UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou
fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia
brasiliensis***

Sônia Aparecida Figueiredo

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou
fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia
brasiliensis***

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: Sônia Aparecida Figueiredo

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

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 21/03/2013. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2013

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.

Figueiredo, Sônia Aparecida

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*. Ribeirão Preto, 2013. 101 p.; 30cm.

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

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira

1. *Garcinia brasiliensis*. 2. Atividade Antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Fotoproteção. 5. Fotoquimioproteção. 6. Método *in vitro*. 7. Método *in vivo*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sônia Aparecida Figueiredo

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*.

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: Sônia Aparecida Figueiredo

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A minha mamãe, Elza, a meu papai,
João Reis (in memoriam) e aos meus
demais familiares pelo apoio e amor
incondicional.*

Agradecimientos

A Deus, pela presença contínua em minha vida, pela saúde e pela força para enfrentar todos os obstáculos.

À minha orientadora, amiga e educadora Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca pelo incentivo, conhecimentos e valores transmitidos, dedicação e pelo exemplo de profissionalismo e ser humano.

Ao meu colaborador Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos e a todos os membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM, da Universidade Federal de Alfenas – Unifal/MG por terem disponibilizado o extrato vegetal, por permitirem a realização de alguns experimentos e a utilização de alguns equipamentos necessários para a conclusão deste estudo e pela amizade e carinho que sempre me receberam.

Aos amigos e companheiros de laboratório que estiveram ao meu lado durante esses anos: Ana Cláudia, Ana Luiza, Daniele, Fernanda, Frederico, Livia, Marília, Mariana, Mirela, Rebeca, Ricardo, Rodrigo, Sílvia e Vanessa.

A Fernanda M. P. Vilela pela colaboração, incentivo, ensinamentos na realização deste estudo e também pela amizade.

Ao técnico José Roberto Jabor pela disponibilidade, dedicação, alegria e amizade.

Aos técnicos Aninha, Cris, Henrique, José Oreste, José Maria, Luizão, Mariana, Mário e Yara pela preciosa contribuição ao meu estudo.

Aos professores Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dr. Carlos Curti e Dra. Yara Maria Lucisano Valim, Maria Vitória Lopes Badra Bentley e Nieve A. J. C. Furtado e seus técnicos por disponibilizarem o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha da FMRP-USP pela realização de uma parte das análises das amostras *in vivo*.

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

Aos funcionários da FCFRP-USP, como o Sr. Antônio (Portaria), Sra. Evanira (Copa), Vera (Limpeza) e demais pessoas pelo auxílio, gestos de carinho e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido.

Aos amigos Amanda, Ana Paula, Bianca, Carlinha, Cris, Danni, Deidi, Elisson, Gaby, Ivan, Luciana, Mariza, Maurette, Samir, Silvana e Tais pelos gestos e palavras de incentivo e pela amizade sincera.

Aos amigos de Elói Mendes, Alfenas, Campinas e Ribeirão Preto, pessoas queridas com as quais aprendi muito e compartilhei momentos importantes da minha vida.

Aos “anjos” amigos Dimas/Rita e família, Enedi/Lena e família, Fernanda e família, Sra. Laura e família, Elisa e família, que contribuíram cada um de uma maneira para a realização de meu sonho.

A minha mamãe, pelo amor e apoio incondicionais, razão do meu viver. Amo inexplicavelmente.

A meu papai (*in memorian*), pelo amor, exemplo de caráter, honestidade e ser humano. Sei que este momento seria de muito orgulho. Amo eternamente.

Aos meus irmãos, cunhados e minha sobrinha/afilhada pelo apoio, compreensão e confiança depositada durante toda a minha caminhada.

As minhas vovós Ana e Meire (*in memorian*) que sempre estiveram presentes em cada momento com suas orações.

Aos meus familiares que, mesmo a distância, contribuíram e apoiaram mais uma conquista.

A todos que participaram e contribuíram para mais esta conquista.

Muito obrigada!

*“Preparar o futuro
significa fundamentar o presente”.
(Antoine de Saint-Exupéry)*

RESUMO

FIGUEIREDO, S. A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (EEEGb).** 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A radiação solar ultravioleta (RUV) pode induzir efeitos à pele devidos a sua ação direta ou indireta, por meio da geração de radicais livres. Esses efeitos podem provocar diversas lesões na pele humana como o câncer de pele. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012), este tipo de câncer corresponde a 25% de todos os tumores diagnosticados. Como medida profilática de proteção da pele contra os efeitos da radiação solar pode-se citar o uso de protetores solares, produtos tópicos adicionados de filtros solares UV sintéticos com propriedades de absorção e reflexão dos raios solares, e como medida preventiva é recomendado o uso de fotoquimioprotetores, produtos tópicos ou de administração oral incorporados de extratos vegetais ou substâncias naturais isoladas com atividades antioxidante e/ou sequestradora de radicais livres e atividade anti-inflamatória. Os protetores solares são considerados produtos OTC, em alguns países, e por isso devem ter sua eficácia comprovada por métodos *in vitro* ou *in vivo* padronizados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* usando métodos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. O extrato foi caracterizado quimicamente por medida dos teores de flavonoides, polifenóis e lipídios e funcionalmente pela determinação da atividade antioxidante e/ou sequestradora de radicais livres por diferentes métodos *in vitro*. A citotoxicidade e fotoestabilidade do extrato, como também, o potencial fotoprotetor do extrato e das formulações adicionadas deste em diferentes concentrações foram avaliados *in vitro* por medida da viabilidade celular de cultura de células de fibroblastos (L929). A eficácia fotoprotetora e/ou fotoquimioprotetora da formulação adicionada do extrato foi testada *in vivo* por medida das quantidades de GSH endógeno e das interleucinas IL-1 β e TNF- α , como também, pela medida da atividade da mieloperoxidase, usando os camundongos hairless, como modelo animal. Os teores de flavonoides e polifenóis de 3,4 mg EQ/g e 69,84 mg EAG/g, respectivamente, foram menores àqueles de outros extratos vegetais. Os menores teores de flavonoides e polifenóis refletiram na menor atividade antioxidante desse extrato que apresentou valores de IC₅₀ de 47,47 μ g/mL e 425,06 μ g/mL para atividade antioxidante determinada pelos métodos de DPPH $\cdot$ e peroxidação lipídica, respectivamente. O teor de lipídio encontrado foi de 45%, isto sugere que esse extrato deve ser armazenado em condições controladas para minimizar a sua instabilidade por meio da oxidação dos lipídios por reações oxidativas. Os estudos de citotoxicidade mostraram que o extrato na concentração de 25 μ g/mL diminuiu em 40% a viabilidade das células L929. A citotoxicidade do extrato foi maior quando exposto à radiação UVA que à UVB, sugerindo que este extrato pode ser mais fotoinstável à radiação UVA. Nos testes de fotoproteção empregando culturas de células, o extrato na concentração de 100 mg/mL e formulação adicionada de 20% de extrato aumentaram a viabilidade das células L929 expostas à radiação UVB na mesma proporção àquela do protetor solar comercial com FPS 15. Nos testes *in vivo*, a formulação adicionada de 20% de extrato mostrou eficácia fotoprotetora, protegeu o GSH da depleção, não permitiu o aumento da atividade da mieloperoxidase e das quantidades das citocinas, IL-1 β e TNF- α , na pele exposta à radiação UVB.

Palavras chave: *Garcinia brasiliensis*, atividade antioxidante, citotoxicidade, fotoproteção, fotoquimioproteção, método *in vitro*, método *in vivo*.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, S. A. ***In vitro* and *in vivo* photochemical/photoprotective potential of epicarp ethanolic extract of *Garcinia brasiliensis* (GbEEE)**. 2013. 101 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The solar ultraviolet radiation (UVR) can induce harmful effects to the skin by direct action or through the generation of free radicals. These effects can cause various skin lesions such as skin cancer. According to the National Institute of Cancer (INCA, 2012) this type of cancer accounts for 25% of all tumors diagnosed in Brazil. In order to protect the skin against the effects of solar radiation it is recommended the use of sunscreens and topical products added to synthetic sunscreens with properties of absorption and reflection of solar rays. Moreover it is increasing the interest in the use of photochemoprotectors including topical or oral products incorporated with plant extracts or natural substances isolated with antioxidant and/or free radical scavenging and anti-inflammatory activity. Sunscreens are considered OTC products, in some countries, and therefore must have proven effective for *in vitro* or *in vivo* standardized. Thus, the present study aimed to investigate the photochemical/photoprotective potential of the ethanolic extract of the *Garcinia brasiliensis* epicarp using *in vitro* and *in vivo* methods, respectively. The extract was chemically characterized by measuring the levels of flavonoids, polyphenols and lipids and functionally by determining the antioxidant activity and/or free radical scavenging using different methods *in vitro*. The cytotoxicity and photostability of the extract and the photoprotective potential of the extract and formulations added extract with different concentrations of the extract were assessed *in vitro* by measurement of cell viability using cell culture of fibroblasts (L929). The photochemical/photoprotective effect of the formulation added with the extract was tested *in vivo* by measuring the amounts of endogenous GSH and interleukins IL-1 β and TNF- α , besides by measuring myeloperoxidase activity using hairless mice as an animal model. The determined levels of flavonoids and polyphenols of 3.4 mg EQ/g and 69.84 mg GAE/g, respectively, were considered lower than those observed in other plant extracts. The lower levels of flavonoids and polyphenols reflected in lower antioxidant potential of the extract which showed IC₅₀ values of 47.47 and 425.06 mg/mL for antioxidant activity determined by DPPH• and lipid peroxidation methods, respectively. The lipid content was found to be 45%, which suggests that this extract must be stored under controlled conditions to minimize their instability by oxidation of the lipids by oxidative reactions. Cytotoxicity studies showed that the extract at a concentration of 25 mg/mL decreased in 40% the viability of L929 cells. The cytotoxicity of the extract was higher when exposed to UVA than to UVB, suggesting that this extract might be more photoinstable to UVA radiation. In photoprotection tests employing cell culture the extract (100 mg/mL) and the formulation added with 20% of the extract increased the viability of L929 cells exposed to UVB radiation at the same rate to that observed when it was used a commercial sunscreen with an SPF of 15. *In vivo* results showed that the formulation added with 20% of the extract showed a photoprotective effect when observed the reduction of GSH depletion in treated mice as such as the reduction of myeloperoxidase activity and amounts of cytokines IL-1 β and TNF- α in treated skin exposed to radiation UVB in comparison to the non-treated irradiated control.

Keywords: *Garcinia brasiliensis*, antioxidant activity, cytotoxicity, photoprotection, photochemioprotection, *in vitro* method, *in vivo* method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A árvore, flores e frutos da espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	09
Figura 2.	Espectro de emissão da lâmpada UVA (400-320 nm).....	20
Figura 3.	Esquema da caixa de irradiação utilizada para exposição dos animais à radiação UVB.....	23
Figura 4.	Percentual de redução do radical DPPH [*] em função do Log das concentrações de 0,5 a 4 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i>	34
Figura 5.	Percentual de inibição da peroxidação lipídica em função do Log das concentrações de 0,031 a 4,0 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i>	37
Figura 6.	Percentual de inibição da luz emitida no sistema xantina/XOD/luminol em função do Log das concentrações de 0,031 a 4 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i>	38
Figura 7.	Cromatograma do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	40
Figura 8.	Espectros de absorção no UV/Visível.....	40
Figura 9.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com o extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> em uma faixa de concentração de 1,56 a 50 µg/mL.....	43
Figura 10.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com concentrações de 1,56 a 50 µg/mL do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> não irradiado e irradiados com a radiação UVA.....	45

Figura 11.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com concentrações de 1,56 a 50 µg/mL de extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> não irradiados e irradiados com radiação UVB.....	46
Figura 12.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratadas com protetores solares comerciais da marca A e da marca B expostas à radiação UVB.....	49
Figura 13.	Relação entre o percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) versus o Log dos FPS de protetores solares comerciais.....	50
Figura 14.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com diferentes soluções de extratos vegetais na concentração de 50 mg/mL expostos à UVB.....	51
Figura 15.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com o extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> bruto e em diferentes concentrações expostas à radiação UVB.....	52
Figura 16.	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com formulações adicionadas de diferentes concentrações do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> expostas à radiação UVB.....	54
Figura 17.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da formulação adicionada do extrato etanólicodo epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> pela recuperação dos níveis de GSH depletados.....	57
Figura 18.	Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da formulação adicionada do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> no processo de inibição da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	59
Figura 19.	Concentração de IL-1β na pele do dorso de camundongos sem pelos tratados com a formulação adicionada de 20% do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> expostos à radiação UVB.....	60

