteriormente: liberação do veículo, penetração no estrato córneo e partição do estrato córneo para epiderme viável e derme.

O estrato córneo pode ser considerado a principal barreira limitante para a entrada de substâncias na pele. Devido a seu caráter lipofílico, substâncias hidrofílicas não penetram facilmente através do estrato córneo. Já as substâncias hidrofóbicas podem entrar mais facilmente no estrato córneo, mas permanecem retidas nele, já que a camada inferior tem caráter hidrofílico. Desta forma, o estrato córneo regula o fluxo de substâncias e água entre o ambiente e o organismo (BOLZINGER et al., 2012).

A absorção cutânea de uma substância é determinada, então, pelas suas características físico-químicas, principalmente pela massa molecular e a lipofilicidade. A penetração requer solubilidade tanto em óleo quanto em água com um $\log K_{O/A}$ ótimo (logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água). Substâncias que apresentam $\log K_{O/A}$ maior que 5 ou menor que -1 e massa molecular maior que 500 possuem baixa permeabilidade cutânea. Assim, a permeação do ácido clorogênico na pele não pode ser considerada eficiente, uma vez que este composto possui massa molecular de 354 e $\log K_{O/A} = -1$ (MARTI-MESTRES et al., 2007).

De fato, os resultados obtidos demonstraram que apenas a formulação gel contendo ácido clorogênico encapsulado nos lipossomas (Gel Lipo AC) foi capaz de permitir a passagem deste ativo através da membrana e sua quantificação na solução receptora, demonstrando assim que a presença dos lipossomas na formulação favorece a difusão do ácido clorogênico através da epiderme humana (figura 30).

Figura 30. Difusão do ácido clorogênico através de epiderme humana *in vitro*.

Os experimentos foram mantidos por no máximo 10 horas para evitar a degradação do composto no meio receptor. Nestas condições, o valor de fluxo (J) calculado foi de $1,03 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e o logaritmo do coeficiente de permeabilidade (log Kp) foi -3,21cm/h.

O fluxo é definido como a massa do ativo que passa através de uma unidade de área de pele por unidade de tempo no estado estacionário, ou seja, onde o perfil de absorção permanece constante. O coeficiente de permeabilidade representa a taxa de penetração na pele, e é calculado pela divisão do fluxo pela concentração de ativo aplicado. Estes valores são frequentemente utilizados para descrever a absorção na pele pela aplicação de doses infinitas. O valor de fluxo pode, por exemplo, ser utilizado para comparação semi-quantitativa de penetração em pele de diferentes espécies (OECD, 2004b). Estudo realizado por Marti-Mestres e colaboradores (2007), por exemplo, demonstrou que a permeação de ácido clorogênico (2%) em uma mistura de promotores de absorção (Transcutol® e propilenoglicol (1:1 p/p)) em pele de porco completa atingiu um fluxo de $0,48 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Diniz e colaboradores (2007) em seu estudo preditivo de valores de coeficiente de permeabilidade para vários polifenóis, encontrou o valor de log Kp de -5,16cm/h para o ácido clorogênico. Estes valores ressaltam a dificuldade de penetração do ácido clorogênico na pele e como sua incorporação nos lipossomas pode favorecer sua penetração.

Por outro lado, Bhattacharyya e colaboradores (2014) observaram uma rápida permeação de ácido clorogênico livre em gel de Carbopol® em pele completa de rato (100% em 5 horas), enquanto que o complexo ácido clorogênico-fosfolipídio em gel apresentou uma rápida liberação inicial, o que foi atribuída à rápida difusão da água para a pele e ao ácido clorogênico não encapsulado e presente na superfície da partículas, seguida por uma liberação sustentada por mais de 24 horas. Provavelmente a rápida permeação do ácido clorogênico na pele de rato pode ser atribuída às suas características estruturais que diferem da pele humana. Os lipídios e corneócitos da pele de roedores não são similares aos da pele humana e formam uma estrutura menos coesa (FARTASCH, 1996). Além disso, a densidade de folículos pilosos nos roedores é muito maior que nos humanos, favorecendo a penetração trans-folicular.

Nos experimentos realizados com as formulações contendo ácido clorogênico não encapsulado e ácido clorogênico não encapsulado com adição de Tween 20 (Gel AC e Gel AC+T) não foi possível detectar ácido clorogênico no meio receptor. Portanto, o aumento da permeabilidade do ativo pela formulação contendo lipossomas não pode ser atribuído ao efeito do tensoativo presente nos lipossomas e à possível formação de micelas.

Os estudos realizados com os géis contendo extrato não permitiram a detecção de compostos nas amostras coletadas do meio receptor durante as 10 horas de experimento. Estes resultados podem ser atribuídos a dois principais fatores: ausência de difusão através da epiderme ou limitações inerentes da metodologia, uma vez que os compostos se encontram em baixas concentrações no extrato e ao alcançarem os 12 mL de meio no compartimento receptor da célula de Franz se tornam ainda mais diluídos, podendo atingir concentrações nas amostras que estejam abaixo dos limites de detecção do método analítico. Portanto, a influência das formulações géis na penetração dos compostos do extrato na pele humana foi avaliada através dos estudos de distribuição apresentados a seguir, nos quais é possível obter amostras mais concentradas.

4.9. Estudos de distribuição dos ativos em pele humana *ex vivo*

Os estudos de distribuição dos ativos em pele humana foram realizados utilizando o modelo de Saarbrücken com modificações. A vantagem deste modelo

sobre o modelo tradicional de células de difusão de Franz é evitar a super hidratação da pele. Além disso, Wagner e colaboradores (2003) observaram mudanças no pH das camadas da pele em contato com o meio receptor em células de difusão de Franz, em apenas meia hora de incubação as camadas mais profundas da pele (epiderme viável e derme) já apresentavam mudanças significativas de pH em comparação ao seu valor original, e após 3 e 6 horas de experimento, o pH apresentado foi semelhante ao pH do meio receptor. Mudanças no pH da pele não foram identificadas quando o modelo de Saarbrücken foi utilizado.

Os dois testes *in vitro* produzem diferentes parâmetros para descrever o transporte de substâncias através da pele. O modelo de Saarbrücken permite determinar a concentração do ativo nas diferentes camadas da pele e uma quantidade total detectável após um determinado tempo de incubação. As células de Franz, por outro lado, oferecem a informação sobre a quantidade de ativo permeado através da pele em diferentes tempos (WAGNER et al., 2001).

No modelo de Saarbrücken, uma dose infinita de cada formulação foi aplicada de maneira oclusiva. Nestas condições, a penetração das vesículas elásticas intactas seria desfavorecida, porém, conforme discutido na introdução, as vesículas ainda poderiam atuar como promotores de absorção. Como o ácido clorogênico e a vicenina-2 são compostos hidrofílicos, este tipo de atuação das vesículas não seria um fator limitante para sua penetração na pele (ELSAYED et al., 2007).

A vicenina-2 foi utilizada como padrão para verificar a distribuição dos componentes do extrato nas camadas da pele por sua maior concentração no extrato e por sua maior estabilidade nas condições do ensaio. No entanto, devido às suas características físico-químicas, a penetração na pele da vicenina-2 é ainda menos favorecida que a do ácido clorogênico, pois possui massa molecular acima de 500 (594,52) e $\log K_{O/A}$ menor que -1 (-4,31) (DINIZ et al., 2007).

Nos estudos de distribuição dos compostos ativos na pele, foi observado que a formulação gel contendo o extrato encapsulado em lipossomas (Gel Lipo ELS) permitiu que maiores concentrações de vicenina-2 atravessassem o estrato córneo atingindo camadas mais profundas da pele, principalmente depois de 4 horas de incubação, enquanto que o gel com extrato não encapsulado adicionado de Tween 20 (Gel ELS+T), em 2 horas de incubação, concentrou a distribuição do ativo nas primeiras camadas do estrato córneo e, apenas após 4 horas de incubação, possibilitou a detecção de vicenina-2 nos cortes de pele (figuras 31 e 32).

