UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica

Ana Luiza Scarano Aguillera Forte

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica

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

Orientada: Ana Luiza Scarano Aguillera Forte
Orientadora: Profª Drª Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto
2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Forte, Ana Luiza Scarano Aguillera
Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica
86 p.: Il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientadora: Profª Drª Maria José Vieira Fonseca

1. Atividade antioxidante. 2. *Eugenia biflora*. 3. *Eugenia protenta*.
4. Fotoquimioproteção. 5. *Miconia minutiflora*. 6. *Protium heptaphyllum*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Luiza Scarano Aguillera Forte

Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica

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

Orientadora: Profª Drª Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À Profª Drª Maria José Vieira Fonseca, pela orientação e amizade. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada!

À Profª Drª Maria da Graça Bichara Zoghbi e ao seu grupo de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi, por disponibilizarem os extratos vegetais utilizados neste estudo.

Às professoras da Facultad de Farmacia da Universidad Complutense de Madrid. À Drª Irene Iglesias Peinado, pela oportunidade de realizar o estágio de pesquisa no exterior. À Drª Juana Benedí González, por ter me recebido tão carinhosamente em seu laboratório, por todo o ensinamento e apoio para superar as dificuldades durante o período de estágio. À Drª Sagrario Martín Aragón e à Drª Paloma Bermejo Bescos, pelos ensinamentos e auxílio nos experimentos. ¡Muchas Gracias!

Aos queridos amigos do nosso grupo de pesquisa, Ana Cláudia, Bruna, Daniele, Fernanda, Lívia, Marília, Mariana, Mirela, Rebeca, Ricardo, Silvia, Sônia e Vanessa, por todos os momentos que vivemos juntos, discussões científicas, apoio nos experimentos e amizade.

Aos queridos "compis" de Madri, Adriana, Andrea, Karim, Laura, MariÂngeles, Miguel, Patricia e Raul, pelo conhecimento, auxílio nos experimentos e momentos de descontração que muito me ensinaram e tornaram minha vida no exterior mais produtiva e agradável.

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

Às ex-alunas do nosso grupo de pesquisa, Yris, Fabiana e Franciane, pela amizade e por todos os ensinamentos passados.

Aos professores Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dr. Carlos Curti e Drª Yara Maria Lucisano Valim, às funcionárias Ana Cristina Morseli Polizello e Ana Elisa Azzolini, e aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica da FCFRP, por estarem sempre com as portas abertas para ajudar e ensinar, e por disponibilizarem equipamentos que foram essenciais para realização deste trabalho.

À Profª Drª Andréia Machado Leopoldino e a técnica Cristiana Garcia pela disponibilização e auxílio na utilização de equipamentos.

Aos funcionários do biotério da FCFRP 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 da Seção 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 mestrado (2009/13539-0), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente (MCT/MMA/PPBIO), pelo suporte financeiro.

À minha família, que eu tanto amo, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo. A eles devo toda minha formação, pela qual serei eternamente grata.

Ao Leonardo, por todo amor, companheirismo, incentivo e dedicação. Muito obrigada por estar presente nesta etapa tão importante da minha vida!

Aos meus queridos amigos da turma 01, por estarem sempre presentes nos momentos de alegria e também nos momentos de dificuldade. Vocês são muito especiais!

Agradeço a Deus, pelas oportunidades, por me proteger e iluminar durante a execução desse trabalho e por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

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

A sabedoria da natureza é tal que não produz nada de supérfluo ou inútil.

(Nicolau Copérnico)

RESUMO

FORTE, A. L. S. A. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. 2012. 86 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A pele atua como barreira entre o meio externo e o organismo. Mesmo possuindo um grande número de mecanismos de defesa antioxidante, certas situações como a exposição prolongada à radiação ultravioleta (RUV), são capazes de romper o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo, provocando um grande aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A administração tópica de antioxidantes é um eficiente modo para enriquecer o sistema protetor cutâneo endógeno, e assim uma estratégia de sucesso para reduzir os danos oxidativos causados à pele pela RUV. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os extratos vegetais de *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum*, e *Miconia minutiflora* quanto as suas propriedades antioxidantes, bem como sua citotoxicidade, e verificar a eficácia do extrato de *Protium heptaphyllum* como agente fotoquimioprotetor *in vivo*. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por diferentes métodos *in vitro* que simulam a formação de EROs e os valores foram expressos como a concentração de extrato necessária para promover 50% da ação antioxidante (IC_{50}). Todos os extratos estudados tiveram valores de IC_{50} baixo, o que representa um grande potencial antioxidante. Além disso, o extrato de *Protium heptaphyllum* apresentou baixa citotoxicidade em concentrações antioxidantes e quando irradiado parece ser menos citotóxico. Assim, a eficácia fotoquimioprotetora deste extrato incorporado a uma formulação tópica foi avaliada por meio de estudos *in vivo* em camundongos sem pelos expostos à RUV. O extrato incorporado em uma formulação gel, capaz de disponibilizar seus ativos antioxidantes na pele dos animais, mostrou ser capaz de recuperar os níveis de GSH e a atividade da SOD reduzidos pela RUV. Por outro lado, não houve inibição da atividade das mieloperoxidases. Estes resultados indicam que o extrato apresenta potencial como agente fotoquimioprotetor.

Palavras-Chave: Atividade antioxidante, *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, Fotoquimioproteção, *Miconia minutiflora, Protium heptaphyllum*.

ABSTRACT

FORTE, A. L. S. A. **Evaluation of photochemoprotective potencial of *Protium heptaphyllum* Amazon plant extract added in gel formulation for topical application.** 2012. 86 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The human skin acts as barrier between the environment and the organism. It presents a large number of antioxidant defense mechanisms, however, in some situations, such as in prolonged exposure under ultraviolet radiation (UVR), it is possible to break the pro-oxidant/antioxidant equilibrium in organism, causing an increase of reactive oxygen species (ROS). Topic administration of antioxidants is an efficient way to enhance cutaneous defense system, and a strategy to reduce oxidative damages caused by UVR in the skin. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant properties and the citotoxicity of *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum* and *Miconia minutiflora* plant extracts, and to test the *in vivo* photochemoprotective efficiency of *Protium heptaphyllum* plant extract. The antioxidant activity of plant extracts was evaluated by several *in vitro* methods that simulated ROS generation and the results were expressed such as the extract concentration necessary to promote 50% of the antioxidant action (IC_{50}). All the studied plant extracts presented low IC_{50} values, showing a great antioxidant potential. Moreover, *Protium heptaphyllum* extract presented reduced citotoxicity in antioxidant concentrations and the exposure under UVR seems to decrease its citotoxicity. So, the photochemoprotective effectiveness of this extract into a topical formulation was evaluated by *in vivo* tests using hairless mice exposed under UVR. Gel formulation with *Protium heptaphyllum* extract proved to be able to provide antioxidant compounds to skin and to recover GSH levels and SOD activity reduced by UVR. On the other hand, there was no inhibition of myeloperoxidases activity. These results indicate that this extract presents potential as photochemoprotective agent.

Keywords: Antioxidant activity, *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Miconia minutiflora*, Photochemoprotection, *Protium heptaphyllum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB. 22

Figura 2. Relação entre a inibição da peroxidação lipídica e inibição do complexo Fe-BPS pela concentração de extrato (µg/mL). 30

Figura 3. Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase.....31

Figura 4. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol sem e com pré-incubação dos extratos com a enzima XOD. ..32

Figura 5. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/luminol/HRP sem e com pré-incubação dos extratos com a enzima HRP 34

Figura 6. Viabilidade de células L929 tratadas com os extratos irradiados e não irradiados.....38

Figura 7. Cultura de células L929 tratadas com extrato de *Protium heptaphyllum* não irradiado e irradiado 39

Figura 8. Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* pela recuperação dos níveis de GSH depletados pela RUV..46

Figura 9. Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO). 48

Figura 10. Medida da atividade da SOD na pele de camundongos sem pelos 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da coleta das espécies vegetais e da preparação dos extratos utilizados no estudo.....12

Tabela 2. Composição das formulações.....18

Tabela 3. Valores de IC_{50} obtidos nos diferentes ensaios de atividade antioxidante pelos extratos.....27

Tabela 4. Teor de polifenóis e flavonóides totais encontrado nos extratos.....35

Tabela 5. Medida do pH das formulações armazenadas a 4ºC.....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µgEAG/mg	µg de equivalente de ácido gálico por miligrama
µL	Microlitro
µM	Micromolar
$^1O_2$	Oxigênio singlete
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BPS	Batofenantrolina
C+	Controle positivo
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	Desvio padrão
DPPH – H	1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DPR	Desvio padrão relativo
E+D	Epiderme viável + derme
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAG/mg	Equivalente de ácido gálico por miligrama
EC	Estrato córneo
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EP	Extrato de *Protium heptaphyllum*
EPM	Média do erro padrão
EQ	Equivalente de quercetina
EQ/mg	Equivalente de quercetina por miligrama
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Fe	Ferro
Fe-BPS	Complexo Ferro-Batofenantrolina
g	Gramas
G	Gravidade
GPx	Glutationa peroxidases
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Rd	Glutationa-redutase
GSSG	Glutationa oxidada

h(s)	Hora(s)
$H^{\bullet}$	Hidrogênio radicalar
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HClO	Ácido hipocloroso
HRP	Horseradish peroxidase
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil-amônio
IC_{50}	Concentração que inibe 50%
IL-1	Interleucina-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
J/cm^2	Joules por centímetro quadrado
K_2HPO_4	Fosfato monobásico de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato dibásico de potássio
M	Molar
MAP quinases	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases da matriz
MMP-1	Colagenase 1 ou colagenase intersticial
MMP-3	Estromelisina-1

MMP-9	Gelatinase-B
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi
MPO	Mieloperoxidase
mUN/mL	Miliunidade por mililitro
mW/cm^2	Miliwatts por centímetro quadrado
N_2	Nitrogênio
Na_2CO_3	Carbonato de Sódio
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
O/A	Óleo em água
O_2	Oxigênio
$O_2^{\bullet -}$	Radical superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxila
OPT	O-ftalaldeído
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PA	Pará
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogênio

PLA2	Atividades da fosfolipase A2
PMNs	Polimorfonucleares
PVC	Policloreto de vinila
RNA	Ácido ribonucleico
$RO^{\bullet}$	Alcoxila
$ROO^{\bullet}$	Peroxila
ROOH	Hidroperóxidos
rpm	Rotações por minuto
RUV	Radiação ultravioleta
SBF	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutases
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
UN/mg	Unidade por miligrama
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Volume/volume
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

RESUMO ..... **I**

ABSTRACT ..... **II**

LISTA DE FIGURAS ..... **III**

LISTA DE TABELAS ..... **IV**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **V**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1. A radiação ultravioleta e os danos causados à pele 3

1.2. Extratos vegetais 7

2. OBJETIVOS **9**

2.1. Objetivo geral 10

2.2. Objetivos específicos 10

3. MATERIAL E MÉTODOS **11**

3.1. Obtenção dos extratos 12

3.2. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos *in vitro* 12

3.2.1. Medida da atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radial $DPPH^{\bullet}$ 13

3.2.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica 13

3.2.3. Determinação da atividade quelante do íon ferro utilizando a batofenantrolina 14

3.2.4. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol 15

3.2.5. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/HRP/luminol 15

3.3. Caracterização química dos extratos 16

3.3.1. Determinação do teor de polifenóis 16

3.3.2. Determinação do teor de flavonóides 16

3.4. Avaliação da citotoxicidade dos extratos 17

3.4.1. Linhagem celular e cultivo 17

3.4.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro 17

3.5. Desenvolvimento das formulações de uso tópico 18

3.5.1. Preparo das formulações 18

3.5.2. Caracterização físico-química das formulações 19

3.5.2.1. Características organolépticas 19

3.5.2.2. Teste de centrifugação 19

3.5.2.3. Determinação de pH 20

3.5.2.4. Avaliação da atividade antioxidante das formulações 20

3.6. Estudo de penetração e retenção cutânea *in vivo* 20

3.7. Avaliação da eficácia *in vivo* contra os danos induzidos pela RUV 21

3.7.1. Irradiação dos camundongos sem pelos 21

3.7.2. Quantificação do antioxidante endógeno GSH 23

3.7.3. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase 24

3.7.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo* 24

3.8. Análise estatística dos resultados 25

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 26

4.1. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos *in vitro* 27

4.1.1. Medida da atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radical $DPPH^{\bullet}$ 27

4.1.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica 28

4.1.3. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol 31

4.1.4. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/HRP/luminol 32

4.2. Caracterização química dos extratos 34

4.2.1. Determinação do teor de polifenóis 34

4.2.2. Determinação do teor de flavonóides totais 35

4.3. Avaliação da citotoxicidade dos extratos 36

4.4. Desenvolvimento de formulações de uso tópico 40

4.4.1. Caracterização físico-química das formulações 41

4.4.1.1. Características organolépticas 41

4.4.1.2. Teste de centrifugação.....41

4.4.1.3. Determinação do pH 41

4.4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante das formulações.....42

4.5. Estudo de penetração e retenção cutânea *in vivo* 43

4.6. Avaliação da eficácia *in vivo* contra os danos induzidos pela RUV 44

4.6.1. Quantificação do antioxidante endógeno GSH 45

4.6.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase 47

4.6.3. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo*.....50

5. CONCLUSÕES 53

6. REFERÊNCIAS 56

1. Introdução

Nos últimos anos, evidências têm indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento cutâneo e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares e disfunções cerebrais.

A molécula de oxigênio no seu estado fundamental (O_2) contém dois elétrons não pareados, o que favorece sua redução e a formação de produtos intermediários denominados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (DARR; FRIDOVICH, 1994). As EROs podem reagir com as moléculas orgânicas provocando a perda da integridade celular, da funcionalidade enzimática e da estabilidade genômica (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos *in vivo* agem por inibição da geração de EROs ou diretamente pelo sequestro de radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Contudo, em condições pró-oxidantes a concentração desses radicais pode aumentar resultando no desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes. A indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Poucos tecidos estão sujeitos a um estresse oxidativo tão elevado quanto a pele (MELONI; NICOLAY, 2003), sendo a radiação ultravioleta (RUV) a maior promotora de EROs e o principal fator ambiental causador de câncer (PEUS et al., 2001)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o câncer de pele não melanoma é o câncer mais comum no mundo e sua incidência continua a aumentar. Tem-se observado também um expressivo crescimento na incidência de tumores do tipo melanoma em populações caucasianas. Com o objetivo de reduzir os efeitos carcinogênicos e foto danos da radiação solar, recomenda-se o uso de bloqueadores solares contendo filtros ultravioleta.

No entanto, o aumento do uso de bloqueadores solares tem coincidido com o aumento do câncer de pele (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007). Estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostram que quando os filtros solares químicos penetram nas camadas nucleadas da pele, o nível de EROs aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob radiação ultravioleta. Além disso, trabalhos na literatura já demonstraram que os filtros solares sofrem processos de degradação induzidos pela radiação UV, o que leva a uma redução na capacidade de proteção da pele e também a geração de espécies potencialmente tóxicas (SCALIA; MEZZENA, 2010).