Figura 20.	Concentração de TNF- α na pele do dorso de camundongos sem pelos tratados com a formulação adicionada de 20% do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i> expostos à radiação UVB.....	61
-------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Rendimento do processo de extração, teores de polifenóis totais, flavonoides e lipídios encontrados nos extratos etanólicos de <i>Garcinia brasiliensis</i>	30
Tabela 2.	Comparação entre os valores de IC ₅₀ obtidos pelos extratos etanólicos de <i>Garcinia brasiliensis</i> nos diferentes ensaios da atividade antioxidante.....	39
Tabela 3.	Composição e classificação de filtros UV orgânicos e inorgânicos dos protetores solares comerciais das marcas A e B com fatores de proteção solar 15, 30 e 60.....	48
Tabela 4.	Composição percentual dos componentes da formulação cosmética base.....	53

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANAVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a curva
BCC	Carcinoma das Células Basais
BZ-3	Benzofenona-3
C+	Controle positivo
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ECC	Extrato de Calêndula Concentrado
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EQ	Equivalente de quercetina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de Proteção Solar

FP-UVA	Fator de Proteção UVA
<i>Gb</i>	<i>Garcinia brasiliensis</i>
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Rd	Glutathione-redutase
GSSG	Glutathione disulfide
GPX-Px	Glutathione peroxidase
H•	Hidrogênio radicalar
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium Bromide
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração que inibe 50%
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-1 α	Interleucina 1-alfa
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-1R I	Receptor de IL-1 tipo I
IL-1R II	Receptor de IL-1 tipo II
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Infravermelho
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio dibásico
LFQM	Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
LPS	Lipopolissacarídeo

MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
MS	Mass Spectroscopic
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de Sódio monobásico
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κβ	Factor Nuclear kappa Beta
NIR	Infravermelho próximo
O ₂ ⁻	Oxigênio
OH ⁻	Radical hidroxila
OPT	o-Ftalaldeído
OTC	Over The Counter
P.A.	Pró-Análise
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PLO	Peroxidação Lipídica
PMN	Polimorfonucleares
PMMA	Polimetil metacrilato
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PPD	Persistent Pigment Darkening
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
<i>Rb</i>	<i>Rheedia brasiliensis</i>

RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RO•	Alcoxila
ROO•	Peroxila
ROOH	Hidroperóxidos
RUV	Radiação ultravioleta
SBF	Soro bovino fetal
-SH	Tiol
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TiO ₂	Dióxido de Titânio
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
UFV	Universidade Federal de Viçosa
Unifal-MG	Universidade Federal de Alfenas-MG
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VN	Vermelho Neutro
XOD	Xantina oxidase
WHO	World Health Organization
ZnO	Óxido de Zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	vii
1. Introdução.....	1
1.1 Proteção da pele contra os danos induzidos pela radiação solar UV.....	4
1.2 <i>Garcinia brasiliensis</i>	8
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Material e Métodos	13
3.1 Matéria-prima e obtenção do extrato	14
3.1.1 Rendimento.....	14
3.1.2 Teor de umidade	14
3.2. Caracterização química do extrato.....	14
3.2.1 Teor de polifenóis	14
3.2.2 Teor de flavonoides	15
3.2.3 Teor de lipídios	15
3.3 Avaliação da fotoquimioproteção pela determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	16
3.3.1 Determinação da atividade doadora de H [•] ao radical DPPH [•]	16
3.3.2 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica (PLO).....	17
3.3.3 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol	18
3.4 Avaliação da citotoxicidade, da fotoestabilidade e da fotoproteção do extrato em culturas de células de fibroblastos (L929)	18
3.4.1 Linhagem e cultivo celular	18
3.4.2 Preparo das amostras do extrato	19
3.4.3 Citotoxicidade.....	19
3.4.4 Fotoestabilidade	19
3.4.5 Fotoproteção	21

3.4.5.1 Amostras	21
3.4.5.2 Cultivo celular e irradiação	21
3.4.5.3 Viabilidade celular	21
3.5 Avaliação da eficácia fotoprotetora <i>in vivo</i>	22
3.5.1 Animais	22
3.5.2 Irradiação dos camundongos sem pelos	22
3.5.3 Glutathione reduzida (GSH)	24
3.5.4 Mieloperoxidase (MPO)	25
3.5.5 Interleucinas IL-1 β e TNF- α	25
3.6 Análise estatística dos resultados	25
4. Resultados e Discussão	26
4.1 Obtenção do extrato etanólico do epicarpo de <i>Garcinia brasiliensis</i>	27
4.2 Caracterização química do extrato	29
4.2.1 Teor de polifenóis totais	29
4.2.2 Teor de flavonoides	30
4.2.3 Teor de lipídios	31
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoquimioprotetora do extrato do epicarpo pela medida da atividade antioxidante por diferentes métodos.	32
4.3.1 Determinação da atividade doadora de H $^{\bullet}$ ao radical DPPH $^{\bullet}$	33
4.3.2 Avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica	35
4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol	37
4.4 Avaliação da citotoxicidade, fotoestabilidade e fotoproteção do extrato em culturas de células de fibroblastos	41
4.4.1 Citotoxicidade	41
4.4.2 Fotoestabilidade	43
4.4.3 Avaliação do potencial fotoprotetor do extrato do epicarpo	46
4.5 Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia fotoprotetora da formulação adicionada do extrato ...	54
4.5.1 Quantificação do antioxidante endógeno GSH	55
4.5.2 Avaliação da eficácia anti-inflamatória da formulação adicionada de extrato do epicarpo pela medida da atividade da mieloperoxidase	57
4.5.3 Avaliação da eficácia fotoprotetora da formulação adicionada do extrato do epicarpo pela quantificação da interleucina IL-1 β e TNF- α	59
5. Conclusões	63
6. Referências	65

1. Introdução

A magnitude e as variações da energia solar direta e indiretamente afetam muitos processos atmosféricos e biológicos sobre a Terra. A fotossíntese, realizada por plantas, algumas bactérias e algas, é o processo físico-químico onde a energia luminosa da porção visível (0,4-0,7 μm) do espectro solar é transformada em energia química, sendo este processo essencial para a vida na terra (ESCOBEDO et al., 2011).

Contudo, a energia solar que incide até a atmosfera terrestre tem duas outras correntes de fluxo radiante, a porção do infravermelho próximo (NIR) entre 700-2800 nm do espectro eletromagnético, pouco estudada e investigada, e a porção ultravioleta (UV) que compreende a faixa de 100-400 nm do espectro solar. A radiação UV (RUV), a mais energética do espectro solar, é dividida em UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). A maior parte da radiação UV solar (99%) que chega a superfície da Terra é do tipo UVA, enquanto que os raios UVB são parcialmente e os UVC totalmente absorvidos pela camada de ozônio e outros constituintes atmosféricos. A RUV solar tem efeitos benéficos à saúde humana como, at formação de vitamina D₃ e a sua aplicação em combinação com drogas na terapia de doenças da pele incluindo psoríase e vitiligo (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

Entretanto, a poluição excessiva está favorecendo a diminuição da camada de ozônio e com isso, o nível de RUV, principalmente UVB, incidente sobre a superfície do planeta tem aumentado e proporcionado o aumento dos efeitos deletérios da RUV solar em muitos sistemas biológicos (CHANG et al., 2010; PEUS et al., 2001)

A pele humana, uma interface entre os meios externo e interno, é o maior órgão do corpo e funciona como uma barreira de proteção para assegurar que agentes nocivos exógenos não afetem a homeostase do organismo. Assim, a pele é exposta, mais que qualquer outro tecido, a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos. Por isso, conta com várias estruturas, diversos tipos celulares e diferentes características funcionais que contribuem para sua eficácia em manter a homeostase (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). Esse órgão conta com dois sistemas de defesas, um relacionado às suas propriedades imunológicas e outro as propriedades físicas e químicas. A imunidade da pele é extraordinariamente complexa e regulada em múltiplos níveis à ativação da imunidade primária, à reativação da imunidade memória e ao desenvolvimento dos linfócitos memória (HALLIDAY et al., 2012).

As propriedades físicas da pele são a sua impermeabilidade à água e a compostos hidrossolúveis, à sua resistência a traumas e às propriedades ópticas que a tornam um pouco insensível a RUV. Quanto as suas propriedades químicas, a pele é provida de substâncias antioxidantes enzimáticas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX-Px), catalase (CAT), e os antioxidantes não enzimáticos ou de baixa massa molecular, como a glutathione reduzida (GSH), vitamina C, α -tocoferol, e a melanina que desempenham a função de eliminar as espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas durante os processos metabólicos celulares e aquelas liberadas sob condições normais de radiação solar e de tensão de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOHEN; GATI, 2000; MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999; RASILAINEN et al., 2002).

Entretanto, a capacidade dos sistemas antioxidantes é limitada e pode ser prejudicada pela exposição da pele a fatores como poluição ambiental, excessiva RUV, cigarro, álcool, dentre outros, que também geram EROs, que proporciona o desequilíbrio entre a produção de EROs e sua inativação pelo sistema antioxidante (PODDA et al., 1998). Sob excessiva exposição à radiação solar, numerosas biomoléculas na pele, chamadas de cromóforos, atuam como absorvedores de radiação solar dentro da faixa de UVB. Estas biomoléculas são principalmente ácidos nucleicos, NADH (nicotinamida adenina dinucleótido), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), grupo heme, quinonas, flavinas, carotenoides, 7-deidrocolesterol, eumelanina, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos (HECK et al., 2004). Os cromóforos celulares que absorvem a radiação UVA na iniciação da fotossensibilização induzida por essa radiação são ainda desconhecidos, somente o trans-ácido urocânico e a melanina foram reportadas (TRAUTINGER, 2001). Após absorção da energia eletromagnética solar, os cromóforos energizados podem transferir a energia para o oxigênio molecular gerando as EROs, como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, dentre outros.

Desta forma, a RUV na pele aumenta as EROs e inativam também os componentes dos sistemas antioxidantes (SHINDO et al., 1994; SHINDO; WITT; PACKER, 1993) gerando o estresse oxidativo. As EROs não inativadas pelo sistema antioxidante da pele podem danificar moléculas de DNA, oxidar lipídios das membranas e proteínas das células, como também, a própria radiação solar e as EROs têm a capacidade de ativar a cascata de sinalização celular modificando a expressão gênica, a estrutura e a função de proteínas (RITTIÉ; FISHER, 2002). Com isso, a radiação solar pode causar vários efeitos deletérios à pele tais como queimaduras (eritemas), escurecimento da pele (melanogênese), fotoimunossupressão, fotoenvelhecimento e principalmente fotocarcinogênese (FUCHS, 1998; VENDITTI et al., 2011; YOUNG, 2006).

A nível molecular, as radiações UVA e UVB diferem em seus sítios de ação na geração de lesões. Os efeitos fotobiológicos gerados pela radiação UVB são eritematogênicos e carcinogênicos, induzidos por danos diretos ao DNA, RNA, proteínas e outros componentes da célula, bem como por meio da formação de EROs, conduzindo a ativação da cascata de sinalização celular e o sistema imunológico enquanto que a radiação UVA apresenta um papel importante na geração de EROs, que danificam o DNA e oxidam os lipídios das membranas celulares e ativam também o sistema de sinalização celular, promovendo alterações que conduzem, principalmente, ao fotoenvelhecimento (ARAUJO; SOUZA, 2008; TEDESCO; MARTÍNEZ; GONSÁLEZ, 1997).

Dentre as lesões induzidas pela radiação solar, o câncer de pele, devido à sua alta incidência em todo o mundo, é a lesão que causa maior preocupação à população e aos responsáveis pela saúde pública. A maioria (aproximadamente 80%) dos cânceres de pele são carcinomas das células basais (BCC), aproximadamente 16% são carcinomas das células escamosas e 4% são melanomas. Nos últimos anos, a incidência do câncer de pele tem aumentado cerca de 600% desde 1940 (CHANG et al., 2010). Segundo o INCA (2012), Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, o câncer de pele é o mais frequente compreendendo 25% dentre todos os tumores malignos registrados no país e sua estimativa é de 140.400 novos casos.