Figura 31. Distribuição de vicenina-2 nas diversas camadas de pele humana *ex vivo* após 2 horas de incubação com as formulações géis contendo extrato.

Figura 32. Distribuição de vicenina-2 nas diversas camadas de pele humana *ex vivo* após 4 horas de incubação com as formulações géis contendo extrato.

O acúmulo do ativo no estrato córneo promovido pela formulação com Tween 20 adicionado pode ser atribuído ao efeito promotor de absorção deste tensoativo. Em meio aquoso, o tensoativo poderia formar grandes micelas que têm o potencial de extrair os lipídios da pele modificando a composição da membrana e favorecendo a penetração de moléculas hidrofílicas como a vicenina-2 (LÓPEZ et al., 2000), mas este efeito não foi suficiente para deposição de quantidades significativas de ativo nas camadas mais profundas da pele.

Comparando estes resultados com o perfil de liberação dos ativos, é possível observar que em 2 horas, há pouca diferença na quantidade de vicenina-2 liberada

pelas três formulações, o gel com extrato encapsulado liberou cerca de 20%, o gel adicionado de Tween 20 liberou, aproximadamente, 27% e o gel com extrato livre liberou, aproximadamente, 31%. No entanto, apesar de ter apresentado a menor quantidade de ativo liberado, a formulação contendo lipossomas foi a que permitiu maior acúmulo de vicenina-2 nas camadas mais profundas da pele. Na determinação do perfil de liberação, em 4 horas, a liberação de vicenina-2 pelo gel com extrato não encapsulado foi aproximadamente o dobro do gel contendo lipossoma, 65 e 32,5%, respectivamente, e o gel contendo Tween 20 liberou aproximadamente 52%. Em 4 horas de incubação na pele humana, a formulação gel contendo lipossomas com extrato proporcionou o maior acúmulo de vicenina-2 nas camadas mais profundas da pele, apesar da menor porcentagem de liberação deste ativo, evidenciando sua eficiência como sistema de liberação cutâneo para o extrato de *L. salicifolia*.

Apesar da pouca espessura, aproximadamente 15 μm , o estrato córneo é a principal barreira da pele e impede a penetração de substância de maneira eficaz (MENON, 2002). Uma vez atravessado o estrato córneo, considerando que a epiderme estratificada possui uma espessura entre 100 e 150 μm (MENON, 2002), e a derme entre 250 μm e 4000 μm (CEVC, 2004), a incorporação do extrato em lipossomas permitiu que, em 2 horas, a maior concentração de vicenina-2 fosse detectada na epiderme viável e em menor concentração na derme; e em 4 horas as maiores concentrações se encontravam na derme.

A formulação gel contendo ácido clorogênico encapsulado pelos lipossomas (Gel Lipo AC) foi capaz de aumentar as concentrações do ativo tanto no estrato córneo, como nas camadas mais profundas da pele em apenas 2 horas de incubação (figura 33). Por outro lado, em 4 horas de incubação, o gel com ácido clorogênico não encapsulado adicionado de Tween 20 (Gel AC+T), permitiu que o ativo atravessasse o estrato córneo em maior quantidade (figura 34). Ainda assim, a formulação com lipossomas (Gel Lipo AC) permitiu que o ácido clorogênico chegasse a camadas mais profundas da pele mesmo que, em 4 horas, a quantidade deste ativo liberado pelo gel contendo lipossomas fosse, aproximadamente, 25% menor que aquela liberada pelo gel com tensoativo adicionado.

Figura 33. Distribuição do ácido clorogênico nas diversas camadas de pele humana *ex vivo* após 2 horas de incubação com as formulações géis.

Figura 34. Distribuição do ácido clorogênico nas diversas camadas de pele humana *ex vivo* após 4 horas de incubação com as formulações géis.

Uma vez comprovada a eficiência das vesículas elásticas na distribuição dos ativos nas diferentes camadas da pele, a seguinte etapa foi avaliar a influência da penetração transfolicular no processo de penetração dos lipossomas na pele.

4.10. Avaliação da penetração transfolicular pelo método de *tape-stripping* diferencial

Recentemente, os folículos pilosos têm ganhado destaque como via alternativa para a absorção cutânea. Apesar de cobrir apenas uma pequena porcentagem da área total da pele, aproximadamente 0,1% (OTBERG et al., 2004), os folículos

pilosos contribuem significativamente para a absorção de pequenas moléculas, especialmente aquelas com log $K_{O/A}$ baixo e intermediário, e de micro- e nanopartículas (FRUM; ECCLESTON; MEIDAN, 2008; PATZELT et al., 2011), sendo que as nanopartículas penetram mais profundamente nos folículos que as soluções (LADEMANN et al., 2007). A ausência do estrato córneo nas partes mais profundas do folículo facilita a absorção de substâncias e, por isso, a penetração transfolicular tem sido investigada para imunização sem agulhas (MITTAL et al., 2013), liberação de macromoléculas (LIEB et al., 1997; TODO et al., 2010), filtros solares nanoparticulados (FILIPE et al., 2009) e aplicação de ativos associados a distúrbios dos folículos como alopecia (GELFUSO et al., 2013) e acne (THIBOUTOT, 2004).

A técnica de *tape-stripping* diferencial é empregada para quantificar a distribuição e a acumulação das substâncias nos folículos pilosos após sua aplicação tópica. Esta técnica consiste em, primeiramente, aplicar o procedimento de *tape-stripping* convencional para avaliar a deposição do analito sobre a superfície da pele e sua penetração no estrato córneo, e, em seguida, o conteúdo dos folículos pilosos é quantificado em um molde invertido dos folículos feito de cianoacrilato. Os estudos de *tape-stripping* diferencial podem ser realizados *in vitro* em pele de orelhas de porco ou *in vivo* em voluntários humanos (TEICHMANN et al., 2005). A utilização de pele humana *ex vivo* não é apropriada porque a pele se contrai instantaneamente quando retirada do corpo e a contração das fibras elásticas provoca o fechamento dos folículos pilosos. A pele da orelha de porco, por sua vez, permanece fixada na cartilagem durante o experimento, e assim, os folículos permanecem abertos (MAK et al., 2012).

A pele de orelha de porco é histologicamente comparável à pele humana e a estrutura dos folículos também é bastante similar. Em média, a pele da orelha de porco contém 20 folículos pilosos por cm^2 e o antebraço humano de 14 a 32 por cm^2 (OTBERG et al., 2004). Assim, a pele de orelha de porco é um modelo adequado para mimetizar o antebraço humano em número e tamanho de folículos pilosos. Raber e colaboradores (2014) constataram que o modelo em pele de orelha de porco previu corretamente o efeito encontrado em voluntários humanos. Frum; Eccleston e Meidan (2008) observaram que a absorção de diferentes solutos nos folículos pilosos da pele de porco foi quantitativamente equivalente a absorção nos folículos pilosos da pele humana.

Portanto, o método de *tape-stripping* diferencial foi utilizado em pele de orelha de porco para avaliar a influência da penetração transfolicular sobre a penetração cutânea dos ativos encapsulados em lipossomas.

Em primeiro lugar, a recuperação do método de extração foi avaliada por balanço de massas. A porcentagem total de recuperação representa a soma das quantidades de ativo encontradas em todo o experimento. Para isso, todas as partes do experimento que entraram em contato com a formulação (*stripes*, molde de cianoacrilato, dedeira utilizada para a massagem, algodão e restos de pele) foram submetidas ao processo de extração do ativo que foi posteriormente quantificado por CLAE.

A recomendação do Comitê Científico em Cosméticos e Produtos Não-alimentícios (SCCNFP) é que a recuperação no balanço de massa esteja entre $100 \pm 15\%$ (SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY, 2010). Desta forma, o método de extração utilizado foi validado uma vez que a recuperação total dos compostos está dentro dos limites recomendados.