Fotoquimioprevenção é o termo que define o uso de agentes capazes de prevenir ou combater os efeitos adversos da RUV na pele (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003). Antioxidantes, principalmente de origem vegetal, têm recebido considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos para uso humano. Alguns trabalhos já demonstram a eficácia de extratos vegetais e substâncias isoladas de plantas, a qual tem sido atribuída à sua capacidade antioxidante e/ou antiinflamatória (KATIYAR; AFAQ; MUKHTAR, 2001; VAYALIL; ELMETS; KATIYAR, 2003; CASAGRANDE et al., 2006; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Portanto, considerando a estreita relação entre a exposição solar e o aumento do estresse oxidativo na pele, aliada ao fato de que estudos epidemiológicos demonstram que o uso de protetores solares não é completamente efetivo na prevenção do câncer de pele induzido pela exposição à RUV, o uso de antioxidantes surge como alternativa para fotoproteção e prevenção do câncer de pele e outras patologias cutâneas (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

1.1. A radiação ultravioleta e os danos causados à pele

A radiação ultravioleta emitida pelo sol dividi-se em: UVC (200 – 280nm), UVB (280 – 320nm) e UVA (320 – 400nm). A radiação UVC, de maior energia e consequentemente a mais danosa biologicamente, é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e, assim, seu papel nas patogenias humanas causadas pela exposição à radiação solar é mínimo (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). As radiações UVB e UVA diferem quanto aos seus sítios de ação na geração de lesões. 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, sendo que o seu principal modo de ação se dá pela geração de EROs (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

A energia proveniente da RUV é absorvida pelos cromóforos celulares, como DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos, e convertida em energia química. Esses cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs, dentre os quais destacam-se os radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$), superóxido ($O2^{\bullet-}$), peroxila e alcoxila ($RO2^{\bullet}$ e $RO^{\bullet}$), o oxigênio singlete ($^1O_2$) e

os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (ROOH) (GUARANTINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; XU; FISHER, 2005).

As EROs podem reagir com as moléculas orgânicas, como proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e carboidratos, provocando a perda da integridade celular, da funcionalidade enzimática e da estabilidade genômica (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Dentre as moléculas orgânicas, os lipídios são, provavelmente, as mais susceptíveis a serem atacadas pelas EROs (INAL; KANBAK; SUNAL, 2001), pois as membranas biológicas contém consideráveis quantidades de lipídios altamente insaturados e são banhadas por fluidos ricos em oxigênio e metal (BUEGE; AUST, 1978).

A peroxidação lipídica pode conduzir a uma desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios que atuam sinergicamente a um 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; PENATLAND, 1993; KANGROTONDO 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 luz UV e de células inflamatórias, pode prontamente induzir o passo de sinalização intracelular de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases) (JANSSENS; BEYAERT, 2003). As MAP quinases 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 et al., 2005).

A via de sinalização das MAP quinases leva a indução de membros chave 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., 2001; VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Sob condições fisiológicas normais, as MMPs ativadas são controladas por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) 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; FISHER et al., 1997), durante a inflamação, a cicatrização de feridas e câncer no estágio de progressão (STEENVOORDEN et al., 2001; ZUCKER et al., 2003).

A ativação enzimática pode ser um reflexo da geração de EROs, porque oxidantes são potentes ativadores de MMP. Este episódio talvez seja a maior causa dos danos observados no fotoenvelhecimento. No entanto, a contribuição individual de cada uma dessas enzimas na destruição do tecido conectivo pela exposição à RUV, ainda não é precisamente conhecida. 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 (estromelisina-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).

A radiação também aumenta os níveis de mieloperoxidase (MPO), uma enzima peróxido de hidrogênio oxidorredutase especificamente encontrada em leucócitos granulocíticos, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, basófilos e eosinófilos que contribui para a atividade bactericida dessas células (TRUSH, 1994). 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 $O2^{\bullet -}$ e H_2O_2, que atuam como desencadeantes da formação de outros radicais mais potentes. A geração desses radicais é dependente da presença de mieloperoxidase que, juntamente com o peróxido de hidrogênio, forma halógenos oxidados, como o ácido hipocloroso (HClO), efetivos contra microrganismos e células tumorais (FREIRE; QUELUZ, 1995).

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 glutationa (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, catalase e glutationa peroxidase. Superóxido dismutases (SOD) removem $O_2^{\cdot-}$ acelerando sua conversão à H_2O_2. Catalases (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 glutationa peroxidases (GPx) (ARUOMA, 2003). A GPx catalisa a redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da glutationa reduzida (GSH) a sua forma oxidada (GSSG). A recuperação da GSH é feita pela enzima Glutationa-redutase (GSH-Rd), uma etapa essencial para manter o sistema de proteção celular íntegro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

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 microrganismos. Porém, a presença em altas concentrações e/ou a remoção inadequada dessas EROs podem levar à disfunções metabólicas e danos às macromoléculas biológicas (MATÉS; SÁNCHES-JIMÉNEZ, 1999). A exposição à radiação UV causa depleção do sistema antioxidante endógenos fazendo com que os efeitos deletérios não sejam completamente prevenidos, resultando em danos oxidativos ao DNA.

A redução das defesas antioxidantes da pele devido à exposição à radiação UV já foi relatada por diversos pesquisadores. Shindo e colaboradores (1993) demonstraram que, após a irradiação de camundongos sem pelos com dose de RUV corresponde a dez vezes a dose eritematosa mínima (25J/cm^2), as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase sofreram um grande decréscimo na derme e epiderme. Os antioxidantes α-tocoferol, 9-ubiquinol, 9-ubiquinona, ácido ascórbico, ácido dihidroascórbico e GSH também sofreram decréscimo de 26-93%. Pence e Naylor (1990) verificaram que a atividade da enzima superóxido dismutase

sofreu um decréscimo significante após 12 horas de uma única exposição de camundongos sem pelos à radiação UVB e manteve-se suprimida por mais de 72 horas após essa exposição.

Antioxidantes endógenos estão presentes em maior concentração na epiderme que na derme de camundongos sem pêlo e a exposição dos animais a um simulador solar causa a diminuição dos antioxidantes mais drasticamente na epiderme que na derme (SHINDO et al., 1994). Portanto, a epiderme pode ser considerada a primeira linha de defesa da pele contra danos oxidativos causados por EROS. Baseado nestas evidências, o monitoramento dos níveis de antioxidantes endógenos pode ser utilizado como um índice precoce do estresse oxidativo na pele e a sua proteção pode ser uma estratégia na prevenção de danos (CASAGRANDE, 2005).

1.2. Extratos vegetais

As florestas tropicais constituem um dos biomas mais ricos e, provavelmente, possuem mais da metade do número de espécies na Terra (CALDERON et al., 2009). Estima-se que no Brasil estão localizadas 50% das espécies vegetais do mundo, porém, esta biodiversidade não é totalmente conhecida devido a sua complexidade (SILVA; RYLANDS; FONSECA, 2005). 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 inestimável.

Atualmente, 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, dentre as quais destacam-se os compostos fenólicos (DI MAMBRO; FONSECA, 2005). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, as 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).

Na literatura, há poucos estudos relacionados há identificação fitoquímica das espécies *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta* e *Miconia minutiflora*. O gênero *Eugenia* é bastante rico em compostos fenólicos, por isso as espécies deste gênero apresentam atividade antioxidante (EINBOND et al., 2004).

Rodrigues (2007) observou, em uma espécie do gênero *Miconia*, a presença de flavonóides, bem como, terpenos e triterpenos que podem estar associados com a elevada atividade antimicrobiana apresentada pelas espécies deste gênero.

Araújo (2011) estudando os extratos metanólicos de *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta* e *Miconia minutiflora* encontrou a presença alcalóides, terpenos, triterpenos, esteróides e flavonóides, embora a identificação destes compostos não tenha sido realizada.

Quanto à espécie *Protium heptaphyllum*, a maioria dos estudos reporta a composição fitoquímica da resina obtida do tronco e dos óleos essenciais obtidos da resina e das folhas, constituídos principalmente de monoterpenos e triterpenos, em especial α e β-amirina (ZOGHBI; MAIA; LUZ, 1995; SUSUNAGA, 2001; BANDEIRA et al., 2001; BANDEIRA et al., 2002; CITÓ et al., 2006; MARQUES et al., 2010). Com relação a esses compostos, vários estudos demonstram suas atividades biológicas, entre elas: anti-pruriginosa (OLIVEIRA et al., 2004a), gastroprotetora (OLIVEIRA et al., 2004b), hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2005a), analgésica (OLIVEIRA et al., 2005b), sedativa, ansiolítica, antidepressiva (ARAGÃO et al., 2006) e anti-inflamatória (HOLANDA PINTO et al., 2008). Segundo Rüdiger, Siani e Veiga Júnior (2007) outros compostos como ácido p-cumárico, escopoletina, fraxetina e quercetina, foram encontrados no caule desta espécie, os quais podem conferir atividade antioxidante ao extrato em estudo.

Considerando tais informações, é de fundamental importância 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, já que estas espécies são utilizadas pela população de maneira empírica. Além disso, a busca por substâncias antioxidantes que tenham efeito quimiopreventivo 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 investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Miconia minutiflora e Protium heptaphyllum*, bem como avaliar o potencial fotoquimioprotetor *in vivo* do extrato de *Protium heptaphyllum*, incorporado em formulação tópica, utilizando camundongos sem pêlos irradiados com ultravioleta.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial sequestrador de radicais livres dos extratos empregando diferentes métodos *in vitro*.
- Caracterizar quimicamente os extratos.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos em cultivos celulares.
- Preparar formulações creme, gel e gel-creme adicionadas do extrato de *Protium heptaphyllum*.
- Determinar as características físico-químicas das formulações e verificar a atividade antioxidante destas.
- Avaliar a capacidade das formulações em permitir a penetração e retenção dos componentes do extrato na pele de camundongos sem pelos.
- Investigar o potencial fotoquimioprotetor *in vivo* do extrato através da eficiência na proteção dos níveis do antioxidante endógenos GHS e da atividade da enzima superóxido dismutase e, da eficácia anti-inflamatória na pele de camundongos sem pelos expostos à UVB.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção dos extratos

Os extratos utilizados neste estudo foram cedidos pela Drª Maria da Graça Bichara Zoghbi do Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG (Belém/PA).

A coleta das amostras botânicas foi realizada de forma aleatória. Não foram coletadas amostras de espécies ameaçadas de extinção, troncos ou raízes. A Tabela 1 apresenta a lista das espécies, data, local e município das coletas, coordenadas, número de registro no Herbário MG, parte da planta utilizada no preparo dos extratos, solvente utilizado e rendimento do extrato.

Tabela 1. Dados da coleta das espécies vegetais e da preparação dos extratos utilizados no estudo.

Espécie	Data da coleta	Local de coleta	Município	Coordenadas	Registro	Parte da planta	Solvente	Rendimento
Eugenia biflora	Fev/07	Comunidade Vila da Penha	Maracanã/PA	S 00º39´00´´ W 47º28´29´´	188.763	Folha	MeOH	11,3%
Eugenia protenta	Set/08	Mata do Jari	Santarém Novo/PA	S 00º54´50´´ W 47º23´57´´	178.395	Folha	MeOH	14,92%
Miconia minutiflora	Jul/08	Campus do MPEG	Belém/PA	S 01º29´18´´ W 48º42´02´´	*	Folha	MeOH	10,91%
Protium heptaphyllum	Set/07	Restinga da Praia Marieta	Maracanã/PA	S 00º35´50´´ W 47º26´35´´	190.011	Caule fino	MeOH	12,70%

* Identificação por comparação com a excicata MG 31.137

Os extratos foram preparados no MPEG a partir das partes secas das plantas. As amostras foram secas, em salas equipadas com ar-condicionado e desumidificador até completar 7 dias a partir da data de coleta, moídas em moinho de facas e maceradas a frio durante 48h com metanol numa proporção massa/solvente de 1:4. Em seguida, foram filtradas e novamente maceradas por mais 48h e, as soluções extrativas evaporadas em evaporador rotativo. As amostras de *Eugenia protenta* e *Miconia minutiflora* foram secas em estufa a 40ºC por 48h antes da maceração.

3.2. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos *in vitro*

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por diferentes métodos que simulam a formação de EROs. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição versus a concentração de extrato no meio reacional, sendo a porcentagem de inibição determinada pela equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{Amostra} \times 100}{\text{Controle Positivo}} \quad (1)$$

Onde: **Amostra** = Absorbância da amostra, nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra nos métodos quimioluminescentes, e **Controle Positivo (C+)** = Absorbância do C+ nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do C+ nos métodos quimioluminescentes.

Desta forma foi possível obter uma curva dose-resposta, assim como estimar a concentração de extrato que inibe o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) utilizando uma curva hiperbólica. A determinação do IC_{50} é um parâmetro muito utilizado para medir a atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000), sendo que quanto menor o IC_{50}, maior será a atividade antioxidante.

3.2.1. Medida da atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radial $DPPH^{\bullet}$

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pela diminuição da absorbância da solução alcoólica do radical $DPPH^{\bullet}$ (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 álcool etílico (95%), 50µL de amostra e 500µL de solução alcoólica de $DPPH^{\bullet}$ (200µM). O controle positivo não continha amostra e o branco foi constituído de 1mL de tampão acetato 0,1M pH 5,5 e 1,5mL de etanol. Depois de 10 minutos a leitura foi realizada a 517nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. A variação da absorbância, proporcionada pelas amostras de extratos, foi comparada à absorbância do controle positivo (apenas $DPPH^{\bullet}$), que corresponde à absorbância máxima (100%).

3.2.2. 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 et al., 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 teste, suspensão de mitocôndria (1mg de proteína) e 10µL sulfato ferrosos amoniacal (50mM). A reação foi incubada a 37ºC por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1%) (TBA) preparado em NaOH (50mM), 100µL NaOH (10M) e 500µL de H_3PO_4 (20%) foram adicionados, seguido por incubação de 20 minutos a 85ºC (OHKAWA et al., 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 3000rpm por 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 535nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001 (BUEGE; AUST, 1978). Concomitantemente, foram feitos o branco (ausência de mitocôndrias), o controle positivo (ausência de amostra), o controle do solvente (álcool etílico PA, ausência dos extratos) e o controle negativo (ausência de ferro). As mitocôndrias utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP – USP).

3.2.3. Determinação da atividade quelante do íon ferro utilizando a batofenantrolina

Para determinação da atividade quelante do íon ferro foi utilizado batofenantrolina (BPS), um forte quelante do íon ferro que forma um complexo colorido quando ligado a este íon.