1.1 Proteção da pele contra os danos induzidos pela radiação solar UV

A função primária da pele é proteger o organismo contra os efeitos danosos do meio ambiente. Por isso, a pele apresenta vários mecanismos para protegê-lo de algumas alterações induzidas pela RUV. Estes mecanismos incluem a interrupção do ciclo celular; a apoptose, onde a proteína p53 desempenha importante papel; a ativação dos mecanismos de sobrevivência e de proliferação celular; bem como, o mecanismo para modular a geração de EROs, incluindo a expressão gênica de enzimas antioxidantes da pele (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; MELNIKOVA; ANANTHASWAMY, 2005).

Outra possibilidade para proteção cutânea é a aplicação exógena de substâncias que auxilie os mecanismos de proteção da pele, chamada fotoquimioproteção, ou de substâncias que atenuem a penetração da RUV na pele, chamada de protetor solar. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (WHO) tem sugerido à população mudanças de hábitos para prevenir e/ou amenizar a ação da RUV, dentre as quais podemos citar: evitar a exposição ao sol nos horários de maior incidência da radiação, usar vestimentas, óculos e chapéus de

proteção (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010). Estas medidas preventivas e terapêuticas de proteção têm sido desenvolvidas no combate principalmente ao câncer de pele e ao fotoenvelhecimento.

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

Os filtros UV orgânicos são compostos aromáticos conjugados com um grupo carbonila e em vários destes há um grupo doador de elétrons (amina ou metoxila) nas posições orto e para. Esses filtros podem ser divididos em filtros UVB que compreendem os derivados do ácido para-aminobenzoico (PABA), os salicilatos, os cinamatos, os benzimidazóis e os derivados do benzilideno cânfora e os filtros UVA que incluem as benzofenonas e os derivados de dibenzoilmetano. Estes compostos são usados em associação, pois nenhum deles isoladamente, na concentração recomendada pelo FDA (*Food and Drug Administration*), proporciona elevado fator de proteção ou largo espectro de absorção (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007). Para serem eficazes, os filtros orgânicos precisam ser fotoquimicamente estáveis à luz solar, devem dissolver ou dispersar fácil e permanentemente no veículo e permanecerem na pele após perspiração ou contato com água.

Já os filtros UV inorgânicos bloqueiam as radiações UV e visível por reflexão, espalhamento e/ou absorção por formarem uma camada de partículas metálicas inertes que constituem uma barreira opaca. Dependendo do tamanho das partículas, os filtros UV inorgânicos podem proteger contra a RUV por reflexão e absorção. Os filtros inorgânicos mais eficientes são dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO). Entretanto, os protetores solares com filtros inorgânicos não são bem aceitos pelos consumidores devido à opacidade e efeito oclusivo desses produtos. Contudo, com os processos industriais modernos de micronização associados aos de nanoencapsulação têm possibilitado o desenvolvimento de protetores solares com filtros inorgânicos mais transparentes e sem a perda da eficiência bloqueadora da RUV, resultando em produtos cosmeticamente mais aceitáveis (DIFFEY, 2001; LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW; SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

Ambos os filtros UV, orgânicos e inorgânicos, são capazes de reduzir as quantidades de radiação UVA e UVB que penetram nas camadas epidérmicas e dérmicas da pele e com isso, previnem e/ou amenizam as lesões de efeito imediato e de longo prazo induzidas por essas

radiações (GAROLI et al., 2008; GONZALEZ; FERNANDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; VENDITTI et al., 2011).

O uso de protetores solares, mistura de filtros UV orgânicos e inorgânicos, continua a ser a estratégia mais aceita pela população para proteção contra as lesões provocadas pela RUV. Entretanto, a aplicação inadequada desses produtos pelo usuário proporciona um grau de proteção muito menor que o produto pode oferecer. A inadequada proteção proporcionada pelos protetores solares contras as EROs induzidas pela radiação UVA e a degradação dos seus filtros orgânicos induzida pela radiação UVB conduz a redução da eficiência protetora desses produtos e a geração de compostos químicos potencialmente tóxicos (SCALIA; MEZZENA, 2010). Em adição, os filtros UV podem penetrar no estrato córneo e atingir a epiderme viável, como demonstrado por VILELA et al. (2012), e proporcionarem o aumento da geração de EROs na epiderme nucleada (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Assim, a liberação tópica de substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias pode proporcionar efeitos benéficos complementares à proteção de protetores solares. Efeitos protetores benéficos derivados da combinação de compostos antioxidantes, como cafeína, vitamina E, vitamina C, extratos de *Echinacea pallida*, ou óleo essencial de camomila, ao protetor solar com FPS 25 (fator de proteção solar) foram demonstrados em voluntários humanos (MATSUI et al., 2009).

Desta forma, uma segunda estratégia de proteção tem sido proposta para aumentar a eficácia dos protetores solares, a fotoquimioproteção, que consiste na incorporação de compostos naturais isolados antioxidantes e/ou anti-inflamatórios de extratos vegetais, aos protetores solares que poderiam sequestrar as EROs geradas por cromóforos epidermais sob radiação UV e aqueles gerados pelos próprios filtros UV.

Além disso, outra possibilidade da fotoquimioproteção seria a utilização de formulações tópicas adicionadas de antioxidantes e anti-inflamatórios naturais antes da aplicação dos protetores solares na pele e antes da exposição à radiação solar. Estudos mostram que agentes naturais com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticancerígena e imunomodulatória têm a capacidade de exercer efeitos inibitórios marcantes em diversos eventos celulares e moleculares induzidos pela radiação UV solar (AFAQ, 2011). Desta forma, pode-se prevenir os efeitos adversos da radiação solar sobre a pele (AFAQ, 2011). As plantas devido à inabilidade em evitar a luz solar, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante complexo e constituído por vários compostos de diferentes estruturas químicas.

Os polifenóis são metabólitos secundários vegetais, sendo os flavonoides a classe de polifenóis com maior atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres bem como atividade anti-inflamatória (KOH; MITCHELL, 2008; MANACH ET AL et al., 2004; SOUSA et al., 2007).

Silimarina é um complexo de flavonoides antioxidantes extraído da semente da *Silybum maritimum*, constituído dos flavonoides silibina, silidianina e silicristina, que possui poderosa atividade sequestradora de radicais livres e previne a oxidação de lipoproteínas. Em adição, a silimarina regula o conteúdo intracelular do antioxidante endógeno, glutathione reduzida (GSH), o qual é altamente depletado da epiderme viável após a exposição à radiação solar, e esse complexo de flavonoides também quelar íons metálicos, ferro e cobre, que desempenham papéis importantes na geração de radicais livres (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008). A aplicação tópica de silimarina inibe células “sunburn”, diminui a quantidade de dímeros de pirimidina formados pela exposição do DNA à radiação UVB e diminui tumores em pele de camundongos sem pelos (CHEN; HU; WANG, 2012).

A aplicação tópica de formulações adicionadas de genisteína, isoflavonoide da soja, tem mostrado diminuição dos danos oxidativos induzidos pela RUV, como imunossupressão e inflamação. Formulações tópicas gel-creme e sistemas microemulsionados incorporados de quercetina mostraram-se eficazes contra os danos induzidos pela radiação UVB, sendo efetivas na proteção do antioxidante endógeno GSH, devido às propriedades antioxidante e sequestradora de radicais livres desse flavonoide, inibiram a atividade das metaloproteinases que são induzidas pela radiação solar e a atividade da mieloperoxidase, cuja atividade aumenta na pele devido à migração de neutrófilos para a área lesionada. Estudos desenvolvidos em culturas de queratinócitos mostraram que a quercetina atenua os danos causados na pele exposta à RUV principalmente por seus efeitos inibitórios contra a ativação do fator de transcrição NF- κ B, importante mediador do processo inflamatório induzido pela radiação UVB na pele (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2011).

O Brasil é um dos países do mundo com a maior biodiversidade vegetal, com mais de 40.000 espécies diferentes de plantas representando 20% da flora mundial, distribuídas em cinco principais biomas designadas como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos, mas pobremente explorada, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (OLIVEIRA et al., 2012; SOUSA et al., 2008). Faltam estudos *in vitro* e *in vivo* do

potencial terapêutico de nossas plantas, cujos mecanismos de ação tenham sido investigados. Estes estudos fornecem informações úteis para o desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis com estudos de estabilidade, avaliação do potencial terapêutico e estudos clínicos.

1.2 *Garcinia brasiliensis*

A família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence ao grupo filogenético das angiospérmicas e caracteriza-se pela destacada presença de látex na maioria das suas espécies. Esta família possui 47 gêneros (por exemplo: *Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*) e mais de 1000 espécies que estão agrupadas em seis subfamílias, que são amplamente espalhadas por todo o Brasil (DEROGIS et al., 2008).

Garcinia ou *Rheedia* é o gênero mais numeroso da família Guttiferae e apresenta uma diversidade notável de metabólitos, como por exemplo, os derivados fenólicos oxigenados e prenilados, dentre os quais se podem citar xantonas, flavonoides, ácidos fenólicos e benzofenonas (COELHO et al., 2008; DEROGIS et al., 2008; MONACHE et al., 1984; MONACHE et al., 1984; NEVES et al., 2007).

A espécie *Garcinia brasiliensis* (*Gb*) ou *Rheedia brasiliensis* (*Rb*) (Figura 1) é nativa da região Amazônica, tipicamente de distribuição tropical e cultivada em todo território brasileiro (COELHO et al., 2008). Esta planta é popularmente conhecida como “bacupari” ou “bacoparé” (ALMEIDA et al., 2008; MARTINS et al., 2011; NEVES et al., 2007). Os seus frutos são amarelos com polpa branca comestível, usados na medicina popular para o tratamento de úlcera péptica, patologias urinárias e vários tipos tumores (SANTA-CECILIA et al., 2011).

Figura 1: A árvore, flores e frutos da espécie *Garcinia brasiliensis*.

MARTINS et al. (2008) identificaram uma benzofenona isoprenilada denominada como garciniafenona, isolada de extrato hexânico dos frutos de *Garcinia brasiliensis*. MARTINS et al. (2011) identificaram recentemente mais duas dessas benzofenonas isopreniladas: a 7-epiclusionona e a guttiferona A, isoladas também de extratos hexânico e etanólico dos frutos e sementes de *Garcinia brasiliensis*. Estas benzofenonas são substâncias fenólicas apolares que exibem aumento na hidrofobicidade à medida que aumenta o número de grupo funcional prenila ligado ao composto (SANTA-CECÍLIA et al., 2012).

As atividades biológicas já descritas desta espécie são: propriedade anti-anafilática (NEVES et al., 2007), anti-inflamatória via oral e efeitos antinociceptivos (SANTA-CECILIA et al., 2011), atividade antimicrobiana (NALDONI et al., 2009), efeito antiproliferativo em células de câncer humano (MURATA et al., 2010), potente agente anticárie e antibiofilme (MURATA et al., 2010), atividade leishmanicida (PEREIRA et al., 2010), antitumoral (MARTINS et al., 2009) e propriedade inibitória sobre HIV (MARTINS et al., 2007).

Estudos preliminares de absorção da energia eletromagnética realizados com os extratos etanólicos de *Garcinia brasiliensis* (EEGb) mostraram eficiente absorção na região do UV. Segundo NALDONI et al. (2009), as benzofenonas isopreniladas 7-epiclusionona e guttiferona A representam cerca de 15 a 20%, em peso, no extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* e são usadas como marcadores químicos. Estas benzofenonas tiveram seu carácter aromático confirmado por espectroscopia de RMN¹H, infravermelho, espectroscopia de UV e

espectrometria de massa (SANTOS et al., 1999). Esses resultados associados com as atividades biológicas já conhecidas das espécies de *Garcinia* justificaram a realização de um estudo mais amplo que verificasse o potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato ainda não pesquisado.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* e da formulação adicionada deste, empregando métodos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (EEEGb).
- Caracterização química e funcional do extrato do epicarpo pela determinação dos teores de polifenóis, flavonoides e lipídios e medida da atividade antioxidante por diferentes métodos *in vitro*.
- Avaliação da citotoxicidade, da fotoestabilidade e da fotoproteção do extrato do epicarpo em culturas de células.
- Avaliação da eficácia fotoprotetora e/ou fotoquimioprotetora da formulação *in vitro* usando cultura de células e *in vivo* pela quantificação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH), pela medida da atividade das mieloperoxidases e pela quantificação das interleucinas, IL-1 β e TNF- α , na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação UVB.