Baixas concentrações de vicenina-2 foram encontradas na análise dos moldes de cianoacrilato (menos de 1% da dose aplicada), independentemente da formulação ou do tempo de incubação, sugerindo que os lipossomas não se acumulam nos folículos pilosos e que a penetração transfolicular pouco influi na difusão deste composto através da pele (figura 35).

As maiores concentrações de ativo foram encontradas distribuídas no estrato córneo. A formulação gel com extrato não encapsulado adicionada de Tween 20 (Gel ELS+T) foi a que proporcionou o maior acúmulo de vicenina-2 no estrato córneo, principalmente no período de incubação de 2 horas, resultado semelhante ao encontrado no estudo de distribuição dos ativos na pele humana com o mesmo tempo de incubação.

Por outro lado, a formulação gel contendo o extrato encapsulado em lipossomas (Gel Lipo ELS) foi a que permitiu que as maiores concentrações de vicenina-2 atravessassem o estrato córneo e chegassem à pele (epiderme+derme), principalmente no período de 2 horas de incubação. Estes resultados corroboram com os estudos em pele humana e demonstram que lipossomas desenvolvidos atuam rapidamente aumentando a penetração de substâncias na pele.

Figura 35. Porcentual da dose de Vicenina-2 recuperada por segmento de pele incubadas com as formulações contendo extrato por 2h (A), 4h (B) e 6h (C).

4.11. Estudos *in vivo*

A partir dos resultados positivos obtidos *in vitro* do potencial antioxidante e fotoquimiopreventivo do extrato e do ácido clorogênico, e da caracterização das formulações, os teste *in vivo* foram iniciados. Para garantir que os ativos se encontrem na epiderme e derme no momento da irradiação, primeiramente foi realizado um estudo de penetração cutânea *in vivo* no qual as formulações foram aplicadas de maneira não oclusiva no dorso dos animais e, em posse destes resultados, foi realizada a avaliação da eficácia do extrato e do ácido clorogênico contra os danos produzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelos.

4.11.1. Estudos de penetração cutânea *in vivo*

A penetração cutânea *in vivo*, utilizando o organismo do animal como um todo, possibilita a observação da influência de vários parâmetros na absorção de ativos, tais como o metabolismo cutâneo e a presença de circulação sanguínea, que tem grande influência no transporte de ativos até a derme (MOSER et al., 2001). A maioria das substâncias possui maior permeabilidade através da pele de roedores que da pele humana, e, portanto, esta abordagem não é adequada para estimar a absorção cutânea em humanos, mas fornece uma margem de segurança adicional (OECD, 2004b).

A avaliação da recuperação dos compostos da pele é importante para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de penetração *in vivo*. Como descrito por Röpke e colaboradores (2002), para realizar a recuperação em um estudo de retenção cutânea, a pele deve ser enriquecida com concentrações conhecidas do composto a ser analisado e sofrer o processo de extração. A recuperação de um método bioanalítico é realizada comparando-se a resposta de uma matriz contaminada e processada com uma amostra padrão pura que não sofreu um pré-tratamento. A recuperação é expressa em porcentagem de recuperação e indica se o método fornece uma resposta adequada para a quantidade de analito que está presente na amostra (BRASIL, 2003; CAUSON, 1997). A recuperação do processo de extração do ácido clorogênico isolado foi de, aproximadamente, 80%, e a recuperação do processo de extração do ácido clorogênico presente no extrato após a adição deste padrão foi de,

aproximadamente, 89%. Portanto, o processo proposto mostrou ser eficiente para extração dos componentes do extrato da pele.

Para que as formulações tópicas adicionadas de extrato vegetais e suas substâncias isoladas apresentem efeito fotoquimioprotetor é necessário que os compostos antioxidantes ultrapassem o estrato córneo e que fiquem retidos nas camadas mais inferiores da pele, onde ocorre a geração de EROs induzida pela radiação ultravioleta (BONINA et al., 1996; SAIJA et al., 2000).

A incorporação das dispersões de lipossomas nas formulações géis aumentou significativamente a penetração dos ativos na pele de camundongos sem pelos uma hora após a aplicação quando comparadas com as formulações géis com os ativos não encapsulados. A concentração de ácido clorogênico encontrados na epiderme e derme [E+D] tratada com o gel contendo ácido clorogênico não encapsulado foi de aproximadamente $0,75\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Concentração aproximadamente 2,5 vezes maior ($2\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi detectada quando a pele foi tratada com o gel contendo ácido clorogênico em lipossomas (figura 36). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com outros estudos que mostram que os lipossomas podem aumentar a biodisponibilidade de polifenóis (FANG et al., 2006; FANG; BHANDARI, 2010).

Figura 36. Perfis cromatográficos em 300nm das amostras de pele 1 hora após o tratamento e submetidas ao processo de *tape stripping*. (A) Tratamento com a formulação gel contendo ácido clorogênico não encapsulado. (B) Tratamento com a formulação gel contendo lipossomas com ácido clorogênico.

Com a aplicação da formulação gel contendo extrato não encapsulado nos animais, não foi possível detectar nenhuma quantidade dos componentes do extrato nas peles analisadas. No entanto, com a aplicação da formulação gel com o extrato incorporado nos lipossomas foram encontradas, na [E+D], diversos picos cromatográficos indicando que vários componentes do extrato penetraram na pele (figura 37). Os compostos majoritários puderam ser quantificados a partir das curvas

analíticas dos padrões. Foram dosados, aproximadamente, 3,8 e 0,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de vicenina-2 e ácido clorogênico, respectivamente, na [E+D] dos animais tratados com a formulação contendo lipossomas com extrato.

Figura 37. Perfis cromatográficos em 300nm das amostras de pele 1 hora após o tratamento e submetidas ao processo de *tape stripping*. (A) Tratamento com a formulação gel contendo extrato não encapsulado. (B) Tratamento com a formulação gel contendo lipossomas com extrato.

Assim como nos estudos *in vitro* em pele humana e pele de orelha de porco, a encapsulação dos ativos em lipossomas flexíveis levou a um aumento da penetração cutânea dos compostos do extrato e do ácido clorogênico isolado *in vivo*.

Van Den Bergh e colaboradores (1999) descreveram o efeito de vesículas elásticas no estrato córneo de camundongos sem pelos *in vivo*. Uma hora após a aplicação não oclusiva de vesículas elásticas foram observadas estruturas lamelares empilhadas (do inglês, *lamellar stacks*) dentro do espaço intercelular do estrato córneo. Estas estruturas redondas ou ovais possuíam bicamadas lipídicas perpendiculares às bicamadas da pele ou aleatoriamente distribuídas (figura 38), diferentemente das vesículas unilamelares que apresentam uma camada esférica. Os autores sugerem que ao se espremerem entre as bicamadas lipídicas do espaço intercelular, as vesículas poderiam achatar e fundir umas às outras formando as estruturas lamelares e rompendo, desta forma, a estrutura altamente organizada do estrato córneo. Não foram observadas mudanças intracelulares nos corneócitos e na epiderme viável.

O rompimento da estrutura altamente organizada do estrato córneo poderia explicar o aumento da penetração dos ativos encapsulados nos lipossomas.

Figura 38. Representação esquemática da interação *in vivo* entre vesículas elásticas e o estrato córneo da pele de camundongos sem pelos. C = corneócitos. ICL = lipídios intercelulares. LS = estruturas lamelares. Em destaque o espaço intercelular ampliado. Adaptado de VAN DEN BERGH et al., 1999.