Em 2mL de meio reacional contendo sacarose (125mM), KCl (65mM) e Tris – HCl (10mM) pH 7,4, foram adicionados 10µL de sulfato ferroso amoniacal (10mM) e 20µL de amostra teste. A reação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 10µL de BPS (40mM) incubando novamente por 15 minutos. O branco da reação foi constituído de meio reacional e BPS, e o controle positivo não continha apenas a amostra. A quelação do íon ferro pelo extrato foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 530nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001 (BOLANN; ULVIK, 1987).

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

A medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol foi realizada pelo método descrito por Girotti e colaboradores (2000).

Em tubos próprios para luminômetro, foram pipetados 400µL de solução preparada acrescentando EDTA (1mM) ao tampão glicina (0,1M) pH 9,4. Então, foram adicionados 150µL de xantina (6mM), 10µL de amostra teste e 10µL da solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 100µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20mUN/mL) mantida resfriada no gelo. A medida da quimioluminescência foi realizada em lumiômetro Autolumat LB953 durante 5 minutos a 25ºC. Durante o período de análise, o luminômetro realiza a contagem de fótons emitidos pelas amostras e fornece um gráfico da quantidade de fótons (y) pelo tempo em minutos (x). A porcentagem de inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida da área sob a curva (ASC) obtida neste gráfico, como descrito no item 3.2.

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

3.2.5. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/HRP/luminol

Para a medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada pelo sistema H_2O_2/HRP/luminol foi utilizado o método descrito por Krol e colaboradores (1984).

Em tubos próprios para luminômetro, foram adicionados 380µL de tampão KH_2PO_4 (0,1M) pH 7,4, 10µL da amostra teste, 100µL de H_2O_2 (concentração final: $5x10^{-5}$M) e 10µL de solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 500µL de solução recém preparada de horseradish peroxidase (HRP) (0,2UI/mL) mantida resfriada em gelo. A leitura foi realizada em luminômetro Autolumat LB953

durante 10 minutos a 25ºC. A porcentagem de inibição da quimioluminescência também foi calculada pela medida da ASC, como descrito no item 3.2.

Da mesma forma que no item 3.2.4, foi realizado um experimento modificado incubando enzima e extrato por 15 minutos antes de ser adicionada ao meio reacional.

3.3. Caracterização química dos extratos

3.3.1. Determinação do teor de polifenóis

O teor de polifenóis totais dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau, e ácido gálico como padrão de referência para a construção da curva de calibração.

Foram adicionados a 500µL da amostra ou solução de ácido gálico, 500µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500µL da solução de Na_2CO_3 (10%). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 760nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de amostra foi substituída pela mesma quantidade de água deionizada. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato (KUMAZAWA et al., 2004).

3.3.2. Determinação do teor de flavonóides

Para determinação do teor de flavonóides totais dos extratos, a quercetina foi empregada como padrão de referência para a construção da curva de calibração. Foram adicionados a 500µL de amostra ou solução de quercetina, 500µL de solução hidroetanólica 50% (v/v) de cloreto de alumínio a 2% (p/v). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de cloreto de alumínio (2%) foi substituída pela mesma quantidade de etanol 50% (v/v). O conteúdo de flavonóides totais foi expresso como µg de equivalente de quercetina (EQ) por mg de extrato (KUMAZAWA et al., 2004).

3.4. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

3.4.1. Linhagem celular e cultivo

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essas 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); e incubadas a 37ºC com 5% de CO_2.

3.4.2. 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 et al., 1988). A escolha deste método para avaliar a citotoxicidade dos extratos *Eugenia biflora*, *Miconia minutiflora* e *Protium heptaphyllum* foi devido à menor interferência dos extratos na leitura.

Com objetivo de identificar possíveis interferências da radiação UVB na citotoxicidade dos extratos, também foram avaliados extratos irradiados com uma fonte de luz UVB por 60 minutos antes do ensaio, recebendo uma dose de radiação de 2,87J/cm^2, o que equivale à, aproximadamente, a dose máxima de RUV que atinge a superfície da Terra próximo à Linha do Equador (VILELA et al., 2011).

As células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1 x 10^4 células/poço e incubadas em estufa a 37ºC com 5% de CO_2 e, 24 horas depois, foi realizado o tratamento com várias diluições dos extratos em meio não suplementado com SBF (meio incompleto). Vinte e quatro horas após o tratamento com os extratos, foi adicionado 200µL de vermelho neutro (50µg/mL) em cada poço e a placa foi incubada na estufa por 3 horas. Após este período, o vermelho neutro foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e $CaCl_2$ 1% (p/v); e, em seguida, foram adicionado 200µL de etanol com ácido acético 1% (v/v). A leitura foi realizada após 15 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas (µQuant) em 540nm (BORENFREUND et al., 1990). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

3.5. Desenvolvimento das formulações de uso tópico

3.5.1. Preparo das formulações

Foram preparadas 3 formulações de uso tópico nas formas de gel, gel-creme e creme, adicionadas ou não do extrato metanólico seco de *Protium heptaphyllum*, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das formulações.

Componentes	Formulação (%, p/p)					
	P1	F1	P2	F2	P3	F3
Aristoflex® AVC	5,0	5,0	-	-	-	-
Hostacerin® SAF	-	-	15,0	15,0	-	-
Polawax NF	-	-	-	-	20,0	20,0
Palmitato de Isopropila	1,5	1,5	-	-	1,5	1,5
Óleo de Macadâmia	2,0	2,0	-	-	2,0	2,0
Phytosqual®	2,5	2,5	2,0	2,0	2,5	2,5
Propilenoglicol	25,0	21,0	25,0	21,0	25,0	21,0
Nipaguard® CG	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tampão McIlvaine pH 5,0	63,95	63,95	57,95	57,95	48,95	48,95
Extrato *Protium heptaphyllum*	-	4,0	-	4,0	-	4,0

O tampão McIlvaine pH 5,0 foi preparado com Na_2HPO_4 0,2M (17,81g/L) e ácido cítrico 0,1M (21g/L), sendo o pH corrigido com ácido cítrico 0,1M.

Para preparar as formulações P1 e F1, o tampão McIlvaine foi aquecido à 60ºC e em seguida adicionou-se o polímero Aristoflex® AVC (Clariant), agitando a mistura a 300rpm em agitador Fisatom 713 D até completa dispersão. Após o resfriamento, acrescentou-se o restante dos componentes.

As formulações P2 e F2 foram preparadas por simples agitação manual, a frio, da matéria-prima Hostacerin® SAF (Clariant) com o tampão McIlvaine. Após adquirir consistência, foram adicionados os demais componentes.

As formulações P3 e F3 foram preparadas pelo método da inversão de fases, sendo as fases aquosa e oleosa aquecidas separadamente até 75ºC e, em seguida,

misturadas sob agitação constante a 400rpm em agitador Fisatom 713 D. Após o resfriamento, foram acrescentados o conservante e o propilenoglicol, ou o extrato.

O extrato de *Protium heptaphyllum* foi previamente solubilizado quantidade de propilenoglicol usada na preparação de cada formulação com ajuda de um sonicador de banho Thorton T50. Posteriormente, o extrato solubilizado foi incorporado às formulações, por agitação manual, quando estas se encontravam à temperatura ambiente. Nas formulações placebo, foi incorporado apenas propilenoglicol em quantidade equivalente.

As formulações foram acondicionadas em potes de PVC brancos de fundo falso, com capacidade de 50g, e armazenadas a 4ºC.

3.5.2. Caracterização físico-química das formulações

Amostras das formulações, armazenadas a 4ºC, foram analisadas quanto às características organolépticas e submetidas ao teste de centrifugação e determinação de pH. As formulações também foram avaliadas quanto a sua atividade antioxidante.

3.5.2.1. Características organolépticas

As amostras foram analisadas visualmente quanto ao aspecto, cor, homogeneidade e separação de fases (BRASIL, 2004).

3.5.2.2. Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado utilizando 2g de cada amostra centrifugada a 1660 x g por 30 minutos em centrífuga Eppendorf 581OR. O critério de aceitabilidade foi a não ocorrência da separação de fases (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992).

3.5.2.3. Determinação de pH

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

3.5.2.4. Avaliação da atividade antioxidante das formulações

A atividade antioxidante das formulações foi avaliada pelo método da determinação da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol como descrito no item 3.2.4. Foram preparadas diluições das formulações em tampão glicina (0,1M) pH 9,4 preparado acrescentando EDTA (1mM), de forma a conseguir concentrações necessárias de extrato para inibir a reação luminescente gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol. Diluições das formulações placebo também foram avaliadas a fim de verificar a interferências dos componentes da formulação na sua atividade antioxidante. As porcentagens de inibição das formulações foram comparadas com a porcentagem de inibição do extrato não veiculado.

3.6. Estudo de penetração e retenção cutânea *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos sem pelos (*hairless*), machos ou fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 30g, da linhagem HRS/J laboratório Jackson (BarlHarbor). Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25ºC, 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 (Protocolo nº 09.1.1276.53.0).

As formulações consideradas estáveis foram avaliadas quanto à capacidade em disponibilizar os ativos e de permear esses ativos na pele dos camundongos sem pelos. Os experimentos foram realizados com 3 grupos de animais: grupo placebo (tratados com as formulações não adicionadas do EP), grupo formulação (tratados com as formulações adicionadas do EP) e grupo controle (sem tratamento). Trezentos miligramas das formulações ou placebos foram aplicados no dorso dos

animais (n=6). Após 1 hora, os animais foram sacrificados e a área da pele em que a formulação foi aplicada, removida.

Uma área de aproximadamente 2,9cm^2 da pele foi submetida ao procedimento de *Tape Stripping* que consiste na retirada da camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo (EC), utilizando 15 fitas adesivas tipo *durex*. As fitas foram descartadas. A pele remanescente, (epiderme viável + derme [E+D]) foi picotada e homogeneizada com 2,5mL de metanol, sonicada 30 minutos em banho de ultra-som, agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada durante 15 minutos a 3000rpm. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 5mL. Foram adicionados mais 2,5mL de metanol ao precipitado remanescente no tubo e, novamente, foi levado ao ultra-som por 30 minutos, agitado em vórtex por 1 minuto e centrifugado por 15 minutos a 3000rpm. O sobrenadante obtido foi recolhido e adicionado ao sobrenadante do processo anterior no balão volumétrico de 5mL. O volume do balão foi completado com metanol.

Para verificar a presença de componentes antioxidantes do extrato na pele, as amostras das peles tratadas com extrato e placebo foram submetidas ao ensaio de determinação da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol como descrito no item 3.2.4, utilizando a pele de camundongos que não receberam tratamento e foram submetidas ao mesmo processo de extração como controle positivo.

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

3.7.1. Irradiação dos camundongos sem pelos

Para irradiação dos camundongos sem pêlos foi utilizada uma lâmpada ultravioleta fluorescente modelo PHILIPS TL40W/12 RS (Medical, Holanda) que emite radiação na faixa de 270 a 400nm, com pico de emissão em torno de 313nm. A fonte de luz UV foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para esse tipo de experimento (Figura 1).

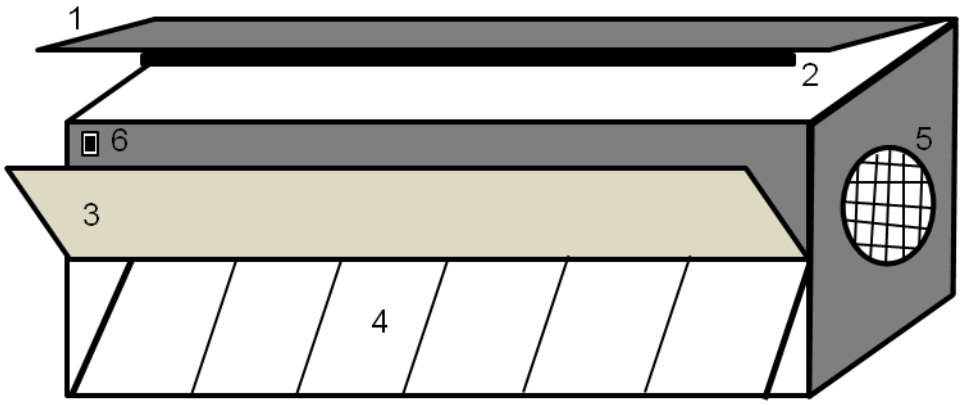

Figura 1. Esquema da caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB. (1) Tampa superior; (2) lâmpada UVB; (3) tampa frontal; (4) repartições para colocar as caixas plásticas com os animais; (5) orifício de ventilação; (6) acionamento da lâmpada.

Das seis repartições presentes no compartimento, foram utilizadas apenas as quatro repartições centrais para serem colocadas as caixas plásticas com diferentes grupos de animais, a fim de evitar variações de radiação. Os animais ficaram livres para se movimentar em suas caixas e suas regiões dorsais ficaram diretamente expostas à RUV. A parte superior das caixas foi coberta com uma tela plástica para manter os animais dentro das mesmas durante todo o tempo de exposição à radiação (CASAGRANDE, 2005). Nestas condições, a irradiância foi de 0,34mW/cm^2, determinada por radiômetro IL 1700 (International Light), da qual aproximadamente 80% corresponderam à RUVB.

Os animais foram divididos em cinco grupos de seis animais cada. São eles: controle não irradiado (CNI); tratado com formulação contendo EP e não irradiado (NIF); controle irradiado (CI); tratado com placebo e irradiado (IP) e tratado com formulação contendo EP e irradiado (IF).

O tratamento consistiu na aplicação de 500mg de formulação ou placebo no dorso de cada animal 1 hora antes do início da irradiação e imediatamente após a irradiação. Os grupos irradiados permaneceram por 2 horas no compartimento de madeira expostos à radiação UV, o que corresponde à dose de 2,87 J/cm^2. A dose de radiação utilizada 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 do GSH.

Após 6 horas do término da irradiação, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e a pele foi limpa com auxílio de algodão e solução de NaCl 0,9% (p/v) para retirada total das formulações. Amostras do tecido cutâneo do dorso dos animais foram coletadas, lavadas com solução de NaCl 0,9% (p/v), congeladas com N_2 líquido e armazenadas a -85ºC.

3.7.2. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

A glutationa (GSH) é um dos mais importantes antioxidantes endógenos contra EROs induzidos por UV, dessa forma, o monitoramento de suas quantidades pode ser utilizado para avaliação do estresse oxidativo (CARINI et al., 2000). Os níveis de GSH na pele do dorso dos animais foram determinados utilizando o ensaio de fluorescência descrito por Hissin e Hilf (1976).

As amostras de pele foram picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1M, pH 8,0, contendo EGTA (5mM). Posteriormente, foram homogeneizadas em Turrax TE-120 a 21500rpm por 2 minutos e 200µL de ácido tricloroacético 30% foram acrescentados para cada mililitro de tampão adicionado. Esse homogeneizado foi, então, centrifugado a 4000rpm por 6 minutos a 4ºC e o sobrenadante transferido para microtubo e, novamente, centrifugados a 10000rpm por 10 minutos a 4ºC (CASAGRANDE et al., 2006).