3. Material e Métodos

3.1 Matéria-prima e obtenção do extrato

Os frutos de *Garcinia brasiliensis* foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste), Viçosa-MG, Brasil. A confirmação da identidade desses frutos foi feita pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto do horto botânico da UFV e um exemplar voucher foi depositado no herbário da UFV sob o código de registro VIC2604.

A obtenção do extrato foi realizada no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, Alfenas-MG, Brasil. O material seco (epicarpo) foi então pulverizado (1000g) e em seguida, submetido à maceração em 3L de etanol PA, à temperatura ambiente. Após o processo de maceração, a fase líquida foi separada por filtração e o solvente evaporado a 45°C sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, obtendo-se o extrato concentrado.

3.1.1 Rendimento

O rendimento do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* foi calculado pela razão entre a massa de extrato final, obtido após a extração por maceração e rota-evaporação do solvente, e a massa de matéria-prima (massa de pó de epicarpo) empregada no processo extrativo (FONSECA, 2010).

3.1.2 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado usando uma balança de aquecimento por infravermelho (IV). Para a análise, alíquota de 1 g do extrato foi inicialmente medida. Em seguida, a amostra foi irradiada em 105°C até atingir um peso constante. O teste foi realizado em triplicata (SIQUEIRA et al., 2011).

3.2. Caracterização química do extrato

3.2.1 Teor de polifenóis

O teor de polifenóis totais do extrato foi determinado por espectroscopia na região do Visível empregando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com modificações, e o ácido gálico como padrão de referência para a construção da curva de calibração.

Foram adicionados a 500µL da amostra ou da solução de ácido gálico, 500µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500µL da solução de Na₂CO₃ (10%). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de amostra foi substituída por 400 µL de água e 100 µL de etanol 80%. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Todas as medições foram feitas em triplicata.

3.2.2 Teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi avaliado de acordo com KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA (2004), sendo a quercetina empregada como padrão de referência para a construção da curva de calibração.

Foram adicionados a 500µL da amostra ou do padrão 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 420 nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de cloreto de alumínio (2%) foi substituída pela mesma quantidade de uma solução hidroetanólica 50% (v/v). O conteúdo de flavonoides totais foi expresso como mg de equivalente de quercetina (EQ) por g de extrato (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Todas as medições foram feitas em triplicata.

3.2.3 Teor de lipídios

O teor de lipídios totais do extrato foi determinado segundo a metodologia de BLIGH; DYER (1959), sendo esta considerada uma técnica versátil, efetiva e simplificada do procedimento clássico para a quantificação de lipídios totais em diversos tipos de amostras (BRUM et al., 2009; IVERSON SJ; LANG SLC; MH., 2001).

Em tubos de ensaio foi pesado aproximadamente 1 g de amostra e foram adicionados 3,75 mL de clorofórmio/metanol 1:2 (v/v), seguida de agitação em vortex até completa solubilização da amostra. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de clorofórmio e homogeneizou por 1 minuto. E por último, acrescentou-se 1,25 mL de água e homogeneizou novamente por 1 minuto. Esta mistura foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente para obtenção de um sistema composto de duas fases (fase superior metanol/água e fase inferior clorofórmio com os lipídios). A fase clorofórmica foi isolada e seguida de evaporação, sendo a determinação de lipídios determinada por gravimetria.

3.3 Avaliação da fotoquimioproteção pela determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* foi avaliada por métodos diferentes que simulam a formação de EROs no organismo e pelo método do radical estável DPPH[•]. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição e/ou redução *versus* a concentração de extrato no meio reacional, sendo que a porcentagem de inibição/redução foi determinada pela fórmula (GEORGETTI, 2003):

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

Amostra = Absorvância da amostra, nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra, nos métodos quimioluminescentes.

Controle Positivo (C+) = Absorvância do C+ nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do C+ nos métodos quimioluminescentes.

Os resultados foram expressos como Log da concentração de extrato no meio reacional e os valores representaram a média de três experimentos.

3.3.1 Determinação da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]

A atividade antioxidante do extrato do epicarpo foi determinada pela diminuição da absorvância da solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) utilizando o método descrito por BLOIS (1958).

O preparo das amostras utilizadas neste ensaio consistiu na solubilização do extrato do epicarpo em álcool etílico P.A. na concentração de 4 mg/mL, seguida de homogeneização em agitador tipo vortex por 1 minuto e posteriormente foram preparadas diluições subsequentes na faixa de concentração de 0,5 a 4 mg/mL.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 500µL de tampão acetato de sódio (0,1M) pH 5,5, 500µL de álcool etílico (95%), 25µL de amostra e 250µL de solução alcoólica de DPPH[•] (200µM). O controle positivo não continha a amostra e o branco foi constituído de 500µL de tampão acetato 0,1M pH 5,5 e 750µL de etanol. Depois de 15 minutos a leitura foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro Hitachi U2001. A variação da absorvância, proporcionada

pelas amostras do extrato, foi comparada à absorvância do controle positivo (apenas DPPH[•]), que corresponde à absorvância máxima (100%).

3.3.2 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica (PLO)

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 dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3, que reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (OHKAWA; OSHINI; YAGI, 1979).

As amostras foram preparadas solubilizando o extrato do epicarpo previamente em álcool etílico P.A. na concentração de 2 mg/mL e posteriormente foram preparadas as diluições 1:1 em meio reacional contendo KCl (130 mM) e Tris-HCL (10mM), pH 7,4 obtendo uma faixa de concentração de 0,031 a 2 mg/mL. Os resultados foram expressos considerando a concentração de extrato contida no meio reacional.

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 ferroso amoniacal (50mM). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1%) (TBA) preparado em NaOH (50mM), 100µL de NaOH (10M) e 500µL de H₃PO₄ (20%) foram adicionados, seguido por incubação de 20 minutos a 85°C (OHKAWA; OSHINI; YAGI, 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e a leitura da absorvância foi realizada a 535nm em espectrofotômetro Hitachi U2001 (BUEGE; AUST, 1978). Concomitantemente, foram feitos o branco (ausência de mitocôndrias), o controle positivo (ausência de amostra), o controle do solvente (álcool etílico P.A. com ausência do extrato) e o controle negativo (ausência de ferro). As mitocôndrias utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP – USP).

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

A medida da atividade inibidora da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol foi realizada segundo o método proposto por GIROTTI et al. (2000) que avalia a atividade sequestradora do ânion superóxido.

O preparo das amostras analisadas neste ensaio consistiu na solubilização do extrato do epicarpo previamente em álcool etílico P.A. na concentração de 2 mg/mL com posterior obtenção de diluições 1:1 em solução tampão glicina (0,1M), pH 9,4 na faixa de concentração de 0,031 a 2 mg/mL.

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. No controle positivo, 100% da quimioluminescência, a quantidade de extrato utilizada foi substituída pela mesma quantidade de tampão glicina. A medida da quimioluminescência foi realizada em luminômetro Autolumat LB953 durante 5 minutos a 25°C. 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), como descrito no item 3.3.

3.4 Avaliação da citotoxicidade, da fotoestabilidade e da fotoproteção do extrato em culturas de células de fibroblastos (L929)

3.4.1 Linhagem e cultivo celular

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. 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 37°C com 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas a cada 2-3 dias, usando salina 0,9% para lavá-las e tripsina 0,25% para desagregá-las do frasco.

3.4.2 Preparo das amostras do extrato

Uma massa referente à 50mg do extrato bruto do epicarpo, exposto ou não a RUV, foi solubilizada em 300 μ L de DMSO, 50 μ L de Tween 20 e 650 μ L de tampão PBS. Agitou-se esta mistura em agitador tipo vortex por aproximadamente 1 minuto ou até completa solubilização do extrato obtendo-se assim, uma solução mãe. A partir desta solução mãe foi preparada uma solução de 1 mg/mL utilizando 20 μ L da solução mãe e 980 μ L de tampão PBS. A partir desta solução foram feitas novas diluições da amostra, contemplando a faixa de concentração de 1,56 μ g/mL a 50 μ g/mL. Foi realizado também um controle de solvente utilizando a solução acima descrita sem o extrato.

3.4.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade é avaliada pelo ensaio de viabilidade celular por meio do corante vermelho neutro que se baseia na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis não injuriadas (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988).

As células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e, 12 horas depois, foi realizado o tratamento com várias diluições do extrato em meio não suplementado com SBF (meio incompleto). Vinte e quatro horas após o tratamento com o extrato, foi adicionado 200 μ L de vermelho neutro (50 μ g/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 CaCl₂ 1% (p/v); e, em seguida, foram adicionados 200 μ L de etanol com ácido acético 1% (v/v). A leitura da absorvância foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas (μ Quant) em 540nm (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). A escolha deste método para avaliar a citotoxicidade do extrato de *Garcinia brasiliensis* foi devido à menor interferência na leitura da absorvância em 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

3.4.4 Fotoestabilidade

Uma quantidade de 0,5 g do extrato do epicarpo foi aplicada de forma homogênea em uma placa de petri com área 9,62 cm² para posterior exposição às radiações UV. Aliquotas desta amostra foram submetidas a 28,78 J/cm² e 56,89 J/cm² de UVA e 4,42 J/cm² e 8,74

J/cm² de UVB separadamente. A fonte de luz utilizada para radiação UVB foi uma lâmpada fluorescente modelo PHILIPS TL40W/12 RS (Medical Holland), que emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A fonte de luz utilizada para radiação UVA foram quatro lâmpadas TLK 40W/10R (Philips, Holland, 60 cm), cuja radiação emitida abrange a faixa de 340 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 376 nm conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Espectro de emissão da lâmpada UVA (320-400 nm) (FONSECA, 2010).

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para avaliar a possível degradação dos compostos presentes no extrato através de plausíveis alterações detectadas pela citotoxicidade em células de fibroblastos da linhagem L929.

A citotoxicidade do extrato do epicarpo exposto ou não à RUV foi comparada, utilizando o ensaio do corante vermelho neutro (item 3.4.3) com objetivo de identificar possíveis interferências das radiações UVA e UVB na viabilidade celular.

Para isso, as células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços conforme já descrito e 12 horas depois, foi realizado o tratamento com várias diluições da amostra irradiada e não irradiada na mesma placa a fim de minimizar possíveis interferências entre os ensaios.

3.4.5 Fotoproteção

3.4.5.1 Amostras

As amostras analisadas foram protetores solares comerciais das marcas A e B com FPS-15/FPS-30/FPS-60; diferentes extratos vegetais e seus controles de solventes tais como extrato da semente de *Garcinia brasiliensis* e propilenoglicol (grupo de pesquisa de Alfenas – LFQM), extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* e triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico (extrato em estudo), extrato de *Inga edulis* (ingá), extrato de *Euterpe oleracea* (açaí) e extrato de *Byrsonima crassifolia* (murici) e mistura de propilenoglicol e água (provenientes de Bélem – PA); extrato do epicarpo bruto e em soluções de 10 mg/mL, 20 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL; formulações adicionadas de 2%, 10% e 20% de extrato do epicarpo e formulação placebo. Cada amostra foi aplicada em triplicada.

3.4.5.2 Cultivo celular e irradiação

As células de fibroblasto da linhagem L929, a uma densidade de 8×10^5 células/poço, foram semeadas em microplacas de 6 poços e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 12h. Após 12h, com a formação de uma confluência de 80% das células, o meio de cultura foi substituído por 1,5 mL de tampão Hank's e as microplacas foram cobertas por uma placa de quartzo onde as amostras foram aplicadas a uma concentração de 2 mg/cm² segundo preconizado pela COLIPA (CAYROL et al., 1999; CHRÉTIEN; HEAFEY; SCAIANO, 2010).

Em seguida, o conjunto microplaca/placa de quartzo foi exposto a uma dose de 0,090 J/cm² de radiação UVB à temperatura ambiente utilizando lâmpada UVB fluorescente (modelo Philips TL/RS 40W – Medical Holland).

3.4.5.3 Viabilidade celular

Após a irradiação, a placa de quartzo foi retirada e o tampão Hank's de cada poço removido e substituído por 3 mL de meio DMEM contendo soro fetal bovino a 2%. A seguir, as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 48h (VIELHABER et al., 2006). Os experimentos foram acompanhados por controle não irradiado executados em triplicata que corresponderam a 100% de viabilidade celular.