Os ensaios de penetração *in vivo* são de grande importância a fim de garantirem a presença de compostos antioxidantes na epiderme+derme no momento da exposição à radiação. Sabendo que as formulações géis com lipossomas permitem a maior penetração dos ativos na pele dos camundongos, apenas estas formulações foram testadas nos ensaios de eficácia, reduzindo o número de animais utilizados no estudo. Assim, os animais foram tratados 1 hora antes do início da irradiação com as formulações contendo lipossoma sem ativos (placebo), ácido clorogênico encapsulado em lipossomas ou extrato encapsulado em lipossomas. As amostras de pele coletadas 6 horas após a irradiação foram analisadas quanto à atividade das metaloproteinases, à atividade da mieloperoxidase, aos níveis de GSH e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α).

4.11.2. Avaliação da eficácia *in vivo* contra os danos induzidos pela RUV

4.11.2.1. Análise da atividade das metaloproteinases

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 o fotoenvelhecimento da pele (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005). Fisher e

colaboradores (1997) verificaram a ação da radiação UV na expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) e comprovaram que baixas doses de radiação induziam fatores de transcrição de genes destas endopeptidases.

A radiação UVB induz a expressão de duas importantes MMPs, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B), as quais estão implicadas no fotoenvelhecimento e na fotocarcinogênese (INOMATA et al., 2003). Estas enzimas têm recebido grande atenção porque são super-expressadas em uma variedade de tumores malignos e sua expressão e atividade estão frequentemente associadas à agressividade do tumor e ao mau prognóstico (BAUVOIS, 2012). A super-expressão de MMP-2 e MMP-9 é observada nas células estromais que circundam as células epiteliais cancerosas no carcinoma baso-celular, o crescimento e a agressividade do carcinoma escamoso estão correlacionados à alta expressão destas gelatinases, e elas têm mostrado um papel crucial na progressão, invasão e metástase em melanoma (STANIFORTH et al., 2012).

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 e MMP-9 e nos permite verificar alterações na atividade destas enzimas na pele (SNOEK-VAN BEURDEN et al., 2005). 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 39, que mostra o gel de zimografia (A) e o gráfico obtido a partir do gel (B), evidencia o aumento da MMP-9 induzido pela UVB enquanto que a MMP-2 praticamente se manteve inalterada. O grupo irradiado e tratado com a formulação gel contendo o extrato encapsulado em lipossomas (IE), no entanto, não apresentou o aumento da expressão da MMP-9 como nos outros grupos irradiados, sugerindo a eficácia do extrato na formulação tópica desenvolvida.

Figura 39. Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina (A) e avaliação da eficácia *in vivo* pela medida da atividade da MMP-9 (B). CNI = grupo controle não irradiado, CI = grupo controle irradiado, NIP = grupo não irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, IP = grupo irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, NIAC = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, IAC = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, NIE = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas, IE = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A ativação enzimática também pode ser um reflexo da geração de EROs. O processo inflamatório iniciado pela geração de EROs promove a sinalização intracelular de MAPKs (JANSSENS; BEYAERT, 2003). Uma vez ativada, a via de sinalização das MAPKs leva ao aumento da expressão do fator de transcrição AP-1, o qual regula simultaneamente o aumento da expressão das MMP e a diminuição da produção de pró-colágeno I (LAHMANN et al., 2007; RITTIÉ; FISHER, 2002; VIOUX-

CHAGNOLEAU et al., 2006). Inicialmente, a MMP-1 cliva as moléculas tripla hélice do colágeno em fragmentos de 1/4 e 3/4 de comprimento e estes são então clivados em fragmentos menores pelas MMPs 3 e 9. A MMP-1 é a mais importante enzima responsável pela degradação do colágeno, sendo capaz de fragmentar o colágeno intacto em fragmentos 1/4 e 3/4 mais rapidamente do que as gelatinases são capazes de degradá-los. Esses fragmentos podem interagir com os fibroblastos e mudar seu fenótipo que é originalmente sintetizador (alta síntese de pró-colágeno e baixa expressão de MMP) para degradativo (baixa produção de pró-colágeno e altos níveis de MMP) (YUCEL et al., 2005). A diminuição da MMP-9 sugere também a diminuição da síntese de MMP-1.

O tratamento com a formulação gel contendo o extrato encapsulado em lipossomas pode ter inibido a síntese da MMP-9 ou a atividade da MMP-9 sintetizada. O sequestro de EROs, a inibição do processo inflamatório ou a inibição da MMP-9 pelos componentes do extrato encontrados na [E+D] podem ter causado este efeito. Os ésteres dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos clorogênicos) são potentes inibidores seletivos da MMP-9 enquanto que os flavonóides apresentam baixa atividade e seletividade na inibição desta enzima (WANG et al., 2012). Jin e colaboradores (2005) comprovaram *in vitro* que o ácido clorogênico é um potente inibidor de MMP-9. Lee e colaboradores (2012) observaram em um modelo de isquemia cerebral em ratos que o tratamento com ácido clorogênico levou à diminuição de RNA mensageiro e da expressão protéica da MMP-9 e MMP-2 de forma dose-dependente. Porém, o grupo irradiado e tratado com a formulação gel contendo ácido clorogênico em lipossomas (IAC), não demonstrou inibição da atividade da MMP-9, sugerindo que a concentração de ativo que alcançou a [E+D] no experimento de penetração *in vivo* pode não ter sido suficiente para promover uma inibição enzimática detectável.

Apesar dos resultados sugerirem o aumento da atividade das MMP-9 causada pela radiação UVB, não foi possível observar alterações no colágeno extraído das amostras de pele dos grupos irradiados e não irradiados (figura 40), o que pode ser atribuído ao tratamento agudo e não crônico.

Figura 40. Eletroforese das amostras de colágeno extraídas da pele. CP = Colágeno padrão, CNI = grupo controle não irradiado, CI = grupo controle irradiado, NIP = grupo não irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, IP = grupo irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, NIAC = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, IAC = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, NIE = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas, IE = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas.

4.11.2.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O estresse oxidativo gerado pela RUV é acompanhado pelo desencadeamento de desordens inflamatórias. O início e a manutenção da resposta inflamatória aguda estão associados à ativação e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) ao tecido injuriado. A enzima MPO é liberada pelos PMN estimulados no local da inflamação. A atividade da MPO, portanto, tem sido amplamente utilizada como uma enzima marcadora para medir e quantificar o conteúdo de PMN em vários tecidos. Sugere-se que o ensaio de MPO é um método simples e específico para quantificar PMN acumulados ou infiltrados em vários processos patológicos que acompanham a inflamação (ARNHOLD, 2004; XIA; ZWEIER, 1997). Casagrande e colaboradores (2006) verificaram que a radiação UVB induz um aumento dose-dependente na atividade de MPO na pele de camundongos sem pelos.

Neste estudo, a radiação UVB ($2,87\text{J}/\text{cm}^2$) conduziu um aumento de, aproximadamente, 50% na atividade de MPO comparado ao grupo controle não irradiado (CNI). Por outro lado, o grupo irradiado e tratado com a formulação gel contendo extrato em lipossomas (IE) apresentou uma redução de, aproximadamente, 20% da atividade de MPO comparado com o grupo irradiado e

não tratado (CI), enquanto que o grupo irradiado e tratado com a formulação gel contendo ácido clorogênico em lipossomas (IAC) apresentou uma redução na atividade da MPO de apenas 10% (Figura 41A). Tais resultados indicam que a mistura complexa de compostos presentes no extrato foi capaz de inibir o processo inflamatório induzido pela RUV com maior eficácia que a substância isolada.

Os neutrófilos estimulados podem expressar uma variedade de citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β (KWON; JUNG; YANG, 2013), assim, a diminuição da MPO e a diminuição das citocinas causadas nos grupos tratados com os ativos podem estar intimamente relacionadas. Os neutrófilos recrutados para o local da inflamação também são capazes de aumentar os níveis de MMPs. Os grânulos dos neutrófilos contêm grandes quantidades de MMP-9. Além disso, as serina proteases liberadas por essas células podem ativar a pro-MMP-2, levando a um aumento de MMP-2 ativa (HEISSIG et al., 2010). Assim, a diminuição da MPO no grupo irradiado e tratado com o extrato pode também ter favorecido a diminuição da MMP-9 observada.