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

3.7.3. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase

O ensaio para dosagem da MPO seguiu o protocolo descrito por Bradley e colaboradores (1982).

As amostras da pele do dorso dos animais foram coletadas e armazenadas a –80°C em microtubos contendo tampão K_2HPO_4 (50 mM) adicionado de brometo de hexadecil trimetil-amônio (HTAB) 0,5% (p/v), pH 6,0. Posteriormente, as amostras foram picotadas, diluídas a 50 mg/mL utilizando o mesmo tampão e homogeneizadas em Turrax a 21500rpm por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12880g por 6 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e analisada quanto à atividade de MPO. Em placas de 96 poços, 60µL das amostras foram adicionadas a 200µL de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada após 10 minutos do início da reação em 450 nm, utilizando espectrofotômetro leitor de microplacas. A atividade da enzima nas amostras foi determinada através de uma curva padrão de mieloperoxidase (Sigma®). Os resultados foram expressos em unidade de mieloperoxidase por miligrama de pele (BRADLEY, 1982; CASAGRANDE et al., 2006).

3.7.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo*

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na pele foi determinada pelo método espectrofotométrico de redução do citocromo C descrito por McCord e Fridovich (1969). As amostras de pele foram picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5. Em seguida, as peles foram homogeneizadas em Turrax TE-120 a 21500rpm durante 2 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 4000rpm por 6 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi transferido para microtubo e, novamente, centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a 4ºC. A fração sobrenadante foi diluída 10 vezes no tampão fosfato antes de iniciar a reação.

Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 2,9mL de uma solução composta por 0,76mg (5µmol) de xantina, 10mL de NaOH 1mM, 24,8mg de citocromo C (2µmol) e 100mL de tampão fosfato 50mM, pH 7,8, com 0,1mM de EDTA. A essa solução foram adicionados 50µL de tampão fosfato, SOD padrão

(Sigma®) ou amostra e a reação foi iniciada pela adição de 2µL de xantina oxidase (50mg ptn/mL). Em seguida, a reação foi monitorada em espectrofotômetro a 550nm, por 10 minutos. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de SOD suficiente para inibir a taxa de redução do citocromo c em 50%, e a atividade da enzima foi expressa em unidades/mg de proteína.

3.8. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPad Prism® (versão 5.01, 2007). Os resultados foram expressos pela média ± 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. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos *in vitro*

Uma vez que existem várias maneiras pelas quais um extrato pode exercer sua atividade antioxidante, como pela quelação de íons metálicos, neutralizando e/ou impedindo a formação de radicais livres ou melhorando o sistema antioxidante endógeno, é importante comparar diversos métodos antioxidantes a fim de proporcionar uma melhor compreensão do potencial antioxidante dos extratos estudados (PIETTA, 2000).

Assim, os extratos foram avaliados por diferentes métodos capazes de gerar EROs envolvidas com diferentes tipos de iniciação oxidativa. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3 em termos de IC_{50}.

Tabela 3. Valores de IC_{50} obtidos nos diferentes ensaios de atividade antioxidante pelos extratos.

	Atividade Antioxidante IC_{50} (µg/mL)			
Extratos	Redução do $DPPH^{\bullet}$	Inibição da peroxidação lipídica	Sistema xantina/luminol /XOD	Sistema H_2O_2/luminol /HRP
Eugenia biflora	6,02	1,235	0,933	1,529
Eugenia protenta	11,11	3,178	1,348	2,246
Protium heptaphyllum	5,21	13,037	0,232	2,127
Miconia minutiflora	3,63	1,694	1,095	2,194

Os resultados representam a média de três determinações.

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

O método do $DPPH^{\bullet}$ é baseado na redução do radical $DPPH^{\bullet}$ a DPPH – H que leva a alteração colorimétrica. Moléculas doadoras de íons hidrogênio ($H^{\bullet}$), como os polifenóis presentes nos extratos, são, portanto, capazes de diminuir a absorbância das amostras (BLOIS, 1958).

A capacidade doadora de $H^{\bullet}$ dos polifenóis está correlacionada com o número e a posição dos grupos hidroxilas em suas estruturas químicas (SEYOUM; ASRES; EL-FIKY, 2006).

A quercetina é um flavonóide que se destaca pelo seu alto poder antioxidante, principalmente devido à sua capacidade de eliminar radicais livres como hidroxil, peroxil e ânions superóxido, com a formação de radicais menos reativos; e quelar metais de transição como ferro e cobre, que quando livres aumentam o potencial de formação das EROs pela reação de Fenton (CHOI; CHEE; LEE, 2003). Vicentini e colaboradores (2007) encontraram o valor de IC_{50} de 0,8 µg/mL para a quercetina.

Os extratos *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum*, e *Miconia minutiflora* apresentaram, respectivamente, valores de IC_{50} 7,5; 14,0; 6,5 e 4,5 vezes maiores que o da quercetina, sugerindo menor potencial antioxidante.

Embora o método de $DPPH^{\bullet}$ seja amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, não é o melhor método para a determinação de compostos antioxidantes, uma vez que o $DPPH^{\bullet}$, espécie radicalar centrada no nitrogênio, não está presente nos sistemas biológicos e a maioria dos radicais envolvidos na deteriorização oxidativa são EROs (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Já os radicais peroxila e alcoxila, envolvidos na peroxidação lipídica, e o ânion superóxido, radical que tem sua presença exacerbada relacionada a alguns tipos de câncer (PIETTA, 2000), são importantes EROs geradas no processo de estresse oxidativo. Assim, os extratos também foram avaliados quanto à capacidade de inibir a peroxidação lipídica e de sequestrar EROs geradas nos sistemas xantina/XOD/luminol e H_2O_2/HRP/luminol.

4.1.2. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

Em um sistema completamente livre de peróxidos lipídicos, a presença de Fe^{+2} inicia a reação de Fenton/Harber Weiss [$Fe^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$] gerando radical hidroxila. Os radicais hidroxila produzidos podem iniciar um processo de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio dos fosfolipídeos presentes nas mitocôndrias e formando radicais peroxila e, assim, induzem uma sequência de reações de propagação onde outros radicais, como os hidroperóxidos (ROOH), são formados (RODRIGUES et al., 2002).

Adicionalmente, na preparação do homogenato de fígado de ratos para obtenção da mitocôndria, ocorre a formação de peróxidos lipídicos pela ação de enzimas liberadas na maceração do tecido. Na presença de sais de Fe^{+2}, esses peróxidos são decompostos e originam radicais peroxila e alcoxila ($ROO^{\bullet}$ e $RO^{\bullet}$),

sendo que ambos podem sequestrar hidrogênio e propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Portanto, neste experimento, foi necessário avaliar a integridade das membranas através de um controle negativo não adicionado de ferro.

Os radicais formados são espécies lábeis que sofrem mudanças e deterioração levando a formação de produtos secundários tais como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonenal e principalmente malondialdeído (MDA).

A peroxidação lipídica pode ser prevenida no estágio inicial por sequestradores de radicais livres e compostos capazes de retirar o oxigênio do estado singleto, ou a propagação da reação em cadeia pode ser quebrada por sequestradores de radical peroxila, alcoxila e quelantes de Fe^{+2}. A peroxidação lipídica pode, portanto, ser suprimida por antioxidantes que inativam enzimas envolvidas na formação de EROs, por quelação do Fe^{+2}, por inibição do estágio inicial e/ou acelerando o estágio final. (COOK; SAMMAN, 1996).

Todos os extratos testados apresentaram propriedades inibitórias da peroxidação lipídica dose-dependente verificada através da inibição da formação de espécies reativas ao TBA (Figura 2). Os valores de IC_{50} encontrados para os extratos *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum* e *Miconia minutiflora* foram respectivamente, 1,235; 3,178; 13,037 e 1,694 µg/mL (Tabela 3). Casagrande (2005) obteve o valor de IC_{50} de 0,34µg/mL. Os valores encontrados neste estudo foram 3,6; 9,34; 38,34 e 5,0 vezes maiores que o da quercetina.

Muitos polifenóis podem neutralizar EROs formadas na peroxidação lipídica ou quelar íons Fe^{+2} impedindo a catálise da reação (YOSHINO; MURAKAMI, 1998). Vários autores consideram a quelação de íons ferro como o principal mecanismo de ação dos polifenóis outros, porém, consideram o sequestro de EROS dominante para o efeito antioxidante. Baseado nessas informações, as mesmas concentrações de extrato testadas para peroxidação lipídica, foram avaliadas em um experimento para determinar a capacidade queladora do íon ferro utilizando batofenantrolina. Os resultados sugerem que os extratos estudados apresentam a propriedade de quelar íons ferro inibindo a formação do complexo ferro-batofenantrolina (Fe-BPS), e, desta forma, a capacidade destes em inibir a peroxidação lipídica pode ser um efeito sinérgico entre a o sequestro de radicais livres e a quelação do íon Fe^{+2}.

Estudos desenvolvidos por Casagrande (2005) demonstraram que o efeito da quecetina em quelar de íons Fe^{+2} foi tempo e dose-dependente, sendo que a

porcentagem máxima de inibição da formação do complexo Fe-BPS (60%) foi quando os autores empregaram concentração de 4µg/ml de quercetina com tempo de reação de 15 minutos. Enquanto que 0,34µg/mL de quercetina permitiu inibir 50% da peroxidação lipídica, uma concentração 11 vezes menor que aquela necessária para seu efeito quelador máximo.

Com base nos dados acima, os resultados mostrados na Figura 2 sugerem que o maior valor de IC_{50} para a inibição da peroxidação lipídica obtido para o extrato de *Protium heptaphyllum*, em relação aos outros extratos em estudo, pode ser devido ao maior efeito deste extrato sobre a quelação de íons Fe^{+2} do que a sua capacidade sequestradora dos radicais envolvidos na peroxidação.

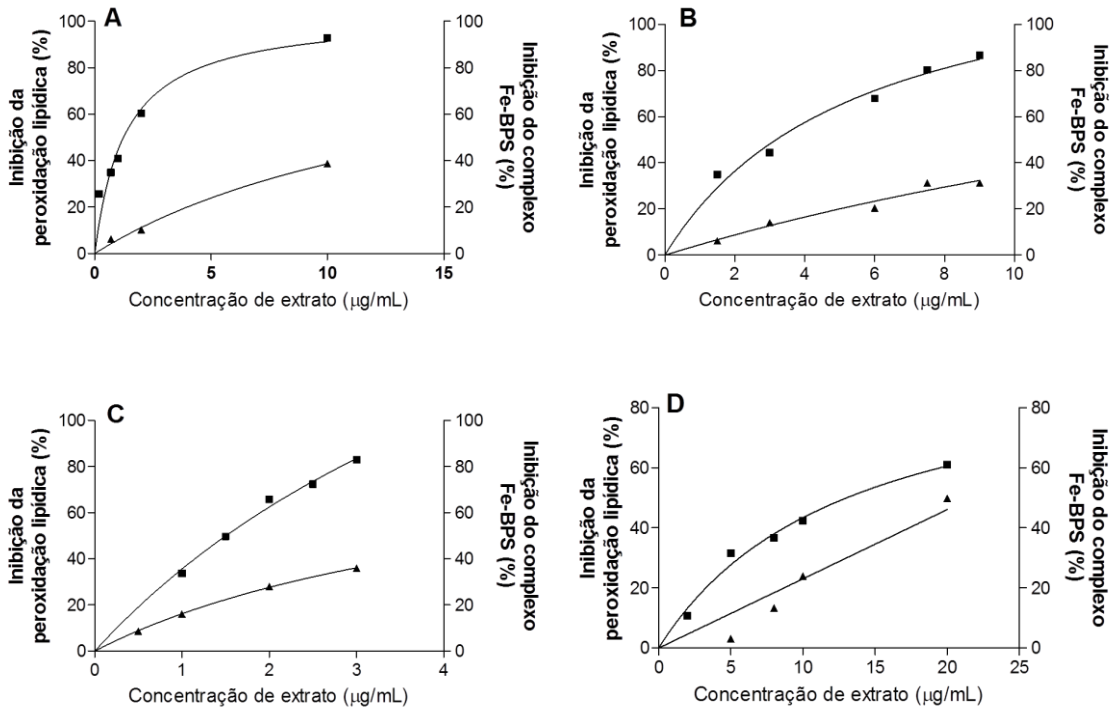

Figura 2. Relação entre a inibição da peroxidação lipídica (%) (■) e inibição do complexo Fe-BPS (%) (▲) pela concentração de extrato (µg/Ml). (A) = *Eugenia biflora*; (B) = *Eugenia protenta*; (C) = *Miconia minutiflora* e (D) = *Protium heptaphyllum.* Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

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

A quimioluminescência com luminol tem sido utilizada como um ensaio sensível para monitoramento de radicais livres, enzimas, células ou sistemas de órgãos e para *screening* de atividade antioxidante (GIROTTI et al., 2000).

A reação xantina/xantina oxidase (XOD) produz o radical superóxido (Figura 3) que por sua vez oxida o luminol. Este tende a voltar ao estado basal emitindo luz, que é detectada pelo equipamento. A redução da quantidade de radicais superóxido no meio reacional leva a diminuição da quimioluminescência (GIROTTI et al., 2000) e, portanto, a quantidade de luz emitida é proporcional a quantidade de ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase. Desta forma, a inibição da luz pode ocorrer por inibição da enzima xantina oxidase ou por sequestro dos radicais superóxido formados (PIETTA, 2000).

$$\text{Xantina} + O_2 \xrightarrow{\text{XOD}} \text{Ácido úrico} + O_2^-$$

Figura 3. Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase.

Todos os extratos avaliados foram eficientes na inibição da intensidade de quimioluminescência gerada nesse sistema de forma dose-dependente (Figura 4).

Os valores de IC_{50} encontrados para os extratos *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum* e *Miconia minutiflora* foram respectivamente, 0,933; 1,348; 0,232; 1,095 µg/mL (Tabela 3). Todos os extratos analisados apresentaram uma atividade inibidora da quimioluminescencia muito maior que aquela obtido para quecetina de 11,3 µg/mL por Fonseca e colaboradores (2010), sendo os valores 12,11; 8,38; 48,71 e 10,32 vezes menores que os da quercetina. Estes valores sugerem que os extratos possuem um grande potencial sequestrador do radical O_2^-.

Para avaliar a existência de uma possível interação entre os componentes do extrato com a xantina oxidase levando a alterações de atividade desta enzima, os extratos foram pré-incubados com a XOD, quinze minutos antes da reação de quimiluminescência. Os resultados mostrados na Figura 4 sugerem que os componentes dos extratos *Eugenia protenta* e *Miconia minutiflora* não interagiram

com a enzima ou, se interagiram, a interação não alterou a atividade desta enzima nem a capacidade dos extratos em inibir a quimioluminescência. Enquanto, que para os extratos *Eugenia biflora* e *Protium heptaphyllum* houve uma interação dos componentes polifenólicos com a XOD, porém esta interação não levou a perda de atividade da enzima, mas proporcionou uma diminuição da capacidade do extrato de inibir a quimioluminescência gerado neste sistema.