Transcorrido o período de 48h, ensaios de viabilidade celular foram realizados com as placas. O meio de cultura de cada poço foi substituído por 3 mL de meio DMEM sem soro

fetal bovino contendo 50 µg de VN/mL (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998) e a seguir, as células foram incubadas por 3 horas a 37°C (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). Após 3 horas, o meio com VN foi removido e as células lavadas rapidamente com uma solução fixadora composta de 1% de formaldeído e 1% de CaCl₂. Em seguida, 3 mL de uma solução etanol/água 50% com 1% de ácido acético foram adicionados em cada poço para extração do corante (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). As microplacas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 10-15 min. Em seguida, as mesmas foram submetidas à leitura de densidade óptica (D.O.) em um leitor de placa de ELISA (µQuant, Biotek Instruments Inc.), em 540nm (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998). A viabilidade celular das células tratadas foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle não irradiado (FONSECA, 2010).

3.5 Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vivo*

O efeito fotoprotetor *in vivo* foi avaliado através da determinação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH), da avaliação da eficácia anti-inflamatória pela medida de mieloperoxidases e da quantificação de interleucinas IL-1β e TNF-α na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação UVB.

3.5.1 Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos sem pelos (*hairless*), machos ou fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 30 g, da linhagem HRS/J laboratório Jackson (Bar Harbor). Os animais foram criados no biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25°C, com livre acesso a água e comida, quatro 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 (CEUA) da Universidade de São Paulo – campus de Ribeirão Preto (protocolo nº 12.1.1367.53.0).

3.5.2 Irradiação dos camundongos sem pelos

Para a irradiação dos camundongos sem pelos foi utilizada uma lâmpada ultravioleta UVB fluorescente modelo Philips TL/RS 40W (Medical Holland) (CARINI et al., 2000; ROSA, 2002). Esta fonte emite radiação na faixa de 270-400 nm com pico máximo de

emissão em 313 nm. A fonte de luz UV foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para os experimentos de indução do estresse oxidativo (Figura 3) (CASAGRANDE, 2005; MARQUELE-OLIVEIRA, 2007), localizada a uma distância de 20 cm acima dos animais (ROSA, 2002; VICENTINI et al., 2008). Das seis repartições existentes no compartimento, foram utilizadas apenas as quatro repartições centrais para serem colocadas as caixas plásticas com diferentes grupos de animais, a fim de evitar variações de radiação. Os animais ficaram livres para se movimentarem dentro das caixas e suas regiões dorsais ficaram diretamente expostas à RUV, de maneira que os mesmos não poderiam se esconder (DE GRUIJL; VAN DER MEER; VAN DER LEUN, 1983; ROSA, 2002). A parte superior destas caixas foi coberta com uma tela plástica para manter os animais dentro das mesmas (ROSA, 2002), assegurando que a altura das telas plásticas mantiveram os animais dentro das mesmas durante as induções e não permitiu que se aglomerasse (CASAGRANDE, 2005). Este procedimento foi padronizado em nosso laboratório e segundo os trabalhos de CASAGRANDE et al. (2006), MARQUELE-OLIVEIRA et al. (2007), VICENTINI et al. (2008) e VILELA et al. (2012), os resultados obtidos garantiram que a formulação foi absorvida pela pele dos animais sem interferência dos mesmos.

Figura 3: 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 (FORTE, 2012).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (com 3 animais cada): Grupo 1: animais sem formulação e não irradiados – CNI (controle não irradiado/controlado negativo); Grupo 2: animais sem formulação e irradiados – CI (controle irradiado/controlado positivo); Grupo 3: animais tratados com a formulação adicionada do extrato do epicarpo não irradiados

(NIF), e Grupo 4: animais tratados com a formulação adicionada do extrato do epicarpo irradiados (IF).

O tratamento consistiu na aplicação tópica de 0,3 g de formulação no dorso dos animais 1 hora antes do início da irradiação. E durante esta 1 hora os animais não receberam água. Em seguida, os grupos foram expostos à radiação durante 2 horas, que corresponde à dose de 2,87 J/cm² e 1 hora e 38 minutos de exposição ao sol. Essa dose de radiação foi reportada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos – FCFRP-USP por CASAGRANDE et al. (2006) e VICENTINI et al. (2008) como sendo uma dose a qual induz a depleção de GSH e indução da secreção/liberação de mieloperoxidasas. Baseando-se nesses trabalhos foi selecionada a dose de radiação para o presente trabalho.

Após 6 horas do término da irradiação, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e a morte foi comprovada pela ausência de batimentos cardíacos, avaliação da insensibilidade cutânea por período superior a 15 minutos e avaliação da queda da temperatura corporal abaixo de 26°C. As peles do dorso dos animais foram removidas, lavadas com solução de NaCl 0,9%, divididas em 3 partes para a realização de 3 experimentos e congeladas em nitrogênio líquido. As carcaças foram enviadas ao biotério central para incineração.

3.5.3 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona (GSH) pertence aos antioxidantes endógenos essenciais no combate das EROs induzidas pela RUV, com isso, sua quantificação pode ser uma maneira eficaz de avaliar o estresse oxidativo (CARINI et al., 2000). Os níveis de GSH na pele do dorso dos camundongos sem pelos foram avaliados empregando o método de fluorescência proposto por HISSIN; HILF (1976).

Para determinação dos níveis de GSH, 100 µL das amostras foram adicionadas a 1 mL de NaH₂PO₄ (0,1 M, pH 8,0), contendo EGTA 5 mM, seguido da adição de 100 µL de o-ftalaldeído (OPT) 1 mg/mL, preparado em metanol. A fluorescência foi determinada após 15 minutos em 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, utilizando fluorímetro modelo F-4500 (Hitachi Ltda, Tokyo, Japão) (HISSIN; HILF, 1976). Para determinação dos níveis de GSH presentes nas amostras de pele foi utilizada a equação de regressão linear da curva analítica obtida plotando-se concentração de GSH (µM) x unidade de fluorescência.

3.5.4 Mieloperoxidase (MPO)

O ensaio de quantificação da MPO foi realizado segundo o protocolo proposto por BRADLEY et al. (1982).

As amostras da pele foram diluídas (50 mg/mL) em tampão K_2HPO_4 (50 mM, pH 6,0) contendo 0,5% HTAB (brometo de hexadecil trimetil-amonio), homogeneizadas em Turrax por 2 minutos e centrifugadas a 14000 x g por 6 minutos a 4°C. A fração sobrenadante foi retirada e analisada quanto à atividade de MPO. A atividade de MPO das amostras foi determinada através de uma curva padrão da enzima padrão. Assim, 10 µL de amostras foram adicionadas a 20 µL de tampão K_2HPO_4 contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em 10 minutos em 450 nm, utilizando-se espectrofotômetro para placa de 96 poços (BRADLEY et al., 1982).

3.5.5 Interleucinas IL-1 β e TNF- α

As concentrações de IL-1 β e TNF- α foram determinadas por ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando as amostras de pele congeladas e armazenadas no -80°C. Estas amostras foram homogeneizadas em 1000 µL de tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de feniltimetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 0,01 mg/ml de aprotinina A, e centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e os níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α foram quantificados utilizando-se de kits de ELISA (R&D System, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística GraphPad Prism® (versão 5.0). Os resultados foram expressos pela média, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA e teste de comparações de Tukey e/ou Bonferroni. Foram consideradas diferenças significantes os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Obtenção do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*

Investigações fitoquímicas do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* tem resultado no isolamento e purificação, por técnicas cromatográficas clássicas, do derivado tetra prenulado da benzofenona, 7-epiclusianona, identificado pelos métodos espectroscópios de Ressonância nuclear magnética (RMN), Infravermelho (IV) e espectrometria de massa (MS) (NEVES et al., 2007). O extrato etanólico e hexânico da semente e extrato etanólico da folha apresentaram como metabólitos secundários majoritários a guttiferona, benzofenona isoprenilada, e a 7-epiclusianona (MARTINS et al., 2011; SANTA-CECILIA et al., 2011). Enquanto que no extrato hexânico do pericarpo dessa espécie vegetal foi encontrado as benzofenonas 7-epiclusianona, garciniafenona, benzofenona tri-prenilada, e guttiferona-A (MURATA et al., 2010). Trabalhos têm demonstrado que as benzofenonas garciniafenona e a 7-epiclusianona possuem atividades biológicas, como atividade antiproliferativa contra diversas linhagens de células tumorais humanas de melanoma (UACC62), carcinoma de mama (MCF7), ovário (OVCAR 03), próstata (PCO3), do pulmão (NCI-460) e de ovário droga resistente (NCI-ADR), bem como, atividade antioxidante e antiinflamatória (MARTINS et al., 2011; MURATA et al., 2010; SANTA-CECÍLIA et al., 2012).

Devido aos conhecimentos fitoquímicos e as atividades biológicas da espécie *Garcinia brasiliensis* obtidos até o momento por diferentes grupos de pesquisa, justificam os estudos para avaliação do potencial fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* desenvolvidos nesse trabalho.

O álcool etílico foi utilizado para obtenção do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*, pois é o solvente de escolha pela indústria farmacêutica e alimentícia devido ao seu nível de segurança, e também por ter sido classificado pela Farmacopeia Americana – USP, na classe 3 dos limites de solventes residuais. Essa classificação é considerada segura para a saúde humana nos níveis aceitáveis para produtos farmacêuticos que é de 50 mg por dia (FARMACOPEIA, 2011; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

O método de maceração convencional foi o escolhido para extração dos metabólitos secundários do epicarpo, pois na literatura científica há vários trabalhos que descrevem a obtenção de extratos de diversas partes da planta *Garcinia brasiliensis*, onde solventes com diferentes polaridades foram empregados, porém todos usaram a maceração como processo

extrativo. O método de maceração é simples, podendo se adequar a quantidade e a parte do vegetal a ser macerado, o poder de extração pode ser modificado pela escolha do solvente e o tempo de extração (SIQUEIRA, 2010).

Partes dos frutos de *Garcinia brasiliensis* foram separadas em casca (epicarpo), porção comestível (mesocarpo) e semente. O grupo de pesquisa em Alfenas (LFQM – Unifal/MG) utiliza a casca e a semente dos frutos e demais partes da planta na produção de extratos vegetais com diferentes solventes de extração. A proporção de pó de epicarpo para quantidade de etanol de 1:3 (g/v) proporcionou um rendimento do processo de extração de 10% (p/p), equivalente ao rendimento do extrato da semente processado no mesmo dia (Tabela 1).

Trabalhos da literatura trazem informações sobre o processo de extração por maceração do epicarpo dos frutos da espécie *Garcinia brasiliensis* que apresentou um rendimento de 8% (p/p) (DEROGIS et al., 2008; MARTINS et al., 2008; MARTINS et al., 2011; MURATA et al., 2010; NALDONI et al., 2009; NEVES et al., 2007). Já a maceração etanólica das sementes de *Garcinia brasiliensis* o rendimento (p/p) variou entre 8% -10,7% (MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2011; NALDONI et al., 2009). A extração etanólica das folhas de *Garcinia brasiliensis* resultou em um rendimento de 8,2% (p/p) (SANTA-CECILIA et al., 2011).

A determinação da umidade pelo sistema de aquecimento por radiação Infravermelha é considerado um método rápido (reduz o tempo de secagem em até 1/3 do total), preciso, efetivo (penetração do calor dentro da amostra), de baixo custo, de fácil manuseio e frequentemente usado na indústria. Este sistema registra variações de peso em função do tempo, sendo que a velocidade e a extensão de remoção de água dependem do tamanho, do formato e do modo de distribuição da amostra a ser analisada.

O teor de umidade encontrado para o extrato do epicarpo rota-evaporado foi de 13,5%, pode-se considerar um baixo teor de umidade, o que assegura uma maior estabilidade microbiológica e química do extrato, pois a água acelera os processos de degradação químico e microbiológico. Enquanto o extrato da semente, processado a partir do mesmo lote de frutos, apresentou teor de umidade de 7,5%. Este menor teor de umidade encontrado no extrato das sementes deve-se provavelmente ao maior teor de lipídios presentes nesse extrato.

4.2 Caracterização química do extrato

4.2.1 Teor de polifenóis totais

Os compostos polifenólicos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários vegetais, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas. Estas substâncias exibem uma vasta gama de efeitos biológicos onde muitos destes têm sido atribuídos a sua atividade antioxidante e ao sequestro de radicais livres (FU et al., 2012). As hidroxilas fenólicas, particularmente aquelas adjacentes, e o número total de hidroxilas na molécula induzem grandes diferenças de atividade antioxidante e outras atividades, como quelante de metais de transição, entre os polifenóis. O potencial redutor, sequestrador de radicais livres e quelante de metais de transição dos polifenóis contribuem para que estes compostos inibam a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUZA et al., 2008). Por isso, esses compostos têm atraído o interesse da indústria química, de alimentos, farmacêutica e cosmética (KALIA et al., 2008).