4.11.2.3. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Conforme discutido anteriormente, a glutathiona na sua forma reduzida (GSH) é uma das mais importantes defesas antioxidantes contra EROS, pois além de atuar como cofator para a enzima glutathiona peroxidase, a 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. O monitoramento dos níveis de GSH pode ser utilizado para avaliar o efeito preventivo de antioxidantes exógenos na instalação do estresse oxidativo na pele (CARINI et al., 2000), uma vez que a depleção da GSH pode ser considerada um dos primeiros sinais da instalação do estresse oxidativo epidermal causado pela RUV (MELONI; NICOLAY, 2003).

No presente estudo foi observado que a radiação UVB (2,87 J/cm²) causou uma depleção nos níveis de GSH de, aproximadamente, 26,5% quando comparado ao grupo controle não irradiado (CNI) (Figura 41B). A aplicação tópica dos géis contendo lipossomas com extrato (IE) ou com ácido clorogênico (IAC) foi capaz de inibir a depleção dos níveis de GSH induzida pela UVB em aproximadamente 100%, restaurando os níveis normais deste antioxidante endógeno.

O sistema de enzimas antioxidantes funciona cooperativamente. Qualquer mudança em uma das enzimas do sistema pode afetar o estado de equilíbrio das EROs. Assim, se as EROs permanecem no sistema biológico sem serem eliminadas, elas podem causar dano celular e alterações bioquímicas, como oxidação de proteínas e lipídios, inflamação, danos ao DNA, ativação e inativação de enzimas (SHINDO; WITT; PACKER, 1993; SHINDO et al., 1994). Portanto, a eficácia do tratamento com as formulações adicionadas de extrato de *L. salicifolia* e ácido clorogênico na prevenção da depleção de GSH induzida pela radiação UVB é uma forte indicação da proteção contra os fotodanos induzidos pela RUV.

Figura 41. Avaliação da eficácia *in vivo* pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) (A) e pela recuperação dos níveis de GSH (B). CNI = grupo controle não irradiado, CI = grupo controle irradiado, NIP = grupo não irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, IP = grupo irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, NIAC = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, IAC = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, NIE = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas, IE = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ DP. * $<0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.11.2.4. Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α

A RUV induz mudanças no perfil das citocinas na epiderme que envolve tanto citocinas pró-inflamatórias quanto citocinas anti-inflamatórias de diferentes tipos de células (DUTHIE; KIMBER; NORVAL, 1999). Na inflamação induzida por excesso de EROs, o fator nuclear-kappa β (NF- $\kappa\beta$) desempenha um papel crucial, pois está relacionado a diferentes genes promotores, os quais codificam fator de

necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 e IL-6), e diversas moléculas de adesão, permitindo, assim, sua transcrição (CAMPANINI et al., 2013).

A IL-1 é uma citocina constitutivamente produzida e retida nos queratinócitos e de fundamental importância na fase aguda da resposta inflamatória e na regulação da hematopoese. Além disso, algumas das mais relevantes funções da IL-1 em relação aos efeitos tardios da exposição à radiação são a estimulação da proliferação de queratinócitos e fibroblastos, a indução de MMP e a síntese de colágeno (MÜLLER; MEINEKE, 2007).

A IL-6 é uma citocina pluripotente que é a maior mediadora da resposta inflamatória aguda. A IL-6 compartilha diversas funções biológicas com a IL-1, incluindo a febre e a produção de proteínas da fase aguda. Além dos efeitos pró-inflamatórios, a IL-6 exerce efeitos anti-inflamatórios. Enquanto a IL-1 e o TNF- α induzem a síntese de IL-6, a IL-6 inibe a síntese de IL-1 e TNF- α . A fonte mais importante de IL-6 são as células fagocíticas mononucleares, mas a IL-6 também é produzida por outras células, entre elas queratinócitos e fibroblastos (MÜLLER; MEINEKE, 2007).

O TNF- α é a chave de sinalização das citocinas, o qual, quando liberado dos queratinócitos irradiados, estimula a migração de células de Lagerhans para os linfonodos, bem como libera outras moléculas que interferem na funcionalidade destas células (SKIBA; NEILL; PIVA, 2005). A produção de TNF- α nos queratinócitos é estimulada pela IL-1 e pelas EROs. IL-1 e TNF- α auto-induzem sua produção nos queratinócitos e estimulam a produção de IL-6 e IL-8, trabalhando sempre sinergicamente (POQUET; CLIFFORD; WILLIAMSON, 2008). Assim, a inibição destas citocinas é considerada como primeira opção na prevenção da inflamação, particularmente, a inibição do TNF- α , já que esta é uma das primeiras respostas da pele à radiação, o que se mostra uma ferramenta extremamente útil quando se está buscando substâncias de origem vegetal com atividade fotoquimiopreventiva (CHOI et al., 2010).

A radiação UVB aumentou, aproximadamente, 38, 62 e 20% os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , respectivamente, nos animais irradiados e não tratados (CI) em relação ao grupo não irradiado e não tratado (CNI). Por outro lado, o pré-tratamento dos animais irradiados com a formulação gel contendo lipossomas com extrato (IE) foi capaz de diminuir, aproximadamente, 75, 61 e 70% os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , respectivamente, em relação aos animais irradiados e não tratados (CI). A

queda nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α também foi observada nos animais irradiados e tratados com a formulação gel contendo lipossomas com ácido clorogênico (IAC), 61, 32 e 40%, respectivamente (figura 42). Assim como nos outros experimentos *in vivo* a eficácia do gel contendo extrato foi maior que a do gel que continha apenas o ácido clorogênico isolado, reafirmando o potencial do extrato devido a sua mistura complexa de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias que parecem ser capazes de inibir a geração de EROs e os eventos inflamatórios decorrentes da radiação UVB.

Figura 42. Avaliação da eficácia anti-inflamatória *in vivo* pela quantificação das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C). CNI = grupo controle não irradiado, CI = grupo controle irradiado, NIP = grupo não irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, IP = grupo irradiado e tratado com a formulação com lipossomas sem ativo, NIAC = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, IAC = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo ácido clorogênico em lipossomas, NIE = grupo não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas, IE = grupo irradiado e tratado com a formulação contendo extrato em lipossomas. Os resultados representam a média de 5 animais por grupo $\pm$ DP. * $<0,01$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A inibição de IL-1 β e TNF- α pode estar ligada à inibição da atividade da MPO, uma vez que a IL-1 β é quimiotático pra neutrófilos, o que indica que a inibição da produção de IL-1 β pode levar a redução do recrutamento de neutrófilos e, portanto, a redução da atividade da MPO (CAMPANINI et al., 2013), assim como o TNF- α é um potente ativador de neutrófilos mediando sua degranulação, quimiotaxia e o *burst* oxidativo (MÜLLER; MEINEKE, 2007). Além disso, a inibição da expressão da MMP-9 no grupo tratado com a formulação contendo extrato também pode estar intimamente relacionada com a redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β , uma vez que a

expressão da MMP-9 na epiderme, após a irradiação, estimula a expressão destas citocinas inflamatórias (CHOI et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos, o sistema lipossomal desenvolvido parecer ser uma maneira eficiente de liberar os ativos do extrato de *L. salicifolia* nas camadas mais profundas da pele e sua utilização tópica pode evitar os danos induzidos pela radiação ultravioleta.