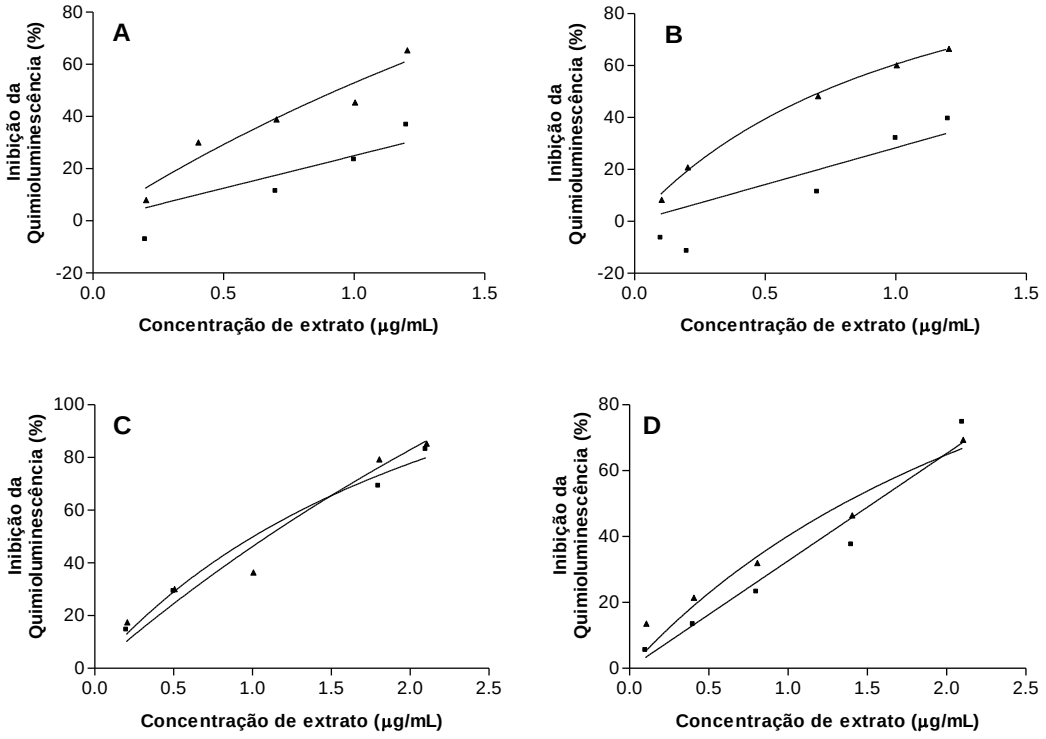

Figura 4. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol sem (▲) e com pré-incubação (■) dos extratos com a enzima xantina oxidase. (A) = *Eugenia biflora*; (B) = *Protium heptaphyllum*; (C) = *Miconia minutiflora* e (D) = *Eugenia protenta*. Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

4.1.4. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/HRP/luminol

A enzima HRP catalisa a oxidação de diversas moléculas, como o luminol, na presença de peróxido de hidrogênio. Apesar desta reação não ser completamente compreendida, acredita-se que o esquema de reação envolva a oxidação do luminol por um complexo entre o oxidante e a peroxidase para produzir um radical luminol.

Radicais luminol passam por posteriores reações que resulta na formação de um endoperóxido o qual se decompõe para render um diânion 3-aminoftalato eletronicamente excitado que emite luz ao retornar no estado basal (PASCUAL; DEL CASTILHO; ROMAY, 1992; DÍAZ; SÁNCHEZ; GARCÍA, 1995). Há dados na literatura que sugerem que o radical $O_2^{-\bullet}$ pode participar na reação que leva a quimioluminescência do luminol. O $O_2^{-\bullet}$ na presença de H_2O_2 coopera na geração do radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e o oxigênio singlete ($^1O_2$). Misra e Squatrito (1982) observaram que neste meio reacional são formados principalmente $O_2^{-\bullet}$ e $^{\bullet}OH$.

Todos os extratos testados foram capazes de diminuir a quimioluminescência gerada neste sistema de forma dose-dependente (Figura 5), com os valores de IC_{50} de 1,53; 2,25; 2,13 e 2,19µg/mL respectivamente para os extratos de *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum* e *Miconia minutiflora* (Tabela 3). A quercetina foi utilizada como controle e apresentou valor de IC_{50} de 0,115µg/mL, portanto os valores de IC_{50} encontrados para os extratos foram 13,30; 19,57; 18.52 e 19,04 vezes maiores em relação ao da quercetina.

Para avaliar a existência de uma possível interação entre os componentes do extrato com a enzima HRP que levaria a alterações de atividade desta enzima, os extratos foram pré-incubados com a HRP, quinze minutos antes da reação de quimiluminescência. Os resultados mostrados na Figura 5 sugerem que houve uma interação dos polifenóis dos extratos de *Eugenia biflora* e *Protium heptaphyllum* com a enzima, porém essa interação não resultou na perda de atividade da HRP, mas proporcionou uma diminuição da capacidade do extrato de inibir a quimioluminescência gerada nesse sistema. No caso do extrato de *Protium heptaphyllum*, a interação foi tão forte que pode ser observada mesmo nas menores concentrações do extrato.

Já para os extratos *Miconia minutiflora* e *Eugenia protenta* parece ocorrer uma interação entre os polifenóis do extrato e a enzima HRP de maneira que no experimento pré-incubado observou-se um aumento da inibição da quimioluminescência, indicando que houve a produção de menos EROs. Nesse caso, a inibição da quimioluminescência pode estar ocorrendo tanto pelo sequestro de radicais, quanto pela inibição da enzima.

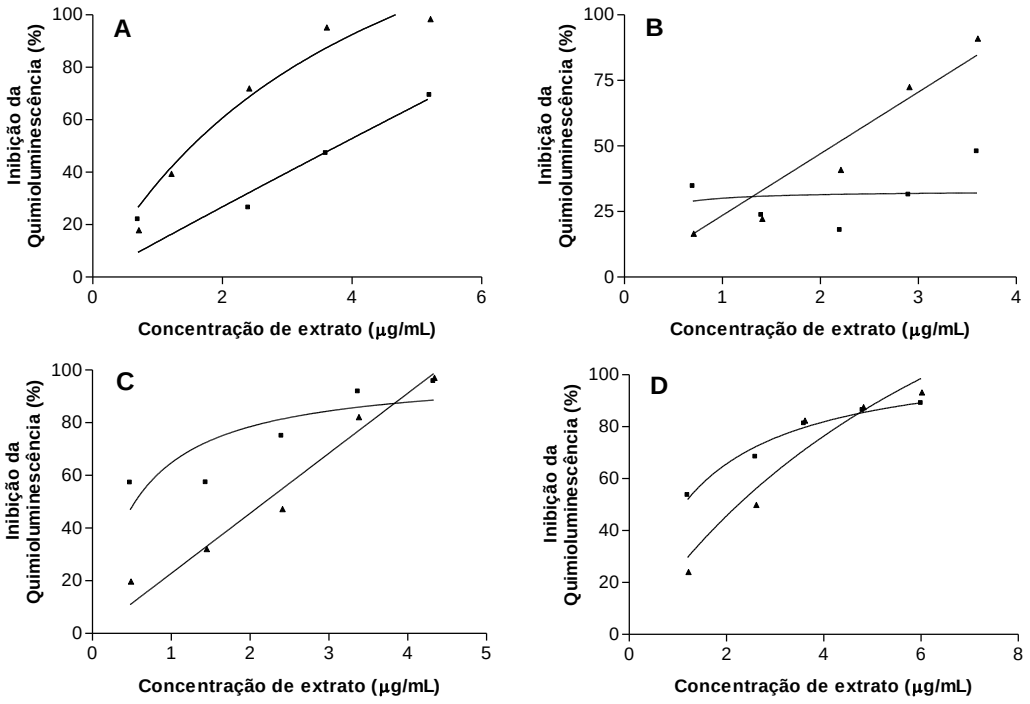

Figura 5. Curva de inibição da quimioluminescência gerada no sistema H_2O_2/luminol/HRP sem (▲) e com pré-incubação (■) dos extratos com a enzima HRP. (A) = *Eugenia biflora*; (B) = *Protium heptaphyllum*; (C) = *Miconia minutiflora* e (D) = *Eugenia protenta*. Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

Quando comparados, os valores de IC_{50} de atividade antioxidante obtidos neste estudo com os de outros extratos vegetais testados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da FCFRP-USP que apresentaram efeito fotoquimioprotetor incorporados em formulações tópicas, os extratos *Eugenia biflora*, *Esugenia protenta*, *Miconia minutiflora* e *Protium heptaphyllum* apresentaram resultados promissores em relação a sua utilização como agentes fotoquimiopreventivos .

4.2. Caracterização química dos extratos

4.2.1. Determinação do teor de polifenóis

A determinação do teor de polifenós utilizando reagente de Folin-Ciocalteau tem como princípio a propriedade do íon fenolato de ser oxidado. A reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngtico e fosfomolíbdico em meio alcalino a

óxidos de tungstênio e molibdênio é causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul (ADELMANN, 2005). O reagente de Folin-Ciocalteu reage com compostos fenólicos presentes nas amostras. A reação é potencializada quando carbonato de sódio é adicionado ao meio reacional, o que se deve ao fato do íon fenolato ser completamente oxidado em pH 10 (SINGLETON et al., 1999).

Diversos trabalhos descrevem a importância dos polifenóis na atividade antioxidante. O teor de polifenóis foi determinado pela equação obtida da curva padrão de ácido gálico y = 0,0676x – 0,013 (r=0,999), onde x representa a concentração de polifenóis correspondente ao ácido gálico e y representa a absorbância. O conteúdo de polifenóis totais encontrado foi expresso em µg de equivalente de ácido gálico / mg de extrato, em relação ao peso seco (µgEaG/mg) como representado na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de polifenóis e flavonóides totais encontrado nos extratos.

Extratos	**Polifenóis totais (µg EAG/mg de extrato)**	**Flavonóides totais (µg EQ/mg de extrato)**
Eugenia biflora	148,8	38,4
Eugenia protenta	186	83,19
Protium heptaphyllum	227,81	10,85
Miconia minutiflora	151,4	58,49

Os resultados representam a média de três determinações.

4.2.2. Determinação do teor de flavonóides totais

O método de determinação de flavonóides totais tem como princípio a formação de um complexo estável entre o cloreto de alumínio e o carbono C-4 do grupo ceto e os grupos hidroxila dos carbonos C-3 e C-4 de flavonas e flavonóis (CHANG et al., 2002). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos (WOISKY, 1996).

O teor de flavonóides foi determinado pela equação y = 0,0548x -0,0108 (r=0,9921) obtida com padrão de quercetina. O conteúdo de flavonóides totais encontrado nos extratos está representado na Tabela 4.

É interessante observar que, dentre os extratos analisados, o extrato de *Protium heptaphyllum* foi aquele que apresentou maior quantidade de polifenóis e que mostrou maior relação entre os teores de flavonóides e polifenóis (1:20,99), enquanto que para os extratos de *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta* e *Miconia minutiflora* essa relação foi de 1:3,87; 1:2,23 e 1:2,60, respectivamente. Não houve correlação entre os teores de polifenóis e flavonóides e a atividade antioxidante dos extratos, o que era esperado já que os polifenóis e flavonóides são reconhecidos agentes antioxidantes. O extrato de *Eugenia protenta*, apesar do seu alto teor de polifenóis e flavonóides totais, foi o que se mostrou menos eficaz nos ensaios de atividade antioxidante, sugerindo que os polifenóis e flavonóides presentes nesse extrato têm menor potencial antioxidante, uma vez que este potencial está diretamente relacionado com a estrutura química da molécula e seus ligantes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002) ou, ainda, a atividade antioxidante dos extratos pode ser devida à presença de outros compostos não flavonóides, como, por exemplo, as cumarinas (HOULT; PAYÁ, 1996).

4.3. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes (ROGERO et al., 2003). A citotoxicidade dos extratos *Eugenia biflora*, *Miconia minutiflora* e *Protium heptaphyllum* irradiados e não irradiados 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 não injuriadas (BORENFREUND et al, 1988). A escolha deste método foi devido à menor interferência dos extratos na leitura.

O corante vermelho neutro é solúvel em água e passa através da membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hifrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares resultando no decréscimo da captura e ligação do vermelho

neutro. Portanto, é possível distinguir entre as células vivas e danificadas ou mortas, pela medida da intensidade da cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003).

Dentre os extratos não irradiados, *Eugenia biflora* foi aquele que mostrou maior citotoxicidade. Na concentração de 25µg/mL inibiu 88% da viabilidade das células L929 (fibroblasto de camundongos), nas condições empregadas no ensaio (Figura 6). Enquanto que os extratos *Miconia minutiflora* e *Protium heptaphyllum*, na concentração de 50µg/mL inibiram cerca de 58 e 38% da viabilidade celular, respectivamente.

A seleção de um extrato com alta atividade antioxidante tem como objetivo a sua incorporação em formulações tópicas visando a utilização destas na prevenção dos efeitos prejudiciais da radiação solar sobre a pele por meio da produção de EROs. A exposição dos extratos vegetais à radiação ultravioleta pode proporcionar a degradação de seus componentes, produzindo subprodutos potencialmente citotóxicos. Assim, os extratos foram expostos à radiação de 2,87J/cm^2 e, em seguida, foram avaliados quanto a sua citotoxicidade.

Os resultados sugerem que a citotoxicidade do extrato de *Eugenia biflora* não sofreu alterações decorrentes da sua exposição à radiação, indicando que se a radiação conduziu a degradação de componentes deste extrato, os produtos de degradação não foram citotóxicos. O extrato de *Miconia minutiflora* irradiado foi mais citotóxico do que o não irradiado, sendo que na concentração de 50µg/mL houve uma redução da viabilidade celular de 86% com o extrato irradiado e apenas 58% com o extrato não irradiado. Por outro lado, observou-se que o extrato de *Protium heptaphyllum* irradiado aumentou a viabilidade celular. Em uma concentração de 50µg/mL, o extrato irradiado manteve 87,5% das células viáveis, enquanto que com o extrato não irradiado, na mesma concentração, apenas 60% das células mantiveram-se viáveis.