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu que consiste na redução da mistura de ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico (coloração amarela), em meio alcalino, a óxidos de tungstênio e molibdênio pelos compostos fenólicos. Com a adição de carbonato de sódio, o meio reacional adquire um valor de pH 10 que favorece a formação e a oxidação de ânions fenolatos pelo reagente de Folin-Ciocalteu. O resultado desta oxidação é a formação de um complexo tungstênio-molibdênio de coloração azul com intensa absorção próxima a 760 nm (SOUZA et al., 2008).

O conteúdo de polifenóis foi determinado usando a equação da reta, $y = 0,0068x - 0,0817$ ($r = 0,9996$), calculada a partir da curva de calibração obtida do gráfico da concentração de ácido gálico versus absorvância. A quantidade de polifenóis encontrada para os extratos de epicarpo e semente da *G. brasiliensis* foi de 69,84 e 79,81 mg EAG/g (mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato), respectivamente (Tabela 1). ACUÑA et al. (2012) avaliaram o conteúdo de polifenóis de oito espécies diferentes de *Garcinia* e verificaram que os teores encontrados variaram de 115,5 mg EAG/g a 476,9 mg EAG/g. Ao comparar estes resultados e aquele encontrado para o extrato da semente (Tabela 1), obtido de um mesmo lote de frutos de *Garcinia brasiliensis*, com o valor encontrado para o extrato do epicarpo verificou-se que os compostos fenólicos presentes neste estavam em quantidades inferiores e consequentemente, isto pode refletir na redução da atividade antioxidante.

Tabela 1: Rendimento do processo de extração, teores de polifenóis totais, flavonoides e lipídios encontrados nos extratos etanólicos de *Garcinia brasiliensis*.

<i>Garcinia brasiliensis</i>	Rendimento (%)	Polifenóis totais (mg EAG/g de extrato)	Flavonoides (mg EQ/g de extrato)	Lipídios (%)
Epicarpo	10	69,84	3,40	45,92
Semente	10	79,81	13,70	57,32

4.2.2 Teor de flavonoides

Dentre os polifenóis, a classe dos flavonoides é aquela com maior número de compostos e com ampla atividade biológica, dentre elas destacam-se a atividade antioxidante, e alguns dos compostos dessa classe mostram também propriedade quelante de metais de transição. A quercetina é considerada como padrão da classe dos flavonoides, sendo o composto com maior número de estudos relacionando estrutura química e atividade antioxidante. (DE MARINO et al., 2012). Por isso, dentre as classes de polifenóis é importante avaliar os flavonoides presentes no extrato.

O método colorimétrico de determinação de flavonoides totais é considerado uma alternativa simples, barata e rápida (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998) que tem como princípio a formação de complexos estáveis entre o cloreto de alumínio e o grupo ceto do carbono C-4 e o grupo hidroxila do carbono C-3 de flavonas e flavonóis (CHANG et al., 2002). Os complexos estáveis formados proporcionam mudança no comprimento de onda de absorção dos flavonoides o que possibilita a sua detecção e quantificação na presença de outros compostos fenólicos. Além disso, o complexo Al^{3+} /flavonoide proporciona aumento da absorção na região visível do espectro (FUNARI; FERRO, 2006; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

Os extratos do epicarpo e da semente (obtidos do mesmo lote de frutos) apresentaram teores de flavonoides de 3,40 e 13,70 mg EQ/g (mg de equivalente de quercetina por g de extrato) (Tabela 1), respectivamente, que foram calculados por meio da equação $y = 0,0066x - 0,019$ ($r = 0,9977$) obtida da análise estatística da curva padrão da quercetina (concentrações de quercetina versus absorvância). O teor de flavonoide encontrado para o extrato de epicarpo foi cerca de 4 vezes menor ao do extrato de semente, enquanto o teor de polifenóis do extrato do epicarpo foi cerca de 1 vez menor em relação aquele obtido para o extrato de semente. Estes resultados sugerem que os extratos diferem em composição

química, pois os flavonoides em suas variáveis formas estruturais reagem diferentemente com o cloreto de alumínio, resultando em complexos com diferentes intensidades de absorção em 420 nm. O extrato do epicarpo também apresentou teor de flavonoides inferior aos valores encontrados para o extrato de *Garcinia mangostana* (fonte de flavonoides, xantonas, mangostina, taninos, entre outras) (HASNAH et al., 2011).

4.2.3 Teor de lipídios

Os lipídios desempenham um importante papel no que se refere à qualidade de produtos em relação a suas características organolépticas como *flavor*, cor e textura. Estes compostos são responsáveis pelo valor nutritivo dos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Os teores lipídicos de frutas e hortaliças são baixos. Sendo que os maiores teores são encontrados em sementes, principalmente nas oleaginosas (ROCHA, 2008).

Segundo ROCHA et al. (2008), os valores médios de lipídios para a casca de frutos como banana, laranja, limão, manga e maracujá variaram de 0,11% a 1,02% e para semente de abóbora o valor encontrado foi de 8,70%. O teor de lipídios da casca e da porção comestível do abacate, considerado o fruto mais calórico, foram 11,04% e 8%, respectivamente (GONDIM et al., 2005).

Frutos da Amazônia como ingá, carambola, cupuaçu, açaí, buriti e castanha do Brasil apresentaram teores de lipídios que variaram em ordem crescente de 0,00 a 63,87% (AGUIAR, 1996). E frutos do cerrado como gabioba, puçá, cagaita, araçá, macaúba e chichá apresentaram um conteúdo lipídico em ordem crescente de 0,12 a 21,15% (SILVA et al., 2008).

Ao comparar os teores de lipídios citados com aqueles encontrados para o extrato do epicarpo (Tabela 1) foi possível observar que esse fruto típico da região Amazônica apresentou alto teor de lipídios. Isso pode influenciar a estabilidade química dos extratos, pois os lipídios podem sofrer reações de oxidação. Os lipídios sob ação do calor, luz e metais de transição pode reagir com o oxigênio molecular, gerando uma reação em cadeia com a formação de compostos oxigenados como álcoois, aldeídos, cetonas e peróxidos que poderão conferir odores desagradáveis. A degradação oxidativa pode ocorrer por fotoxidação (exposição à RUV), autooxidação (reações radiculares capazes de auto-propagação) e oxidação

enzimática (ação das lipoxigenases) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Os compostos fenólicos antioxidantes podem limitar o fenômeno de oxidação e consequentemente, favorecer a estabilidade dos lipídios.

4.3 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoquimioprotetora do extrato do epicarpo pela medida da atividade antioxidante por diferentes métodos.

Os efeitos adversos do estresse oxidativo induzido pela RUV é uma questão séria de saúde pública nos dias de hoje. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), entre 1950 e 2025, a população brasileira acima de 60 anos crescerá 16 vezes, enquanto a população geral sofrerá aumento de cinco vezes. O aumento da expectativa de vida da população mundial, uma realidade também nos países em desenvolvimento, tem estimulado o estudo do processo de envelhecimento, principalmente do fotoenvelhecimento, decorrente da exposição a fatores ambientais, como a RUV. Os riscos associados à depleção da camada de ozônio são devidos, principalmente, ao aumento da radiação UVB no ambiente. Os seres humanos têm três órgãos cujas células e tecidos estão expostos à luz solar: os olhos, o sistema imune e a pele, e sobre estes três sistemas que os efeitos da radiação solar é documentado (DE GRUIJL, 1999; MONTAGNER; COSTA, 2009).

O efeito da radiação solar sobre a pele é acumulativo que depende do grau de exposição e da pigmentação cutânea. O dano desta radiação sobre diversas estruturas celulares e cutâneas proporciona alterações morfológicas nesses componentes, fruto de modificações biomoleculares, induzidas por EROs geradas pela absorção da energia solar por moléculas cromóforas presentes em tecidos/células do organismo. Os efeitos da radiação sobre a pele pode ser agudo, representado pela queimadura do sol, como vermelhidão da pele, em casos mais sérios com formação de bolhas, infiltração da epiderme e derme de células inflamatórias como mastócitos, monócitos e linfócitos, e os efeitos crônicos representados pelo fotoenvelhecimento e o câncer de pele.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de combater ou amenizar os efeitos da radiação solar, porém a principal estratégia nesse sentido continua sendo a prevenção, a mudança de hábito, o uso de vestimenta apropriada, os protetores solares, a dieta rica em produtos naturais com altos teores de polifenóis com atividade antioxidante, sequestradora de radicais livres e quelantes de metais de transição, como também a aplicação

tópica de produtos adicionados de extratos vegetais ou de substâncias naturais isoladas eficazes contra o estresse oxidativo gerado pela radiação solar.

Nesse sentido, o extrato do epicarpo do fruto de *G.brasiliensis* foi escolhido para ser avaliado o seu potencial antioxidante e sequestrador de radicais livres por diferentes métodos. Apesar do extrato da semente ter apresentado alto teor de polifenóis e flavonoides, não foi o escolhido para essa fase do trabalho, pois se mostrou altamente instável, com mudança de coloração.

4.3.1 Determinação da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]

O radical livre orgânico estável, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), é amplamente utilizado para avaliação do potencial sequestrador de radicais livres de compostos antioxidantes, embora tenha limitada semelhança com radicais peróxido e não esteja presente nos sistemas biológicos (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). O ensaio com DPPH[•] é baseado em medida espectrofotométrica da mudança de concentração do radical DPPH[•] resultante da reação do radical com o composto antioxidante. À medida que o radical aceita um átomo de hidrogênio (H) da molécula antioxidante sofre redução passando de DPPH[•] para DPPH₂, resultando na mudança da coloração púrpura da solução etanólica de DPPH[•] para amarela, com concomitante decréscimo de absorção em 515 nm (ANDRADE et al., 2007; BALBOA et al.; DENG; CHENG; YANG, 2011).

A concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH[•] para 50% (chamada de IC₅₀) é usada para comparação da atividade antioxidante de diferentes compostos. O cálculo do valor de IC₅₀ requer a determinação da cinética de reação entre DPPH[•] e diferentes concentrações do antioxidante ou da mistura de antioxidantes (DENG; CHENG; YANG, 2011).

A Figura 4 mostra a cinética de reação entre o extrato do epicarpo e o DPPH[•], a % máxima de redução do radical foi de 60% e o valor de IC₅₀ calculado foi de 47,46 µg/mL.

Figura 4: Percentual de redução do radical DPPH• em função do Log das concentrações de 0,5 a 4 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*. O valor de IC₅₀ foi obtido pela média de três determinações.

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 superóxidos, 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). Esta substância foi empregada como padrão para esta técnica e segundo VICENTINI et al. (2007b) seu valor de IC₅₀ foi de 0,8 µg/mL. O extrato do epicarpo foi cerca de 57 vezes maior que o padrão quercetina.

Ao analisar outras espécies do gênero *Garcinia*, foi possível verificar que o extrato etanólico do pericarpo de *Garcinia mangostana* Linn. apresentou um valor de IC₅₀ igual a 6,13 (PEDRAZA-CHAVERRI et al., 2008) e o extrato acetato de etila do fruto de *Garcinia xanthochymus* apresentou uma IC₅₀ de 16,74 µg/mL (FU et al., 2012), ambos apresentaram um forte potencial em reduzir o radical DPPH• quando comparado com o extrato do epicarpo. Extratos avaliados pelo nosso grupo de pesquisa tais como *Inga edulis* (extrato e fração de média polaridade com IC₅₀ = 5,21 µg/mL e IC₅₀ = 4,88 µg/mL) (FERNANDES, 2012), *Eugenia protenta* (IC₅₀ = 11,11 µg/mL) e *Miconia minutiflora* (IC₅₀ = 3,63 µg/mL) (FORTES, 2012) também apresentaram forte capacidade redutora do radical DPPH•. Contudo, os resultados apresentados por DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY (2012), mostram que a atividade antioxidante estimada pelo ensaio de DPPH•, depende do tipo e quantidade de solvente usado para a dissolução do antioxidante, do conteúdo de água, da concentração de íons presentes e da concentração de íons hidrogênio no meio reacional.

Assim, a comparação dos valores de IC₅₀ de diferentes extratos não poderia ser considerada a não ser que sejam determinados nas mesmas condições experimentais.