5. *Conclusões*

Diante dos resultados obtidos, as principais conclusões foram:

- O extrato *Lychnophora salicifolia* Mart. apresenta pronunciada atividade antioxidante de forma dose-dependente.
- O extrato é fotoestável e pode ser considerado não fototóxico em baixas doses de radiação UVA e UVB.
- O extrato e o ácido clorogênico apresentaram baixa citotoxicidade frente às células L929.
- O pré-tratamento com extrato ou com ácido clorogênico foi capaz de reduzir as espécies reativas de oxigênio intracelular induzidas pela adição de H₂O₂ e pela exposição à radiação UVA, e diminuir a liberação de LDH para o meio extracelular causadas pela radiação UVA nas células L929. O extrato também foi eficiente em impedir a depleção do GSH causada pela UVA nas células.
- A incorporação do extrato e do ácido clorogênico em lipossomas foi bem sucedida, sendo que estes apresentaram estabilidade físico-química por um longo período de tempo, podendo ser incorporados em géis para aplicação tópica.
- As formulações géis desenvolvidas com os lipossomas foram capazes de liberarem os ativos mais lentamente que as formulações que não continham lipossomas. Além disso, os ativos incorporados em lipossomas atingiram as camadas mais profundas da pele de maneira mais eficiente que quando não incorporados e, a rota transfolicular parece não influenciar nesta penetração.
- As formulações géis contendo lipossomas também permitiram a penetração *in vivo* dos componentes do extrato e do ácido clorogênico isolado na pele de camundongos sem pelos.
- A aplicação tópica *in vivo* da formulação gel contendo extrato encapsulado em lipossomas foi capaz de reduzir a ativação/secreção de MMP-9, diminuir a atividade

da MPO, impedir a depleção de GSH e diminuir os níveis das interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , provavelmente devido à capacidade dos compostos presentes no extrato de sequestrarem os radicais livres e inibirem os efeitos inflamatórios decorrentes da exposição à UVB na pele de camundongos sem pelos, sendo mais eficiente que o ácido clorogênico.

Ainda existem poucos estudos na literatura sobre a incorporação de extratos vegetais em lipossomas e seus efeitos biológicos. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho contribuem significativamente para o futuro desenvolvimento de sistemas de liberação cutânea de extratos vegetais e sua aplicabilidade como fotoquimiopreventivos.

6. *Referências*

AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, p. 144–151, 2011.

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 153–173, 2005.

AGRAWAL, R.; KAUR, I. P. Inhibitory effect of encapsulated curcumin on ultraviolet-induced photoaging in mice. **Rejuvenation research**, v. 13, n. 4, p. 397–410, 2010.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, 2010.

ALI, M. F. M. Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal Rose Bengal. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 2, p. 267–275, 2011.

AMBOTHI, K.; PRASAD, N. R.; BALUPILLAI, A. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 72–78, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta: 2015.

AMIĆ, D. et al. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. **Current medicinal chemistry**, v. 14, p. 827–845, 2007.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Association of Official Analytical Chemists, 2005.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 4–9, 2004.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, p. 9–20, 2003.

ATROOZ, O. M. The incorporation effects of methanolic extracts of some plant seeds on the stability of phosphatidylcholine liposomes. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1643-1648, 2007.

AUTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BACHELOR, M. A.; BOWDEN, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 2, p. 131–138, 2004.

BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of cell science**, v. 115, n.

Pt 19, p. 3719–27, 2002.

BALUPILLAI, A. et al. Caffeic Acid Inhibits UVB-induced Inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated Receptor- γ in mouse skin. **Photochemistry and Photobiology**, n. 17, p. 1458–1468, 2015.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101–114, 2001.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012.

BHATTACHARYYA, S. et al. Chlorogenic acid-phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 293–298, 2014.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 157–177, 2001.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BOLZINGER, M.-A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BONINA, F. et al. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, n. 1-2, p. 87–94, 1996.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in vitro**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 1988.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1-36, 2003.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 12, p. 2080–2095, 2006.

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, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of

neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of investigative dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141–8, 2008.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, v. 1, Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília: ANVISA, 2003.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 30, de 1 de junho de 2012. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2012.

BRAVO, L.. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BRENNAN, M. et al. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 78, n. 1, p. 43–8, 2003.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BROPHY, M. R.; DEASY, P. B. Application of the Higuchi model for drug release from dispersed matrices to particles of general shape. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 37, n. 1-2, p. 41–47, 1987.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302–10, 1978.

BUENO, T. et al. Experimental and Modelling Study of Enzymatic Oxidation of 5-o-Caffeoylquinic Acid by Polyphenol Oxidases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 548–553, 2010.

CADDEO, C. et al. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 183–191, 2008.

CAI, Y.-Z. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872–2888, 2006.

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P.; CALABRESE, V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. **Human & experimental toxicology**, v. 29, n. 12, p. 980–1015, 2010.

- CAMPANINI, M. Z. et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153–160, 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, 2000.
- CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006.
- CASTANGIA, I. et al. Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 657–663, 2015.
- CATALÁ, A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 3, p. 318–23, 2010.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model”. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 101–9, 2012.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 689, n. 1, p. 175–180, 1997.
- CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 675–711, 2004.
- CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1104, n. 1, p. 226–232, 1992.
- CEVC, G.; SCHÄTZLEIN, A.; RICHARDSEN, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1564, n. 1, p. 21–30, 2002.
- CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277–299, 2010.
- CHA, J. W. et al. The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 136–142, 2014.
- CHANG, Q. et al. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 426–430, 2006.

- CHEN, J. H.; HO, C.-T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2374–2378, 1997.
- CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013–1024, 2012.
- CHENG, J. C. et al. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 132–139, 2007.
- CHIRUMBOLO, S. Hormesis, resveratrol and plant-derived polyphenols: some comments. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 12, p. 2027–2030, 2011.
- CHOI, H. K. et al. Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 291–296, 2010.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature , occurrence , dietary burden , absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1043, p. 1033–1043, 2000.
- COILE, N. C.; JONES, S. B. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus Endemic to the Brazilian Planalto. **Brittonia**, v. 33, n. 4, p. 528, out. 1981.
- D'ERRICO, M. et al. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 614, n. 1-2, p. 37–47, 2007.
- DASU, M. R. . et al. Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. **Burns**, v. 29, n. 6, p. 527–531, 2003.
- DAWIDOWICZ, A. L.; TYPEK, R. Thermal stability of 5-o-caffeoylquinic acid in aqueous solutions at different heating conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12578–12584, 2010.
- DAWIDOWICZ, A. L.; TYPEK, R. The influence of pH on the thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acids in aqueous solutions. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 2, p. 223–232, 2011.
- DB-ALM. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay DB-ALM Protocol n° 78. **ECVAM DB-ALM: Protocols**, p. 1–19, 2008.
- DEMACQ, C. et al. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. **Clinica Chimica Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 72–76, 2008.
- DI MAMBRO, V. M.; BORIN, M. F.; FONSECA, M. J. V. Topical formulations with superoxide dismutase: Influence of formulation composition on physical stability and

enzymatic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 1, p. 97–105, 2003.

DINIZ, A. et al. Permeability profile estimation of flavonoids and other phenolic compounds by biopartitioning micellar capillary chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8372–8379, 2007.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: Versatility of effects and mechanisms. **Planta Medica**, v. 74, n. 13, p. 1548–1559, 2008.

DUTHIE, M. S.; KIMBER, I.; NORVAL, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. **The British journal of dermatology**, v. 140, n. 6, p. 995–1009, 1999.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203–222, 2008.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 415–429, 2006.

ELSAYED, M. M. A et al. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 1–16, 2007.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56–72, 2003.

FANG, J. Y. et al. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1-2, p. 131–138, 2006.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FARTASCH, M. The nature of the epidermal barrier: structural aspects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 3, p. 273–282, 1996.

FERRAZ FILHA, Z. S. et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 79–82, 2006.

FIANDER, H.; SCHNEIDER, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. **Cancer Lett**, v. 156, n. 2, p. 117–124, 2000.