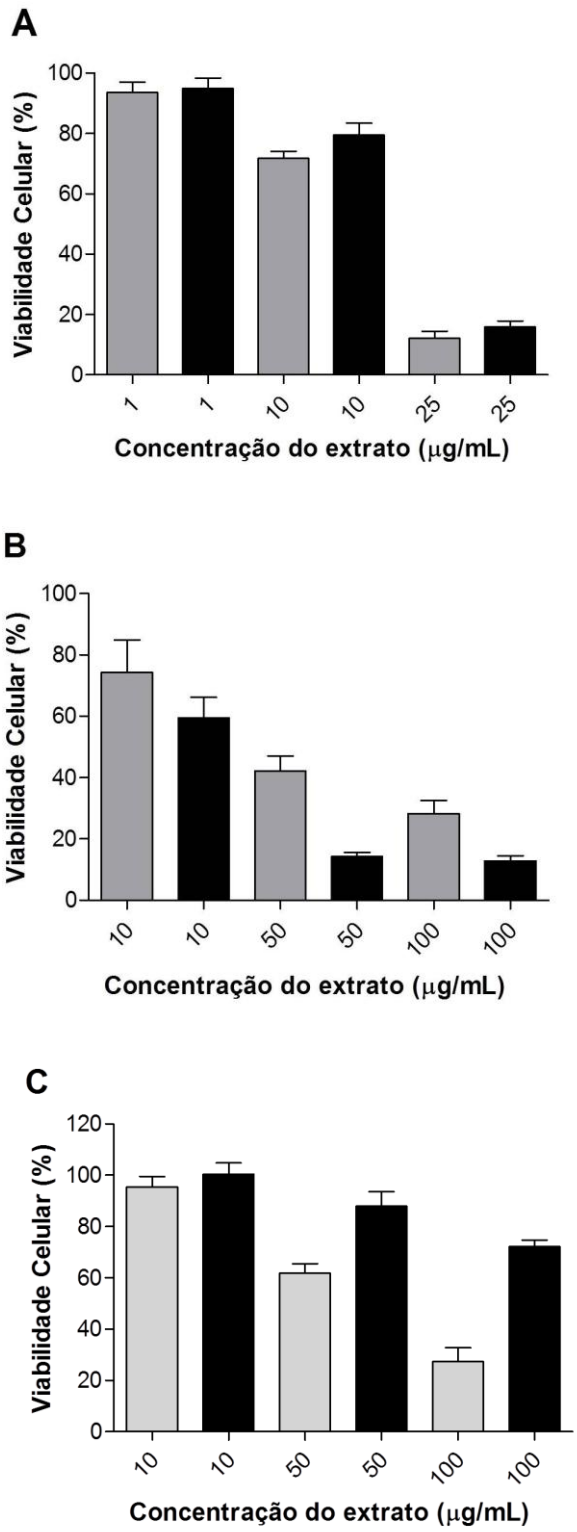

Figura 6. Viabilidade de células L929 tratadas com os extratos irradiados (■) e não irradiados (■). (A) *Eugenia biflora* (1; 10 e 25µg/mL), (B) *Miconia minutiflora* (10; 50 e 100µg/mL) e (C) *Protium heptaphyllum* (10; 50 e 100µg/mL). Os resultados representam a média de três determinações ± DP.

As imagens dos cultivos celulares (Figura 7) tratados com o extrato de *Protium heptaphyllum* irradiado e não irradiado evidenciam o aumento da viabilidade celular nas culturas tratadas com o extrato irradiado, sem, contudo, induzir aumento do número de células, sugerindo que a radiação levou à degradação de componentes potencialmente citotóxicos e que os produtos de degradação resultantes não apresentaram citotoxicidade.

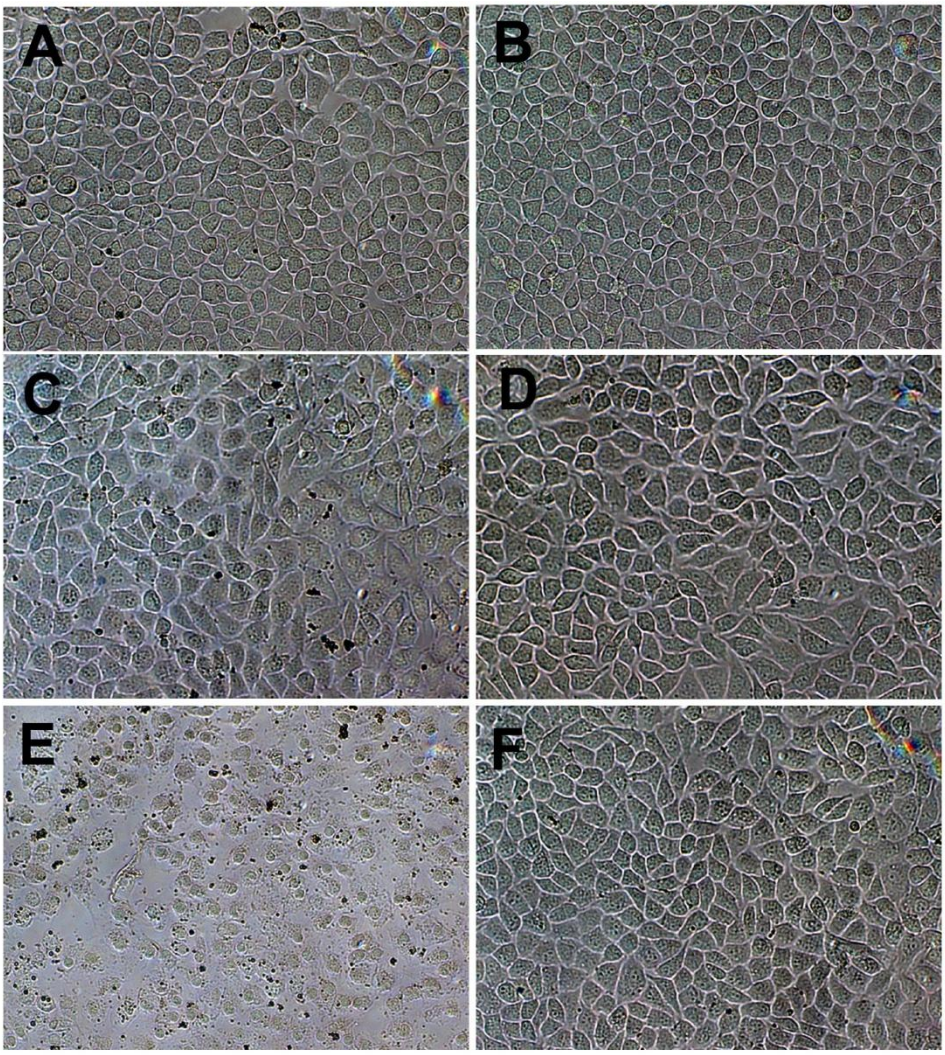

Figura 7. Cultura de células L929 tratadas com extrato de *Protium heptaphyllum*, 10µg/mL (A) não irradiado e (B) irradiado; 50µg/mL (C) não irradiado e (D) irradiado; e 100µg/mL (E) não irradiado e (F) irradiado.

Embora o extrato de *Miconia minutiflora*, de maneira geral, tenha demonstrado um melhor desempenho nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante, observando os resultados de citotoxicidade do extrato de *Protium*

heptaphyllum, este pareceu ser o extrato mais indicado para incorporação nas formulações tópicas utilizadas nos ensaios *in vivo*.

4.4. Desenvolvimento de formulações de uso tópico

As formulações tópicas foram desenvolvidas com matérias-primas amplamente utilizadas em preparações farmacêuticas e cosméticas, e em concentrações recomendadas pelos fabricantes.

As formulações tipo gel foram preparadas utilizando Aristoflex® AVC, um polímero sintético, aniônico, formador de géis cristalinos em sistemas aquosos, estáveis em ampla faixa de pH e que não necessitam neutralização (PHARMASPECIAL, 2011).

A utilização de Hostacerin® SAF permitiu a obtenção de formulações tipo gel-creme de fácil preparo, uma vez que esta matéria-prima contém a associação de doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes que permitem a preparação a frio de emulsões O/A (óleo em água), de caráter aniônico e muito estáveis. Dentre seus componentes estão: Aristoflex® AVC, ésteres de sorbitol derivados do óleo de canola, fosfato de trilaurete-4 (triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado), óleo mineral e palmitato de isopropila (PHARMASPECIAL, 2011).

Para preparar as formulações creme, foi utilizada a base auto-emulsionante não iônica Polawax® (CRODA). Esse tipo de base é muito utilizada em formulações tópicas devido à sua baixa irritação na pele, estabilidade, compatibilidade com eletrólitos e com a maioria dos agentes cosméticos (CRODA, 2011).

O palmitato de isopropila, o óleo de macadâmia e o Phytosqual® (Vevy) foram utilizados como emolientes para auxiliarem no espalhamento e na absorção dos compostos ativos. O umectante propilenoglicol foi utilizado para solubilização do extrato, sendo também um promotor de absorção. Como conservante foi utilizado Nipaguard® CG (Clariant), uma mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona que garante, em baixas concentrações, amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos.

Com o objetivo de minimizar futuras alterações de pH durante o período de armazenamento, o percentual de água das formulações foi substituído por tampão McIlvaine pH 5,0.

4.4.1. Caracterização físico-química das formulações

4.4.1.1. Características organolépticas

As formulações placebo gel, gel-creme e creme, P1, P2 e P3, apresentaram-se aparentemente homogêneas, com coloração branca, aspecto brilhoso e sem separação de fases das formulações gel-creme e creme (P2 e P3) durante todo o período de armazenamento. As formulações gel e gel-creme adicionadas de 4% do extrato de *Protium heptaphyllum*, F1 e F2, apresentaram-se aparentemente homogêneas, com coloração marrom avermelhada característica do extrato, aspecto brilhoso e sem separação de fases da formulação gel-creme (F2). No entanto, a formulação creme adicionada do extrato, F3, perdeu consistência e apresentou separação de fases, sendo, portanto, descartada do estudo.

4.4.1.2. Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência, entre outras (BRASIL, 2004). As formulações gel-creme, P2 e F2, mantiveram-se estáveis frente ao teste de centrifugação sem separação de fases e foram consideradas estáveis e viáveis para este estudo, assim como as formulações gel, P1 e F1, que não apresentaram alteração de consistência durante todo o período de armazenamento.

4.4.1.3. Determinação do pH

Foi observado uma redução mínima do pH após a adição do extrato nas formulações (Tabela 5), o que se deve a substituição da água das formulações pelo tampão Macllvaine pH 5,0. Os valores de pH das formulações foram considerados compatíveis com formulações de uso tópico, uma vez que a pele apresenta pH entre 4,6 – 5,8 (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002).

Tabela 5. Medida do pH das formulações armazenadas a 4ºC.

Formulações	pH
P1 - Gel Aristoflex® (placebo)	5,46
F1 - Gel Aristoflex® (formulação com EP)	5,23
P2 - Gel-creme Hostacerin® (placebo)	5,48
F2 - Gel-creme Hostacerin® (formulação com EP)	5,19

4.4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante das formulações

O método de determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol mostrou-se um método bastante sensível, eficiente e reprodutível, por isso, foi escolhido para avaliação da atividade antioxidante das formulações.

A atividade antioxidante das formulações foi avaliada contemplando a faixa de linearidade do método determinada por curva dose-resposta compreendida entre as concentrações de extrato de 0,3 a 0,7µg/mL. Foram utilizadas quantidades de formulação contendo concentração do extrato de *Protium heptaphyllum* equivalente à do extrato não veiculado e, as porcentagens de inibição foram comparadas.

Como esperado, as formulações P1 e P2 não apresentaram inibição da quimioluminescência, uma vez que não contêm antioxidantes nem extrato. As formulações F1, F2 e o extrato EP não veiculado, na concentração de 0,4µg de extrato/mL, apresentaram porcentagem de inibição da quimioluminescência frente ao sistema xantina/XOD/luminol de 78,64, 75,02 e 79,33%, respectivamente.

Aplicando o teste de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, não foi observada diferença significativa entre a formulação F1 e o extrato EP não veiculado. Já a formulação F2 apresentou uma pequena diminuição, estatisticamente significativa, na porcentagem de inibição da quimioluminescência em relação ao extrato não veiculado, o que pode significar uma interferência dos componentes graxos da formulação na medida da atividade antioxidante do extrato por quimioluminescência. No entanto, não se pode descartar que esta variação pode estar relacionada à variação da precisão do método analítico, uma vez que não foi realizado, neste estudo, a validação desse método. Contudo, estudos realizados por Fonseca (2007) para validar a medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol pelo extrato de própolis mostraram que o desvio padrão relativo (DPR) variou de 2 a 8%.

Desta forma, a variação de atividade observada entre o extrato incorporado na formulação F2 em relação ao extrato não veiculado está dentro da faixa de variação do método analítico.

Os resultados obtidos sugerem que os componentes do extrato responsáveis pela atividade antioxidante não são inativados pelos componentes das formulações gel (F1) e gel-creme (F2).

4.5. Estudo de penetração e retenção cutânea *in vivo*

A pele de camundongos sem pêlos tem sido comumente utilizada nos estudos de penetração cutânea. A vantagem de se utilizar esses animais baseia-se principalmente no fato de serem animais de pequeno porte, de fácil manuseio e de custo relativamente baixo. A ausência de pêlos mimetiza a pele humana e o fato de não ser necessária a remoção dos pêlos evita o risco de danos ao tecido cutâneo (GODIN; TOUITOU, 2007).

Por meio do estudo *in* vivo, utilizando o organismo do animal como um todo, é possível observar a 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, principalmente os lipofílicos, até a derme (MOSER et al., 2001).

Para que as formulações tópicas adicionadas de extrato de *Protium heptaphyllum* 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 pela radiação ultravioleta, principalmente UVA. Portanto, os ensaios de penetração e retenção *in vivo* são de grande importância para os estudos de eficácia fotoquimioproteora, uma vez que garantem a presença de compostos antioxidantes do extrato na epiderme+derme no início da irradiação dos animais.

A penetração e retenção das formulações sobre a pele dos animais foi conduzido por uma hora. Após esse período, foi avaliada a atividade antioxidante da pele sem estrato córneo. O tempo de uma hora de penetração foi escolhido em função dos estudos de eficácia *in vivo* contra os danos da radiação UV, uma vez que a formulação é aplicada uma hora antes da irradiação dos animais.

As amostras de pele que foram tratadas com a formulação F1 demonstraram porcentagem de inibição da quimioluminescência de 29,22% (média de três determinações), correspondente a penetração de uma concentração de extrato de aproximadamente 0,075µg/mL. Porém, as amostras de pele dos animais tratados com F2 não foram capazes de inibir a quimioluminescência em relação ao controle (amostras de pele sem tratamento).

Os resultados da formulação F2 sugerem que houve interação dos componentes do extrato com o conteúdo graxo da formulação gel-creme, impedindo a disponibilização dos compostos antioxidantes na epiderme+derme. Na tentativa de se estabelecer o perfil cromatográfico do extrato de *Protium heptaphyllum* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), observou-se que o este extrato apresenta grande quantidade de substâncias apolares (dados condizentes com a literatura), uma vez que os picos eluíram com fase móvel contendo mais que 80% de solvente orgânico, e os compostos demonstraram ter uma forte afinidade pela fase estacionária C18, corroborando com esta hipótese.