4.3.2 Avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

O papel da pele como um múltiplo sistema de defesa, bioquímico, biológico, imunológico, físico, mecânico e térmico tem sido um ativo campo de investigação dermatológica. Os riscos ambientais, particularmente a RUV, desafiam a função barreira da pele. O estresse oxidativo desempenha um papel central na resposta cutânea a RUV. A formação de EROs, oxigênio singlete (¹O₂), ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila ([•]OH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) resultantes de reações fotoquímicas mediadas por UVA e UVB, podem oxidar ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) presentes nos fosfolipídios das membranas celulares do estrato córneo. Peroxidação lipídica é um processo complexo iniciado pela abstração de 1 átomo de hidrogênio de uma molécula de AGPI, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH), radicais peroxilas (LOO[•]), alcóxila (LO[•]), pelas espécies radicalares geradas pela RUV. Este processo conduz a produção de compostos tóxicos, síntese de uma variedade de metabólitos, incluindo eicosanoides exibindo potentes efeitos pró- e/ou anti-inflamatórios, formação de lipídios bioativos, lesão do tecido, ativação da regulação dos passos de sinalização celular e de genes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; LIMA; ABDALLA, 2001).

Medidas preventivas como o uso de produtos tópicos para amenizar a peroxidação lipídica representam possível método de proteção da pele. Por isso, a importância de avaliar a eficiência dos extratos vegetais em inibir a peroxidação lipídica induzida pela radiação solar.

O ensaio *in vitro* de inibição da peroxidação lipídica envolve uma reação colorimétrica entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de AGPI, liberados durante a incubação aeróbia de membranas de homogenatos de tecidos, como é o caso das mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Em um sistema completamente livre de peróxidos lipídicos, a presença de Fe⁺² é o fator crucial para a propagação da reação de Fenton/Harber Weiss [Fe²⁺+H₂O₂→Fe³⁺+ OH[•]+OH⁻] e consequentemente, para a formação do radical hidroxila. Os radicais hidroxilas produzidos podem iniciar um processo de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio dos fosfolipídios 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).

Os radicais formados são espécies lábeis que sofrem mudanças e deterioração levam a formação de produtos secundários tais como o pentanal, hexanal, 4-hidroxinonanal e principalmente MDA. O MDA é um aldeído que reage com duas moléculas de TBA, gerando um cromóforo rosa que é detectado por espectrofotometria em 535 nm (MARQUELE et al., 2005).

O extrato do epicarpo apresentou uma inibição da formação de espécies reativas que reagem com TBA em torno de 90% (Figura 5) e a concentração que inibiu 50% da peroxidação inicial foi de 425,06 $\mu\text{g/mL}$. O padrão utilizado para este ensaio foi o flavonoide quercetina e segundo CASAGRANDE (2005), o valor de IC_{50} encontrado para o mesmo foi de 0,34 $\mu\text{g/mL}$. O extrato em estudo apresentou um valor de IC_{50} 1250 vezes maior que o padrão quercetina. Isto indica que o extrato do epicarpo possui poucos compostos com potencial sequestrador dos radicais formados durante a peroxidação lipídica.

MARQUELE-OLIVEIRA et al. (2006) citaram ensaios de peroxidação lipídica de compostos como Isoflavin Beta, Trevo Vermelho, quercetina e α -tocoferol para os quais os valores de IC_{50} foram de 0,033 $\mu\text{g/mL}$, 0,032 $\mu\text{g/mL}$, 0,34 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e em outro trabalho MARQUELE-OLIVEIRA et al. (2007) mostraram que os extratos alcoólico e glicólico de própolis apresentaram uma IC_{50} de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 23 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e ao compará-los com o extrato do epicarpo verificou-se que este apresentou capacidade de inibição da peroxidação lipídica muito inferior devido ao alto valor de IC_{50} .

Figura 5: Percentual de inibição da peroxidação lipídica em função do Log das concentrações de 0,031 a 4,0 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*. O valor de IC_{50} foi obtido pela média de três determinações.

4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol

O método de quimioluminescência é bastante utilizado para medida da atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, apresenta alta sensibilidade, rapidez, boa reprodutibilidade e também é o método mais empregado para avaliação do potencial antioxidante de compostos solúveis em água, pois o meio reacional é aquoso. Esta técnica está sendo empregada no monitoramento de radicais livres, enzimas, detecção e ensaios de biomoléculas (GIROTTI et al., 2000).

Este método permitiu avaliar a capacidade do extrato do epicarpo em sequestrar radicais superóxidos formados no sistema xantina/XOD/luminol de acordo com a equação 2:

O sistema xantina/XOD/luminol emite luz pela oxidação do luminol, usado como detector de ânions superóxidos gerados pela oxidação da xantina (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2006), sendo que a quantidade de luz emitida é proporcional a atividade da enzima xantina oxidase (GIROTTI et al., 2000).

A luz emitida (fótons) pode ser reduzida neste sistema, pela inibição da atividade da enzima xantina oxidase, pela captura de radicais superóxidos produzidos a partir desta ou pela redução do luminol oxidado (PIETTA, 2000).

O ânion superóxido está presente em processos como reparação celular, transporte de elétrons pela membrana celular da mitocôndria de bactérias, ação enzimática da xantina oxidase, aldeído oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase ligada à membrana celular de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (PIETTA, 2000).

O ânion superóxido formado *in vivo* é quase completamente convertido pela superóxido dismutase ou por dismutação não enzimática em H_2O_2 . Ambos O_2^- e H_2O_2 podem encontrar algumas moléculas alvo nas quais podem causar danos diretos (HALLIWELL et al., 1995).

A intensidade de luz emitida pelo sistema xantina/luminol/XOD foi inibida pelo extrato do epicarpo de forma dose dependente com um valor de IC_{50} de 3,274 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6). O composto padrão para este ensaio foi o flavonoide quercetina que, segundo FONSECA (2010), apresentou um valor de IC_{50} de 11,3 $\mu\text{g/mL}$. O valor encontrado para o extrato do

epicarpo foi cerca de 3,4 menor aquele obtido para a quercetina. Estudos em nosso grupo de pesquisa mostraram que para o extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis* os valores de IC_{50} foram de 0,32 $\mu\text{g/mL}$ e de 0,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FERNANDES, 2012) e para *Eugenia biflora* e *Miconia minutiflora* foram de 1,23 $\mu\text{g/mL}$ e 1,69 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FORTES, 2012), ou seja, estes extratos apresentaram forte potencial em sequestrar radicais superóxidos, diferente do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*.

Figura 6: Percentual de inibição da luz emitida no sistema xantina/XOD/luminol em função do Log das concentrações de 0,031 a 4,0 mg/mL do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*. O valor de IC_{50} foi obtido pela média de três determinações.

Ao analisar os resultados referentes às atividades antioxidantes do extrato do epicarpo pelos diferentes métodos utilizados (Tabela 2), observou-se que o método de avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol (sequestro de radicais superóxidos) foi o método que apresentou menor valor de IC_{50} . Sequencialmente a este ensaio foi avaliada a capacidade do extrato em inibir a enzima xantina oxidase (dados não mostrados) e os resultados mostraram que componentes presentes no extrato inibiram muito pouco a enzima. Isto indica que o valor de IC_{50} obtido está relacionado à presença de compostos no extrato do epicarpo com potencial antioxidante ou/e sequestrador do radical superóxido.

Assim, o extrato do epicarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis* foi mais eficiente para sequestrar os radicais gerados na peroxidação lipídica, seguido pela eficiência em sequestrar o radical estável DPPH• e, finalmente, mostrou ser pouco eficaz na eliminação do radical superóxido gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase/luminol. Estes dados sugerem que os componentes antioxidantes e/ou sequestradores de radicais livres presentes no extrato do epicarpo podem ser mais lipofílicos que hidrofílicos, pois a menor eficiência do extrato foi determinada em meio reacional aquoso. No entanto, esse potencial antioxidante do extrato

em estudo mostrou-se muito menor que outros extratos já estudados. Isso pode ser devido ao baixo teor de polifenóis e flavonoides encontrados. Uma vez que, segundo BALBOA et al. (2013), EDZIRI et al. (2012), CARVALHO-SILVA et al. (2012) e CAROCHO; FERREIRA (2013), a atividade antioxidante está correlacionada com a presença de compostos fenólicos.

Tabela 2: Comparação entre os valores de IC₅₀ obtidos pelos extratos etanólicos de *Garcinia brasiliensis* nos diferentes ensaios da atividade antioxidante.

<i>Garcinia brasiliensis</i>	Redução DPPH• (µg/mL)	Sistema xantina/XOD/luminol (µg/mL)	Inibição da peroxidação Lipídica (µg/mL)
Epicarpo	47,46	3,27	425,06
Semente	13,40	1,24	55,05

Apesar do extrato do epicarpo não ter apresentado grande quantidade de polifenóis e flavonoides, segundo PEREIRA et al. (2010) ele apresentou em sua constituição benzofenonas polipreniladas como a 7-epiclusianona, a guttiferona A e a garciniafenona, todas detectadas por CLAE (Figura 7). O percentual da benzofenona majoritária, 7-epiclusianona, encontrado no extrato do epicarpo foi de 15%, e para o cálculo foi utilizado a equação da reta obtida pela análise estatística dos dados da curva analítica do padrão, 7-epiclusianona. Este valor foi similar ao encontrado por NALDONI et al. (2009), onde ele cita um percentual de 15 a 20% para as mesmas benzofenonas. A análise dos espectros de absorção na região UV/Visível do extrato do epicarpo e da benzofenona-3 sintética comercial, sugerem que as benzofenonas do extrato podem ter a capacidade de absorver a RUV semelhante às benzofenonas sintéticas comerciais, como representado na Figura 8 (NUNES; CAMPOS; MAGALHÃES, 2008). As benzofenonas são agentes absorventes das radiações UVA e UVB utilizadas na indústria e na medicina por mais de 30 anos. Os seus derivados são amplamente usados em produtos cosméticos fotoprotetores para combater os efeitos da RUV (NAKAGAWA; SUZUKI; TAYAMA, 2000).

Figura 7: Cromatograma do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostrando a presença das benzofenonas: (1) 7-epiclusianona, (2) garciniafenona e (3) guttiferona A (PEREIRA et al., 2010).

Figura 8: Espectros de absorção no UV/Visível: (A) benzofenona-3 sintética adaptada de NUNES; CAMPOS; MAGALHÃES (2008) e (B) extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*.

Pela presença dessas benzofenonas no extrato do epicarpo resolveu-se investigar o seu potencial fotoprotetor.

4.4 Avaliação da citotoxicidade, fotoestabilidade e fotoproteção do extrato em culturas de células de fibroblastos

4.4.1 Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são baseados no conceito que compostos químicos tóxicos podem afetar as funções básicas e comuns entre todas as células causando danos funcionais e estruturais mensuráveis. A avaliação da citotoxicidade utilizando culturas de células possibilita de uma forma rápida, padronizada e sensível analisar a presença de moléculas biologicamente nocivas de um número elevado de extratos (LOPES et al., 2011).

Linhagens de células imortalizadas são de fácil cultivo, constituídas de uma população de células homogêneas e de alta reprodutibilidade, sendo assim adequadas para se efetuar a triagem de citotoxicidade de substâncias isoladas e/ou misturas complexas como os extratos (LOPES et al., 2011).

As células de fibroblastos são as células mais comuns entre todos os tipos de tecidos conjuntivos, sendo ativamente envolvidas na síntese e na manutenção da matriz extracelular colagenosa, na modulação do comportamento adjacente das células como migração, proliferação e diferenciação. Desta forma, a avaliação biológica com culturas de fibroblastos pode ser considerada um bioensaio padrão para o fornecimento de informações confiáveis sobre a citotoxicidade basal. A linhagem de fibroblasto L929 é amplamente utilizada em ensaios de toxicidade, principalmente, relacionados à viabilidade celular e a propriedades proliferativas (LOPES et al., 2011).

Os efeitos citotóxicos do extrato do epicarpo foram avaliados em fibroblastos de camundongos da linhagem L929 por meio da avaliação do parâmetro biológico viabilidade celular. A viabilidade celular pode ser evidenciada pelo uso de corantes (ROGERO et al., 2003) sendo que neste estudo o método utilizado foi o ensaio do corante vermelho neutro.

O corante vermelho neutro é solúvel em água e atravessa a membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares resultando no decréscimo da captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre as células vivas e danificadas ou mortas, pela medida da intensidade da cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003).