- 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, p. 65–73, 2014.
- FILIPE, P. et al. Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 5, p. 266–275, 2009.
- FISHER, G. J. et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v. 379, n. 6563, p. 335–9, 1996.
- FISHER, G. J. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 20, p. 1419–28, 1997.
- FISHER, G. J. et al. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 2, p. 219–26, 2001.
- 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, 2010.
- FRUM, Y.; ECCLESTON, G. M.; MEIDAN, V. M. In-vitro permeation of drugs into porcine hair follicles: is it quantitatively equivalent to permeation into human hair follicles? **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 145–51, 2008.
- FU, Y. C. et al. Ultraviolet Radiation and Reactive Oxygen Generation As Inducers of Keratinocyte Apoptosis: Protective Role of Tea Polyphenols. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 61, n. 3, p. 177–188, 2000.
- FU, Y. C.; JIN, X. P.; WEI, S. M. The effects on cell growth of tea polyphenols acting as a strong anti-peroxidant and an inhibitor of apoptosis in primary cultured rat skin cells. **Biomedical and environmental sciences**, v. 13, n. 3, p. 170–9, 2000.
- GASPAR, L. R. et al. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 418–425, 2012.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 35–44, 2003.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 123–8, 2006.
- GAUGLITZ, G. G. et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. **Molecular medicine**, v. 17, n. 1-2, p. 113–25, 2011.

GELFUSO, G. M. et al. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1488–1494, 2013.

GHANBARZADEH, S.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 25–29, 2013.

GILLET, A.; EVRARD, B.; PIEL, G. Liposomes and parameters affecting their skin penetration behaviour. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 35–42, 2011.

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

GOBBO-NETO, L. et al. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Di- C -glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 3–6, 2005.

GODIC, A. et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2-3, p. 45–80, 2005.

GONZALEZ, H. et al. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. **BMC dermatology**, v. 7, 2007.

GREGORIS, E. et al. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1-2, p. 97–101, 2011.

GRIT, M.; CROMMELIN, D. J. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. **Chemistry and physics of lipids**, v. 64, n. 1-3, p. 3–18, 1993.

GUPTA, P. N. et al. Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant HIV-1 envelope protein CN54gp140. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 315–322, 2012.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 107–120, 2005.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1205–1212, 2006.

HEISSIG, B. et al. Role of neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 in tissue

regeneration. **Histology and histopathology**, v. 25, n. 6, p. 765–70, 2010.

HEMA, G. S. et al. A simple method for isolation of fish skin collagen- biochemical characterization of skin collagen extracted from Albacore Tuna (*Thunnus Alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon Sorrakowah*), and Rohu (*Labeo Rohita*). **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 271–278, 2013.

HENRY, B.; FOTI, C.; ALSANTE, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 96, n. 1, p. 57–62, 2009.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1456–1462, 2000.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HOFLAND, H. E. J. et al. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. **British Journal of Dermatology**, v. 132, n. 6, p. 853–866, 2010.

HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 27–38, 2011.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013a.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265 – 273, 2013b.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; BOUWSTRA, J. A. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: A suggested mechanism of action. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 145–156, 2003.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; BOUWSTRA, J. A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 1, p. 67–74, 2005.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 5, p. 902–910, 2004.

HRUZA, L. L.; PENTLAND, A. P. Mechanisms of UV-induced inflammation. **The**

Journal of investigative dermatology, v. 100, n. 1, p. 35S–41S, 1993.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

ICHIHASHI, M. et al. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 21–39, 2003.

İNAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, n. 1-2, p. 75–80, 2001.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: 2015.

INOMATA, S. et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 120, n. 1, p. 128–34, 2003.

JAIN, A. K. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates nitrogen mustard-induced skin injuries. **Toxicology**, v. 320, p. 25–33, 2014.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) Family Members. **Molecular Cell**, v. 11, n. 2, p. 293–302, 2003.

JENSEN, L. B.; PETERSSON, K.; NIELSEN, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 68–75, 2011.

JIN, U. H. et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, v. 362, n. 1-2, p. 57–64, 2005.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16–29, 2015.

KANG-ROTONDO, C. H. et al. Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity. **The American journal of physiology**, v. 264, n. 2 Pt 1, p. C396–401, 1993.

KELES, L. C. et al. Lychonophorinae (Asteraceae): A survey of ITS chemical constituents and biological activities. **Química nova**, v. 33, n. 10, p. 2245–2260, 2010.

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, 2005.

KIM, H.; QUON, M. J.; KIM, J. Redox Biology New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, p. 187-195, 2014.

KITAGAWA, S. et al. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 59, n. 6, p. 793–796, 2011.

KORKINA, L. G. et al. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 8, p. 710–729, 2008.

KRISTL, J. et al. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 2, p. 253–259, 2009.

KUMAR, A.; PATHAK, K.; BALI, V. Ultra-adaptable nanovesicular systems: A carrier for systemic delivery of therapeutic agents. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 21-22, p. 1233–1241, 2012.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325–1334, 2010.

KWON, O. S.; JUNG, S. H.; YANG, B. S. Topical administration of manuka oil prevents UV-B irradiation-induced cutaneous photoaging in mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

LADEMANN, J. et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.

LADEMANN, J. et al. Hair follicles - An efficient storage and penetration pathway for topically applied substances: Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 3, p. 150–155, 2008.

LADEMANN, J. et al. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. **Journal of biomedical optics**, v. 14, n. 2, p. 021014, 2013.

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, 2007.

LANG, J. K.; VIGO-PELFREY, C. Quality control of liposomal lipids with special emphasis on peroxidation of phospholipids and cholesterol. **Chemistry and physics**

of lipids, v. 64, n. 1-3, p. 19–29, 1993.

LARSSON, P. et al. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. **Experimental dermatology**, v. 14, n. 2, p. 117–23, 2005.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 88–98, 2009.

LEE, K. et al. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. **European journal of pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 89–95, 15 ago. 2012.

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, n. 5, p. 563–569, 2002.

LIEB, L. M. et al. Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin in vitro. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 9, p. 1022–9, 1997.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–49, 2013.

LÓPEZ, A. et al. Comparative enhancer effects of Span[®]20 with Tween[®] 20 and Azone[®] on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, n. 1-2, p. 133–140, 2000.

LOZANO, M. C.; CÓRDOBA, D.; CÓRDOBA, M. **Manual de tecnología farmacéutica**. Barcelona: Elsevier, 2012.

MAK, W. C. et al. Triggering of drug release of particles in hair follicles. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 509–514, 2012.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A.; YANISHLIEVA, N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1498–1502, 2009.

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, 2005.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, n. 1-2, p. 40–48, 2007.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370–1376, 2009.

MARRASSINI, C. et al. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *urtica circularis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1503–1507, 2011.

MARTI-MESTRES, G. et al. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 139–144, 2007.

MARTINS, R. M. et al. The effect of homogenization method on the properties of carbamazepine microparticles prepared by spray congealing. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 7, p. 692–700, 2013.

MASELLA, R. et al. Nutrient-Gene Interactions Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione-Related Enzymes. **The Journal of Nutrition**, v. December 2003, p. 785–791, 2004.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.

MATSUI, T.; AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **International Immunology**, v. 27, n. 6, p. 269–280, 2015.

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

MATTSON, M. P. Dietary factors, hormesis and health. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 43–8, 2008a.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2008b.

MATTSON, M. P.; CHENG, A. Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 11, p. 632–9, 2006.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1745–1750, 2000.

MELERO, A et al. Nortriptyline hydrochloride skin absorption: development of a transdermal patch. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 588–596, 2008.

MELERO, A et al. Nortriptyline for smoking cessation: release and human skin diffusion from patches. **International journal of pharmaceutics**, v. 378, n. 1-2, p. 101–7, 2009.