Deduz-se, portanto, que a formulação gel-creme F2 não é adequada para incorporação do extrato de *Protium heptaphyllum*. Por outro lado, a formulação gel F1 foi eficiente em promover a penetração e retenção dos componentes antioxidantes do extrato na pele, o que pode ser explicado devido ao baixo conteúdo graxo da formulação gel que não permitiu sua interação com os componentes apolares presente em grande quantidade no extrato de *Protium heptaphyllum*. Em adição, a apolaridade dos componentes do extrato facilita sua penetração através do estrato córneo de caráter lipofílico (DURAND et al., 2009). Por este motivo, a formulação F1 foi escolhida para a realização dos estudos de avaliação da eficácia *in vivo* contra os danos induzidos pela RUV.

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

A pele sofre diariamente os efeitos deletérios da RUV que põe em risco sua integridade e a manutenção da homeostase celular. A severa depleção dos antioxidantes que compõem o sistema de defesa endógeno (GSH, SOD, CAT), durante o estresse oxidativo, resulta em uma proteção insuficiente e consequentemente, no dano celular (PEUS et al., 2001).

Inúmeros trabalhos demonstram que ativos com propriedades antioxidantes são capazes de manifestar efeitos anti-inflamatórios e anticarcinogênicos na pele, sugerindo a possibilidade de que agentes específicos podem ser usados para alvos definidos e eventos moleculares estabelecidos na prevenção e tratamento de uma variedade de desordens da pele. O uso destes agentes isoladamente ou adicionados em formulações pode ser desenvolvido para quimioprevenção (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

Desta forma, a capacidade do extrato de *Protium heptaphyllum* incorporado na formulação gel de Aristoflex® de reduzir os danos induzidos pela RUV foi avaliada por medida da eficiência da formulação (F1) em proteger a pele da depleção do antioxidante endógeno GSH, pela eficácia anti-inflamatória e pela eficiência em proteger a atividade da enzima superóxido dismutase.

4.6.1. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

A glutationa na sua forma reduzida (GSH) é uma das mais importantes defesas antioxidantes contra EROS, pois além de atuar como cofator para a enzima glutationa 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 (CARINI et al., 2000).

O monitoramento dos níveis de GSH pode ser utilizado para avaliar o efeito preventivo de antioxidantes exógenos na instalação do estresses oxidativo na pele (CARINI et al., 2000), uma vez que a GSH pode ser considerada um dos primeiros sensores na instalação do estresse oxidativo epidermal causado pela RUV (MELONI; NICOLAY, 2003).

O conteúdo de GSH é significativamente reduzido com a exposição à RUV induzindo um aumento nos níveis de EROs (HO et al., 2005). Estudos realizados por Casagrande e colaboradores (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) demonstraram que a radiação UVB induziu uma diminuição dose dependente (0,96 – 2,87J/cm^2) nos níveis de GSH na pele de camundongos sem pêlos. Houve diferença estatística em relação ao grupo controle não irradiado a partir da dose de 1,91J/cm^2, sendo esta, também, estatisticamente diferente da dose final testada (2,87J/cm^2).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a dose de radiação UVB utilizada (2,87J/cm^2) causou depleção de 23,84% nos níveis de GSH da pele dos camundongos quando comparado ao grupo controle que não recebeu irradiação (Figura 8). A administração tópica da formulação F1 (500 mg) foi capaz de inibir a depleção dos níveis de GSH em 91,90%. A formulação placebo P1 sem adição de extrato de *Protium heptaphyllum* não causou inibição da depleção dos níveis de GSH, sugerindo que a atividade da F1 é atribuída ao extrato incorporado. Além disso, no grupo tratado com a formulação F1 e não irradiado foi observado um aumento de 34,15% nos níveis de GSH quando comparado com o grupo não tratado e não irradiado, evidenciando a penetração dos componentes do extrato na pele, bem como a sua atividade antioxidante.

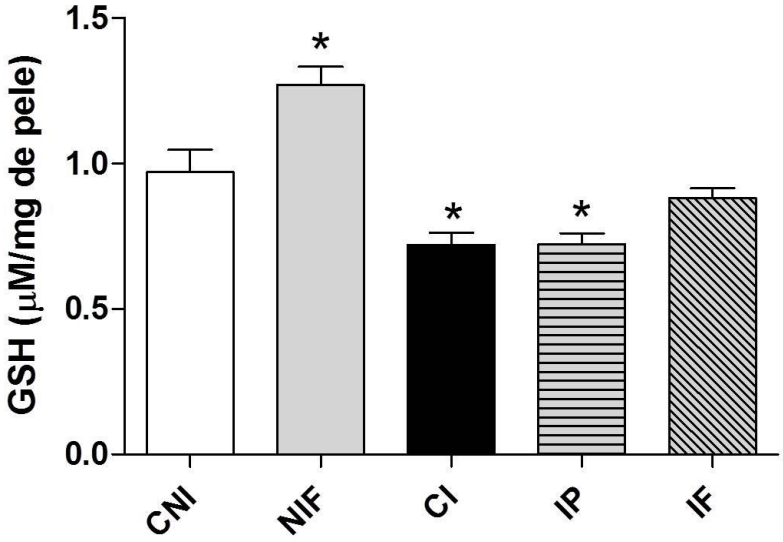

Figura 8. Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação gel F1 adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* pela recuperação dos níveis de GSH depletados pela RUV. CNI = controle não irradiado, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato, CI = controle irradiado, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e IF = irradiado e tratado com a formulação contendo extrato. Os resultados representam a média de 6 animais por grupo ± 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.

Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG feita pela enzima glutationa redutase. Sob condições de excesso de agentes oxidantes haverá desequilíbrio entre a regeneração de GSH e a produção de GSSG,

estabelecendo o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O extrato de *Protium heptaphyllum* mostrou uma potente atividade antioxidante nos ensaios *in vitro*, desta forma, a recuperação dos níveis de GSH pode ser explicada pelo fato de que o consumo de GSH na pele tratada com a formulação contendo extrato foi menor quando comparada a uma pele desprotegida.

4.6.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase

Desde que Bradley e colaboradores (1982), utilizando a MPO como marcador para determinar a presença de polimorfonucleares (PMNs) na pele, a atividade da MPO tem sido amplamente utilizada como uma enzima marcadora para medir e quantificar o conteúdo de PMNs em vários tecidos. Sugere-se que o ensaio de MPO é um método simples e específico para quantificar PMN acumulado ou infiltrado em vários processos patológicos que acompanham a inflamação (XIA; ZWEIER, 1997).

Estudos conduzidos por Casagrande e colaboradores (2006) descreveram que a radiação UVB induz um aumento dose dependente na atividade de MPO na pele de camundongos sem pêlos. No presente trabalho, a irradiação UVB (2,87J/cm^2) conduziu um aumento de 58,75% na atividade de MPO comparado ao grupo controle sem irradiação (Figura 9).

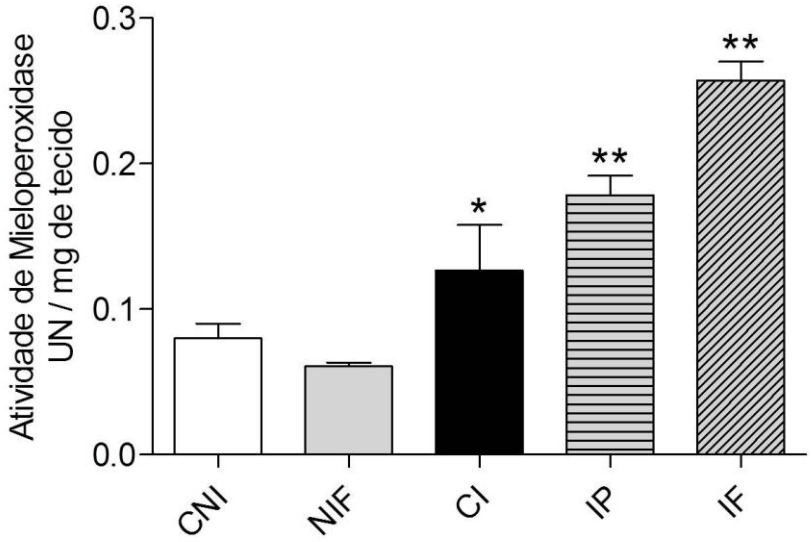

Figura 9. Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação gel F1 adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO). CNI = controle não irradiado, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo extrato, CI = controle irradiado, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e IF = irradiado e tratado com a formulação contendo extrato. Os resultados representam a média de 6 animais por grupo ± DP. * $p<0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) e ** $p<0,05$ diferença significativa comparado aos controles não irradiado (CNI) e irradiado (CI), utilizando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A administração tópica da formulação placebo P1 aumentou em 40,80% a atividade de a MPO em relação ao controle irradiado (CI). A formulação F1 contendo EP não foi capaz de inibir o processo inflamatório, pelo contrário, a atividade da enzima no grupo irradiado tratado com a formulação F1 aumentou em 103% em relação ao grupo controle irradiado (CI).

Por outro lado, não houve diferença significativa entre o controle não irradiado e o grupo tratado com a formulação F1 não irradiado, o que indica que os componentes da formulação e o extrato não irradiado não foram capazes de alterar os níveis normais de MPO presente na pele. Além disso, foi observada uma diferença de comportamento entre os animais dos dois grupos que receberam a formulação F1. Após a irradiação, os animais do grupo irradiado (IF) estavam frequentemente se coçando, enquanto que os animais do grupo não irradiado (NIF) não apresentaram este tipo de comportamento. Os resultados sugerem que a formulação F1 não foi irritante. O aumento do processo inflamatório observado com

a aplicação e irradiação das formulações P1 e F1 possivelmente ocorreu devido à degradação de componentes da formulação e/ou do extrato pela radiação UV.

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações do extrato pela radiação, foram realizados ensaios de caracterização química e atividade antioxidante do extrato de *Protium heptaphyllum* irradiado. Os resultados mostraram que houve um aumento na atividade antioxidante avaliada pela inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol com a irradiação. O valor de IC_{50} obtido para o extrato irradiado foi 0,195µg/mL, enquanto que para o extrato não irradiado foi 0,232µg/mL. Dado que corrobora com o aumento no teor de polifenóis totais de 227,81µg de EAG/mg de extrato não irradiado para 246,46µg de EAG/mg do extrato irradiado. No entanto, houve apenas uma pequena redução do teor de flavonóides de 10,85µg de EQ/mg de extrato não irradiado para 9,8µg de EQ/mg de extrato irradiado, o que pode ser considerado erro do próprio método.

Os polifenóis apresentam uma grande diversidade estrutural, o que pode influenciar na sua biodisponibilidade. Pequenas moléculas, como as catequinas, podem ser rapidamente absorvidas, enquanto que moléculas com alta massa molecular possuem baixa absorção. A penetração dos polifenóis na 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). Poucos estudos elucidam a relação entre componentes comumente usados em formulações tópicas e alterações de toxicidade pela radiação UV. Contudo, sabe-se que promotores de absorção, devido às alterações que causam no estrato córneo, tendem a causar inflamação local, eritema, inchaço, dermatites e outras reações na pele (KARANDE; MITRAGOTRI, 2009). A grande quantidade de promotores de absorção presente nas formulações P1 e F1 pode, portanto, ter contribuído para o aumento do processo inflamatório.

Considerando os resultados de atividade antioxidante do extrato irradiado e não irradiado e a eficiência da formulação em impedir a depleção do GSH *in vivo*, em adição aos estudos de citotoxicidade que demonstraram que o extrato irradiado aumentou a viabilidade celular, sugere-se que o aumento da atividade da MPO observada na pele dos animais tratados com as formulações placebo e adicionada de extrato (P1 e F1) pode ser devido a produtos gerados pelos componentes da formulação sob os efeitos da radiação.

Novos ensaios serão realizados para uma melhor compreensão dos efeitos das formulações P1 e F1 sob a radiação UVB, como estudos de irritação cutânea e a avaliação das alterações histopatológicas causadas pela RUV, uma vez que o aumento na atividade da enzima MPO pode ser devido à infiltração de maior número de neutrófilos ou pela maior ativação destes.

4.6.3. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo*

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversação do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre as enzimas antioxidantes presentes no organismo, a SOD desempenha importante papel como sequestrador de $O_2^{\bullet -}$, estando envolvida no sistema de defesa celular contra citotoxicidade e morte celular (VILELA et al., 2011).

Estudos sugerem que o decréscimo na atividade da SOD causado pela radiação UVB deve-se tanto ao aumento no consumo das enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pela radiação quanto a uma destruição nos centros ativos de cobre e ferro da enzima via reação de Fenton (CHEVION, 1988; PENCE; NAYLOR, 1990). Além disso, de acordo com a teoria do fotoenvelhecimento da pele, a geração de EROs resulta na formação de cross-links protéicos no colágeno e em certas enzimas como a catalase e a SOD (DALLE CARBONARE; PATHAK, 1992).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma redução de 48,09% na atividade da SOD no controle irradiado (CI) em relação ao controle não irradiado (CNI) (Figura 10). A administração tópica da formulação gel placebo P1 não inibiu a redução da atividade da SOD causada pela radiação. Por outro lado, com a administração tópica da formulação contendo extrato de *Protium heptaphyllum* F1 foi possível observar um aumento de 45,75% na atividade da SOD em relação ao controle não irradiado, evidenciando a capacidade dos componentes do extrato de sequestrar radicais superóxido e confirmando os resultados observados nos ensaios *in vitro* de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol.

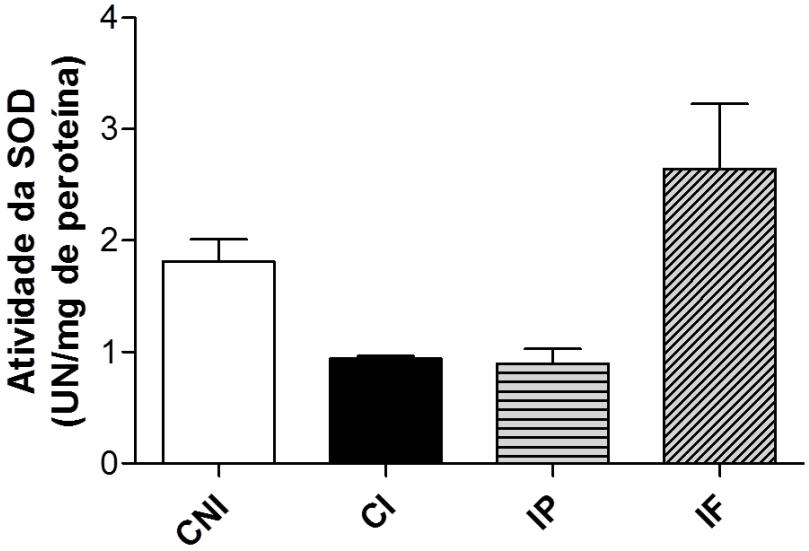

Figura 10. Medida da atividade da SOD na pele de camundongos sem pelos. CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e IF = irradiado e tratado com a formulação contendo extrato de *Protium heptaphyllum*. Os resultados representam a média de 3 animais por grupo ± DP.