MELO, K. C.; DANTAS, T. N. C.; NETO, E. L. B. Influência Da Temperatura Na

Reologia De Fluidos De Perfuração Preparados Com Carboximetilcelulose, Goma Xantana E Bentonita. **Holos**, v. 5, n. 29, p. 3–18, 2013.

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

MENON, G. K. New insights into skin structure: Scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., 2002.

MIGNET, N.; SEGUIN, J.; CHABOT, G. G. Bioavailability of polyphenol liposomes: A challenge ahead. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 457–471, 2013.

MITTAL, A. et al. Non-invasive delivery of nanoparticles to hair follicles: A perspective for transcutaneous immunization. **Vaccine**, v. 31, n. 34, p. 3442–3451, 2013.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103–112, 2001.

MOURTAS, S. et al. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 2, p. 212–221, 2007.

MOURTAS, S. et al. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, n. 2, p. 611–619, 2008a.

MOURTAS, S. et al. Integrity of liposomes in presence of various formulation excipients, when dispersed in aqueous media and in hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 270–276, 2008b.

MUKHERJEE, P. K.; MAITYA, N.; NEMAA, N. K.; SARKAR, B. K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v. 19, p. 64–73, 2011.

MÜLLER, K.; MEINEKE, V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 96–104, 2007.

MURAKAMI, A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 557, p. 3-10, 2014.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 24 fev. 2000.

NAGAPRASHANTHA, L. D. et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 9, p. 1100–1109, 2011.

NAKAMURA, Y. et al. A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose-and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1899–907, 2000.

NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; OHIGASHI, H. A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 9, p. 967–978, 2001.

NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1–2, 2011.

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

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 668–676, 2005.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

OECD. **Guideline for Testing of Chemical - In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test**, 2004a.

OECD. **Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies**, v. 2, n. 28, p. 1–31, 2004b.

OH, S. M.; KIM, Y. P.; CHUNG, K. H. Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 5, p. 354–362, 2006.

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, 1979.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012.

OTBERG, N. et al. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **The Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 1, p. 14–19, 2004.

OU-YANG, H. et al. High-SPF sunscreens (SPF ≥ 70) may provide ultraviolet protection above minimal recommended levels by adequately compensating for lower sunscreen user application amounts. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 6, p. 1220–1227, 2012.

ÖZYÜREK, M. et al. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics

and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, n. 1, p. 42–50, 2009.

PATZELT, A. et al. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 45–48, 2011.

PAVELIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N.; SCHUBERT, R. Liposomal gels for vaginal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, n. 1-2, p. 139–149, 2001.

PETERSEN, A. B. et al. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 59, p. 123–131, 2000.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995–2018, 1998.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation induced matrix degradation--a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, n. 1, p. 17–34, 2005.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1–19, 2003.

PODDA, M. et al. UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 55–65, 1998.

POLTE, T.; TYRRELL, R. M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced Matrix Metalloproteinase-1 expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1566–1574, 2004.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 196–204, 2008.

PREMI, S. et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, v. 347, n. 6224, p. 842–7, 2015.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013.

- RÖPKE, C. D. et al. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 109–116, 2002.
- RABER, A. S. et al. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. **Journal of Controlled Release**, v. 179, n. 1, p. 25–32, 2014.
- RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **European journal of pharmacology**, v. 545, n. 1, p. 51–64, 2006.
- RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 23–34, 2014.
- RIJKEN, F. et al. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 5, n. 2, p. 184–9, 2006.
- RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 4, p. 705–720, 2002.
- RODRIGUES, T. et al. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 136–42, 2002.
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.
- RUBIO, D. et al. Analytica Chimica Acta A new HPLC-DAD-MS / MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart . (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28–36, 2012.
- SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 1, p. 39–47, 2000.
- SATO, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 136–138, 2011.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. **Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients**, v. SCCS/1358, n. June, p. 1–14, 2010.
- SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2058–2070, 2006.
- SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 147–170, 2010.

SHINDO, Y. et al. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 102, n. 4, p. 470–5, 1994.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **The Journal of investigative dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260–5, 1993.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011.

SIERENS, J. et al. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 485, n. 2, p. 169–176, 2001.

SIK, C. A photochemical study of cells loaded with 2',7'-dichlorofluorescein: implications for the detection of reactive oxygen species generated during UVA irradiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 8, p. 1029–1034, 2003.

SIMON, M. F. et al. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20359–64, 2009.

SIVAMANI, R. K.; GHIYA, M.; MAIBACH, H. I. Shedding Light on Sunscreens and Their Labels. Testing Policies Need to Match Actual Use. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 38, n. 6, p. 679–681, 2010.

SKIBA, B.; NEILL, B.; PIVA, T. J. Gene expression profiles of TNF-alpha, TACE, furin, IL-1beta and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 21, n. 4, p. 173–182, 2005.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A M. et al. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

SOHAL, R. S.; ORR, W. C. The redox stress hypothesis of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 539–555, 2012.

STANIFORTH, V. et al. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 443–51, maio 2012.

STARK, B.; PABST, G.; PRASSL, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 41, n. 3-4, p. 546–55, 2010.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 463–516, 2001.

SUN, J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. **Journal of signal transduction**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

TATSUMI, H.; TSUCHIYA, Y.; SAKAMOTO, K. Sensitive electrochemical measurement of hydroxyl radical generation induced by the xanthine–xanthine oxidase system. **Analytical Biochemistry**, v. 467, n. 0, p. 22–27, 2014.

TEICHMANN, A. et al. Differential stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 2, p. 264–269, 2005.

THIBOUTOT, D. Regulation of Human Sebaceous Glands. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 1–12, 2004.

TODO, H. et al. Permeation Pathway of Macromolecules and Nanospheres through Skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1394–1399, 2010.

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.

TUNDIS, R. et al. Potential role of natural compounds against skin aging. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 1515–38, 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN DEN BERGH, B. A. . et al. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 3, p. 367–379, 1999.

VAN LAETHEM, A. et al. The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 8, p. 1547–1553, 2005.

VARGAS, A. J.; BURD, R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 7, p.

418–428, 2010.

VICENTINI, F. T. M. C. et al. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 948–957, 2008.

VIEIRA, R. F. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**, v. 569, p.61-68, 2002.

VILELA, F. M. P. et al. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 387–392, 2012.

VIOUX-CHAGNOLEAU, C. et al. Reconstructed human skin: From photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, n. 1, p. S1–S12, 2006.

WAGNER, H. et al. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 283–295, 2001.

WAGNER, H. pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 57–65, 2003.

WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612–616, 1999.

WANG, L. et al. Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 13, p. 4164–71, 2012.

WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 525–530, 2011.

WARIDEL, P. et al. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29–41, 2001.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 369–376, 2005.

WILGUS, T. A et al. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. **Molecular carcinogenesis**, v.

38, n. 2, p. 49–58, 2003.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 128–137, 2012.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Solar UV Index. A practical Guide**. Geneva: 2002.

WOSICKA, H.; CAL, K. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 2, p. 83–89, 2010.

XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. **Analytical biochemistry**, v. 245, n. 1, p. 93–6, 1997.

XU, J. G.; HU, Q. P.; LIU, Y. Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11625–11630, 2012.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science, Supplement**, v. 2 SUPPL., n. 1, p. 1–8, 2005.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27–32, 1995.

YUCEL, T. et al. Matrix metalloproteinase expression in basal cell carcinoma: relationship between enzyme profile and collagen fragmentation pattern. **Experimental and molecular pathology**, v. 79, n. 2, p. 151–60, 2005.

YUTANI, R. et al. Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose laurate. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 62, n. 3, p. 274–80, 2014.

ZILLICH, O. V. et al. Antioxidant activity, lipophilicity and extractability of polyphenols from pig skin - development of analytical methods for skin permeation studies. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 11, p. 1444–1451, 2013.

ZUCKER, S. et al. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Current topics in developmental biology**, v. 54, p. 1–74, 2003.