Considerando os ensaios de eficácia *in* vivo contra os danos produzidos pela RUV, o extrato de *Protium heptaphyllum* incorporado em formulação gel parece apresentar maior atividade frente aos efeitos da radiação UVA, já que esta apresenta um papel importante na geração de radicais livres, enquanto que o efeito inflamatório caracterizado por eritema, edema e vermelhidão, é atribuído a ação da radiação UVB nas camadas superiores da pele (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

Estudos conduzidos por Vilela e colaboradores (2011) demonstraram que os filtros solares 3-benzofenona, octil metoxicinamato e salicilato de octila diminuíram a atividade da SOD em 69% na pele de camundongos sem pelos em relação ao controle não irradiado, sugerindo que a presença destes filtros na epiderme viável quando expostos à RUV pode reduzir a atividade da SOD tanto pela inibição da enzima, quanto pela geração de radicais livres decorrentes de seus produtos.

Há evidências de que os filtros solares podem não ser suficientemente seguros, principalmente devido à fotoinstabilidade de filtros solares orgânicos, uma vez que, após a exposição à radiação, sofrem processos de fotólise que promovem a dissociação desses agentes em fragmentos reativos e de fotoisomerização perdendo suas propriedades fotoprotetoras (DÍAZ-CRUZ; LLORCA; BARCELÓ,

2008). A fotoestabilidade dos filtros solares sob a radiação UVB é normalmente alta, porém, sofre uma perda considerável na região do espectro de UVA. A foto decomposição das moléculas dos filtros solares pela radiação UVA provoca o aumento da formação de radicais livres e outros intermediários reativos tóxicos e, consequentemente, o aumento dos danos induzidos diretamente pela UVA à pele. Por outro lado, a combinação dos filtros com substâncias antioxidantes, parece reduzir o efeito foto-oxidativo (DAMIANI et al., 2006).

Assim, a utilização do extrato de *Protium heptaphyllum* adicionado em formulações fotoprotetoras contendo filtros solares orgânicos pode possibilitar a redução de fotodanos. Novos estudos devem ser realizados de modo a estabelecer sua segurança de uso para prevenir e/ou tratar os danos induzidos pela RUV na pele.

5. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, as principais conclusões foram:

- Os extratos das espécies amazônicas estudados, *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum*, e *Miconia minutiflora*, apresentaram potente atividade antioxidante devido à atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radical $DPPH^{\bullet}$, atividade inibidora da peroxidação lipídica e sequestradora de radicais superóxido e hidroxila de forma dose-dependente. Os extratos também demonstraram certa capacidade queladora de íons ferro;

- Os extratos apresentaram um alto teor de polifenóis e flavonóide, porém não houve uma correlação entre teor de polifenóis e o potencial antioxidante;

- Os extratos *Eugenia biflora*, *Protium heptaphyllum*, e *Miconia minutiflora* apresentaram efeito tóxico, frente a células de fibroblasto, em concentrações maiores que aquelas que promoveram atividade antioxidante *in vitro*, sendo extrato de *Eugenia biflora* o que se mostrou mais tóxico;

- Quando irradiado, o extrato irradiado de *Miconia minutiflora* teve um aumento de citotoxicidade, enquanto que o de *Protium heptaphyllum* se tornou menos citotóxico sendo, portanto, o mais indicado para os estudos de eficácia *in vivo* contras os danos produzidos pela RUV;

- Dentre as três formulações desenvolvidas com extrato de *Protium heptaphyllum*, a que demonstrou maior aplicabilidade, tanto no que diz respeito às características físico-quimicas quanto à manutenção da atividade antioxidante, foi a formulação gel de Aristoflex®. Além disso, a formulação gel de Aristoflex® permitiu penetração e retenção dos componentes antioxidantes do extrato na pele dos camundongos sem pêlos;

- Os estudos de eficácia *in vivo* demonstraram que a formulação gel de Aristoflex® adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* foi capaz de proteger a depleção do antioxidante endógeno GSH induzida pela radiação ultravioleta. Esta proteção, provavelmente, deve-se ao fato do extrato neutralizar ou impedir a

formação de EROs devido à exposição à radiação. Com isso, a oxidação do GSH foi menor em relação à oxidação na pele exposta à radiação sem tratamento;

- A aplicação da formulação gel adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* mostrou ser capaz de recuperar a atividade da enzima SOD reduzida com a exposição à RUV;

- O tratamento com a mesma formulação gel adicionada do extrato de *Protium heptaphyllum* não foi capaz de reduzir a atividade da mieloperoxidase aumentada após a exposição da pele à radiação. Observou-se, ainda, um aumento desta atividade com a aplicação das formulações placebo e adicionada do extrato em relação à pele irradiada sem tratamento, sugerindo a possível fotodegradação dos componentes da formulação;

- A investigação dos efeitos da radiação sobre a formulação e a indução de processo inflamatório, através de estudos de irritação cutânea e ensaios histológicos ou, ainda, o desenvolvimento de novas formulações, adicionadas ou não de filtros solares, será necessária para melhor compreender e comprovar os mecanismos pelos quais o extrato de *Protium heptaphyllum* pode exercer seu papel de agente fotoquimiopreventivo.

Há poucos estudos na literatura sobre os extratos *Eugenia biflora*, *Eugenia protenta*, *Protium heptaphyllum*, e *Miconia minutiflora*, embora o potencial destas espécies seja promissor. Os resultados obtidos por este trabalho contribuem significativamente para o futuro desenvolvimento e aplicabilidade de extratos vegetais como fotoquimiopreventivos.

6. Referências

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research,** v. 571, p. 153-173, 2005.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of α and β-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006.

ARAÚJO, I. S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

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

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de Protium heptaphyllum March. Química Nova, v. 25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.

BANDEIRA, P. N.; MACHADO, M. I. L.; CAVALCANTI, F. S.; LEMOS, T. L. G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of Protium heptaphyllum (Aubl.) March. Journal of Essential Oil Research, v. 13, n. 1, 2001.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOLANN, B. J.; ULVIK, R. J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. **Biochemical Journal**, v. 243, p. 55-59, 1987.

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.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil con-tent with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206–209, 1982.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária – ANVISA. **Guia estabilidade de produtos cosméticos.** Série qualidade 1, 2004. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm>. Acesso em 02 de maio de 2009.

BRENNAM, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K. C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VARANI, J.; VOORHEES, J. J. 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. 43-48, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52c, p. 302-310, 1978.

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; ALMEIDA E SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P.; STÁBELI, R. G. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 20, n. 6, p. 1001-1023, 2009.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Il Farmaco**, v. 55, p. 526-534, 2000.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology b: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico químico e avaliação da eficácia *in vivo***. 2005. 229f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CHANG, C.C., YANG, M.H., WEN, H.M., CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHEVION, M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 5, p. 27-37, 1988.

CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidative effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology,** v.482, p.281-285, 2003.

CITÓ, A. M. G. L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M. M.; CHAVES, M. H. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4. p. 4-7, 2006.

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

CRODA. **Literatura Polawax NF**. Disponível em <http://www.croda.com.br/>. Acesso em 11 de fevereiro de 2011.

DALLE CARBONARE, M.; PATHAK, M. A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 14, p. 105-124, 1992.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, p. 204–213, 2006.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free radicals in cutaneous biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 671-675, 1994.

DÍAZ, A. N.; SÁNCHEZ, F. G.; GARCÍA, J. A. G. Chemical indicators as enhancers of the chemiluminescent luminol-H202-horseradish peroxidase reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 87, p. 99-103, 1995.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 873-887, 2008.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 287-295, 2005.

DURAND, L.; HABRAN, N.; HENSCHEL, V.; AMIGHI, K. *In vitro* evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 31, p.279-292, 2009.

EINBOND, L. S.; REYNERTSONA, K. A.; XIAO-DONGLUO; BASILEB, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28, 2004.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 19, p. 56-72, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FISHER, G.J.; CHOI, H.C.; BATA-CSORGO, Z.; SHAO, Y.; DATTA, S.; WANG, Z. Q.; et al. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 219–226, 2001.

FISHER, G.J.; WANG, Z-Q.; DATTA, S.C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **New England Journal of Medicine,** v. 337, p. 1419-1428, 1997.

FISHER, G.J. DATTA, S.C.; TALWAR, H.S. WANG, Z-Q.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. The molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoic antagonism. **Nature,** v. 379, p. 335-338, 1996.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C.D.; VICENTINI, F. T. M. C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. R.; FONSECA, M. J. V. 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, p. 596-601, 2010.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 169f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FREIRE, B. F. A.; QUELUZ, T. H. A. T.; Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **Jornal de pneumologia**, v. 21, n. 4, p. 180-184, 1995.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erytrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, p. 685-692, 2000.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.

GUARANTINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Quimica Nova**, v.30, n.1, p. 206-213, 2007.

HALLIWELL, B.; AESHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The caracterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3ºed, New York: Pergamon Press, p.1-104, 1990.

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

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid Antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HENSLEY, K. ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1456-1462, 2000.

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

HO, J. N.; LEE, Y. H.; PARK, J. S.; JUN, W. J.; KIM, H. K.; HONG, B. S. SHIN, D. H.; CHO, H. Y. Protective effects of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1244-1248, 2005.

HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of α, β-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 48-52, 2008.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HRUZA, L.L.; PENTLAND, A.P. Mechanisms of UV-induced inflammation**. The Journal of Investigative Dermatology,** v. 100, p. 35S-41S, 1993.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 305, p. 75-80, 2001.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2010.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Site visitado em: 13 de novembro de 2011.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Molecular Cell**, v. 11, p. 293-302, 2003.

KANGROTONDO, C.H.; MILLER, C.C.; MORRISON, A.R.; PENTLAND, A.P. Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity. **The American Journal of Physiology**, v.264, p. c396-c401, 1993.

KARANDE, P., MITRAGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 2362–2373, 2009.

KATIYAR, S.K.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 2, p. 287-294, 2001.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 121-126, 1994.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, p.329-339, 2004.

LAHMANN, C.; YOUNG, A.R.; WITTERN, K.P. BERGEMANN, J. 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 (6), p.657-663, 2001.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudos da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não de vitaminas A, E ou ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 1-8, 2002.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BRADA, M. V. L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, v. 14, n. 79, p. 8-11, 1992.

MARQUES, D. D.; SARTORI, R. A.; LEMOS, T. L. G.; MACHADO, L. L.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010.

MATÉS, J. M.; SÁNCHES-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 339-345, 1999.

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

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, p. 609-613, 2003.

MISRA, H. P.; SQUATRITO, P. M. The role of superoxido anion in peroxidase-catalyzed chemiluminescence of luminol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.215, n. 1, p. 59-65, 1982.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, n. 2, p. 103-112, 2001.

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.

OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytica Chimica**, v. 95, p. 351-388, 1979.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L. et al. Protective effect of α and β-amyrin, a triterpene mixture from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. Journal of Ethnopharmacology, v. 98, n. 1-2, p. 103-108, 2005a.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I.; LIMA, A. F. et al. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α and β-amyrin, a triterpene mixture isolated from Protium heptaphyllum resin in mice. Life Sciences, v. 77, n. 23, p. 2942-2952, 2005b.

OLIVEIRA, F. A.; LIMA JR, R. C. P.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. et al. Pentacyclic triterpenoids α, β-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 78, n. 4, p. 719-725, 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G..; LIMA JR, R. C. P. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004b.

PAREJO, I.; CODINA, C.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH free radicals assays. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 507-512, 2000.

PASCUAL, C.; DEL CASTILHO, M. D.; ROMAY, C. A new luminol sensitized chemiluminescence method for determination of superoxide dismutase. **Analytical Letters**, v. 25, p. 837-849, 1992.

PENCE, B. C.; NAYLOR, M. F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. **The Society of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 2, p.213-216, 1990.

PEUS, D.; MEVES, A.; POTT, M.; BEYERLE, A.; PITTELKOW, M.R. Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. **Free Radical Biology & Medicine,** v.30, n.4, p.425-432, 2001.

PHARMASPECIAL. **Informativo Técnico Hostacerin® SAF**. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/Lit_HOSTACERIN_SAF.pdf>. Acesso em 11 de fevereiro de 2011.

PHARMASPECIAL. **Inovação e tecnologia em bases dermo-cosméticas de preparo instatâneo**. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/destaque1/2005_Dest_BasesDermocosm.pdf>. Acesso em 11 de fevereiro de 2011.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

RAMPAUL, A.; PARKIN, I.P.; CRAMER, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, p. 138–148, 2007.

RIJKEN, F.; KIEKENS, R. C. M.; WORM, E.; LEE, P. L.; WEELDEN, H.; BRUIJNZEEL, P. L. B. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 184-189, 2006.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Miconia* spp**. 2007. 157 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; PIGOSO, A. A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, A. S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 136-142, 2002.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vivo* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2007.

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

SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure – radical scavenging activity relationships of flavonoids, **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2058-2070, 2006.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidant and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 4, p. 470-475, 1994.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanism in murine epidermis and dermis and their response to ultraviolet light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 1993.

SIERENS, J.; HARTLEY, J.A.; CAMPBELL, M.J.; LEATHEM, A.J.C; WOODSIDE, J.V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research**, v. 485, p. 169-176, 2001.

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. O destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 124-132, 2005.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology,** New York, v. 299, p. 152-172, 1999.

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**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

STEENVOORDEN, D.P.T.; BEIJERSBERGEN, V.; HANEGOUWEN, G.M.J. STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology,** v. 17, p. 463-516, 2001.

SUSUNAGA, G. S.; SIANI, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 709-711, 2001.

TEDESCO, A. C.; MARTÍNEZ, L.; GONSÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v.30, n. 5, p.561-575, 1997.

TRUSH, M.A.; EGNER, P.A.; KENSLER, T.W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 143-147, 1994.

VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATIYAR. S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 927-936, 2003.

VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; CIAMPO, J. O. D.; WOLGA, N. O.; PITOL, K. L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. 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, p. 948-957, 2008.

VICENTINI, F.T.M.C.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: A liquid crystalline formulation. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, p.805-810, 2007.

VILELA, F. M. P.; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; FONSECA, M. J. V. 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**, in press, 2011.

VIOUX-CHAGNOLEAU, C.; LEJEUNE, F.; SOK, J.; PIERRARD, C.; MARIONNET, C.; BERNERD, F. Reconstructed human skin: from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, p.S1-S12, 2006.

WILGUS, T.A.; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; KUSEWITT, D.F.; RUBAL, P.A.; OBERYSZYN, T.M. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflamamation and tumor formation with topical celecoxib treatment. **Molecular Carcinogenesis**, v. 38, p. 49-58, 2003.

WOISKY, R.G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** 1996. 128f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 245, n. 1, p. 93-96, 1997.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 1, S1-S8, 2005.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iraon with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 257, n. 1, p. 40-44, 1998.

ZOGHBI, M.G.; MAIA, J. G.S.; LUZ, A. I. R. Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 5, 1995.

ZUCKER, S.; PEI, D.; CAO, J.; LOPEZ-OTIN, C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). **Current Topics in Developmental Biology**, v. 54, p. 1-74, 2003.