A citotoxicidade observada para as células de fibroblastos L929, tratadas com diferentes concentrações do extrato do epicarpo, foi expressa como percentual de viabilidade celular, ou seja, quanto menor o percentual maior a citotoxicidade. À medida que aumentou a concentração do extrato aplicado nas células ocorreu uma redução gradativa na viabilidade celular que variou de 15% para a concentração de 3,12 µg/mL a 90% para a concentração de 50 µg/mL (Figura 9). Estes resultados sugerem que a perda da viabilidade celular pode ser devido à presença no extrato de componentes tóxicos que podem provocar lesões estruturais e funcionais às células (LOPES et al., 2011). Uma vez que, um ensaio realizado com o solvente utilizado no preparo das amostras não causou redução na viabilidade das células de fibroblastos (dados não mostrados) evidenciando que a toxicidade foi referente aos componentes do extrato.

Extratos do nosso grupo de pesquisa como *Eugenia biflora* foi capaz de reduzir a viabilidade das células de L929 em 88% na concentração de 25 µg/mL mostrando ser mais citotóxico que o extrato em estudo (FORTES, 2012). Já os extratos de *Miconia minutiflora*, *Protium heptaphyllum* (FORTES, 2012), *Inga edulis* (FERNANDES, 2012) e *Solanum paludosum* (SIQUEIRA, 2010) apresentaram um menor potencial citotóxico quando comparado com o extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*. Uma vez que, na concentração de 50 µg/mL, o percentual de redução da viabilidade celular desses extratos foram de 58%, 38%, 0% e 0%, respectivamente.

TIANO et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂), filtros UV inorgânicos, amplamente usados em protetores solares por serem considerados inertes e seguros, e verificaram que estas partículas não foram capazes de reduzir a viabilidade de fibroblastos humanos.

Figura 9: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratadas com o extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* em uma faixa de concentração de 1,56 a 50 µg/mL. Os resultados representam a média de cinco determinações $\pm$ DP.

4.4.2 Fotoestabilidade

Os filtros solares têm sido recomendados a longo tempo como medida protetora da pele contra as quantidades excessivas de luz solar. Alguns protetores solares têm seu espectro de absorção alterado após a exposição à RUV contribuindo desta maneira para as lesões fotodanosas da pele. A fim de garantir a eficácia constante ao longo de todo o período de exposição ao sol, os produtos solares devem ser submetidos a estudos de fotoestabilidade durante o seu desenvolvimento. Com isso, pode-se impedir a formação de intermediários reativos, oriundos de substâncias instáveis, que alteram seu desempenho espectral e quando em contato direto com a pele podem se comportar como foto-oxidantes na geração de EROs ou promover dermatites de contato fototóxicas ou fotoalérgicas (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011).

Este estudo pode ser realizado com os filtros UV orgânicos isoladamente ou em associação, uma vez que a formulação fotoprotetora pode conter também filtros inorgânicos, antioxidantes e outros excipientes que podem fotocatalisar a degradação dos componentes ativos (KOCKLER et al., 2012).

Diante da necessidade de estudos de fotoestabilidade, o extrato do epicarpo foi exposto a altas doses de radiação UVA e UVB e possíveis produtos de degradação gerados pela radiação foram avaliados pela medida da viabilidade das células de fibroblastos (linhagem L929). Com o objetivo de comparar a dose de radiação utilizada nos estudos com a luz solar,

foi realizada a medição da luz do sol em dois dias do mês de outubro no período das 11 horas da manhã até às 13 horas da tarde na cidade de Ribeirão Preto, utilizando o mesmo radiômetro utilizado nos estudos. Nestes dias, os termômetros marcaram 38° C. As medidas para radiação UVA foram 11,20 J/cm² e para radiação UVB foram 3,43 J/cm² durante 2 horas de exposição. Sendo assim, as radiações UVA de 26,62 e 53,24 J/cm² utilizadas no estudo corresponderam a aproximadamente 5 e 10 horas de exposição solar. Enquanto as radiações UVB de 4,37 e 8,74 J/cm² corresponderam a 2,5 e 5 horas de exposição solar, nas condições referentes ao momento da medição.

A exposição do extrato vegetal à RUV pode proporcionar a degradação de seus componentes, produzindo subprodutos potencialmente citotóxicos. Assim, o extrato exposto à radiação UVA e UVB foi avaliado quanto a citotoxicidade.

Os efeitos citotóxicos do extrato do epicarpo foram avaliados em células de fibroblastos da linhagem L929 pelo ensaio do corante vermelho neutro após 24h da exposição à RUV. Os resultados encontrados mostraram que houve uma redução de aproximadamente 80% da viabilidade celular após exposição do extrato, na concentração de 25 µg/mL, à radiação UVA enquanto que para o extrato não irradiado, na mesma concentração, a perda de viabilidade foi de 50%. Isto sugere o aparecimento de sinais de toxicidade, onde a radiação UVA pode ter proporcionado a degradação de componentes do extrato, gerando produtos tóxicos às células após atingirem uma determinada concentração no meio. A citotoxicidade foi expressa em percentual de viabilidade celular como representada na Figura 10.

Figura 10: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com concentrações de 1,56 a 50 µg/mL de extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* não irradiado e irradiado com radiação UVA nas doses de 26,62 J/cm² e 53,24 J/cm². Os resultados representam a média de cinco determinações ± DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao extrato não irradiado, usando o teste de ANAVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

No entanto, este mesmo extrato, na mesma concentração (25 µg/mL), causou uma redução de aproximadamente 90% da viabilidade celular quando exposto a dose de 8,737 J/cm² de radiação UVB (Figura 11). Esses resultados sugerem que componentes do extrato podem ser mais sensíveis à radiação UVA que a UVB.

Figura 11: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com concentrações de 1,56 a 50 µg/mL de extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* não irradiados e irradiados com radiação UVB nas doses de 4,37 J/cm² e 8,74 J/cm². Os resultados representam a média de cinco determinações ± DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao extrato não irradiado, usando o teste de ANAVA de duas vias, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O extrato do epicarpo apresentou um alto teor de lipídios que pode ter contribuído para a toxicidade após a exposição à RUV, uma vez que estes compostos oxidam facilmente quando expostos à radiação e ao oxigênio. Os sinais de toxicidade observados aumentaram de maneira dose dependentes, sendo os resultados encontrados altamente reproduzíveis. Em nosso grupo de pesquisa, há outros extratos vegetais que foram submetidos ao mesmo ensaio de estabilidade e seus resultados mostraram redução no percentual de viabilidade somente em concentrações elevadas. Isto pôde ser visto no extrato de *Inga edulis*, onde a concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade de células de fibroblastos foi de 156 µg/mL e 312 µg/mL quando expostos às radiações UVA e UVB, respectivamente.

4.4.3 Avaliação do potencial fotoprotetor do extrato do epicarpo

Um método *in vitro* usando cultura de células e medida da viabilidade celular foi padronizado para avaliar o potencial fotoprotetor do extrato do epicarpo e de formulação adicionado deste.

Os pesquisadores CAYROL et al. (1999) e VIELHABER et al. (2006) desenvolveram um ensaio que usava células de fibroblastos humanos primários cultivados em microplacas cobertas com placa de quartzo que servia de suporte para aplicação das amostras dos protetores solares. O conjunto microplaca com células e placa de quartzo com amostras de protetores solares foi exposta à RUV. Após a radiação, as alterações sofridas pelas células devido à RUV foram avaliadas, quantificadas e os dados obtidos foram relacionados com fator de proteção dos protetores solares determinados por métodos *in vivo* preconizados pelas agências regulatórias, como FDA e COLIPA. Pesquisadores como CAYROL et al. (1999) quantificaram os danos sofridos pela molécula de DNA devido a exposição à RUV por meio da determinação da síntese de DNA não programada. Enquanto, (VIELHABER et al., 2006) investigaram a capacidade de filtros UVA-1 em diminuir a expressão de metaloproteinase-1, interleucina 1 e internleucina 6.

Em nosso laboratório procuramos padronizar um método *in vitro* usando as células imortalizadas de fibroblastos L929 e a medida da viabilidade celular por meio do ensaio do corante vermelho como parâmetro para avaliar a alteração induzida pela radiação UVB a célula. A padronização do método foi iniciada com a definição da dose de irradiação UVB a ser utilizada para promover redução da viabilidade celular em torno de 50%. Para isso, as microplacas contendo as células L929 foram expostas a doses de 0,060 J/cm², 0,090 J/cm², 0,125 J/cm², 0,250 J/cm² e 0,500 J/cm² e o percentual de viabilidade variou entre 8 a 60%, em

ordem decrescente da dose aplicada. Diante disso, a dose selecionada para os ensaios posteriores foi 0,090 J/cm².

A segunda etapa da padronização foi definir o período de incubação das células nas microplacas após exposição à radiação UVB. Assim, as células foram incubadas a 37° C, nos tempos 0, 24 e 48 horas, e depois analisadas quanto a porcentagem de células viáveis. Alta perda da viabilidade celular foi detectada após 48 horas de incubação e foi o tempo escolhido para incubação das células, após a exposição à radiação UVB.

Com as primeiras etapas da padronização concluídas, iniciou-se a fase experimental de avaliação do efeito fotoprotetor utilizando culturas de fibroblastos da 2^a a 8^a passagem. No entanto, foi verificado que usar células da 3^a a 8^a passagens permitiram detectar maior diferenciação entre amostras de protetores solares com diferentes fatores de proteção solar (FPS) e a reprodutividade do método foi maior. BOZA et al. (2010) também trabalharam com células de fibroblastos da mucosa oral da 4^a a 10^a passagem.

O ensaio foi padronizado usando amostras comerciais de protetores solares de duas marcas diferentes (A e B) e com diferentes FPS, FPS-15, FPS-30 e FPS-60. Estes são produtos de administração tópica com capacidade de absorver, refletir e/ou dispersar a luz solar, reduzindo assim a quantidade ou dose de energia a que a pele poderia estar exposta (NASH; TANNER; MATTS, 2006). Os protetores solares usados no estudo foram registrados em uma agência regulatória, apresentam eficácia comprovada e composição química de ativos diferente (Tabela 3).

Tabela 3: Composição e classificação de filtros UV orgânicos e inorgânicos dos protetores solares comerciais das marcas A e B com fatores de proteção solar (FPS) 15, 30 e 60.

<i>Composição química</i>	Protetor Solar (Marca A)			Protetor Solar (Marca B)			<i>Classificação dos Filtros</i>
	<i>FPS- 15</i>	<i>FPS- 30</i>	<i>FPS- 60</i>	<i>FPS- 15</i>	<i>FPS- 30</i>	<i>FPS- 60</i>	
Etilhexil Salicilato	x	x	x	x	x	x	UVB
<i>Benzofenona-3</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>				<i>UVA/UVB</i>
Etilhexil Triazona	x	x	x				UVA/UVB
<i>Butil</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>UVA</i>
<i>Metoxidibenzoilmetano</i>							
Octocrileno	x	x	x	x	x	x	UVB
<i>Bis-Etilhexiloxifenol metoxifenil Triazona</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>				<i>UVA/UVB</i>
Homosalato				x	x	x	UVB
<i>Dietilamino</i>				<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>UVA</i>
<i>Hidroxibenzoil Hexil Benzoato</i>							
Fenilbenzimidazola				x	x	x	UVB
ácido sulfônico							
<i>Dióxido de Titânio</i>	<i>x</i>	<i>x</i>					<i>UVA/UVB</i>

O desempenho fotoprotetor dos protetores solares comerciais analisados foi verificado pelo método *in vitro* em estudo, onde foi possível visualizar diferenças significativas nos percentuais de viabilidade celular para cada um dos fatores de proteção referentes às marcas A e B expostos à radiação UVB (Figura 12). Gráficos relacionando ao percentual de viabilidade celular versus log do FPS foram construídos e a relação entre ambas variáveis foi expressa matematicamente por uma reta de regressão linear, obtida pelo método de ajuste de mínimos quadrados (Figura 13). Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram de 0,97 para o produto A e de 0,98 para o produto B. Estes dados sugerem que não existe uma relação perfeitamente linear entre as duas variáveis. Contudo, o ensaio de viabilidade celular apesar de ser um método *in vitro*, envolve cultura de células, cuja quantidade de célula pode variar de poço para poço, de experimento para experimento, e envolve também uma resposta biológica, a viabilidade celular, onde vários fatores estão envolvidos. Portanto, para esse tipo

de metodologia seria inviável exigir um valor de correlação $\geq 0,999$, mas poderia ser exigido um coeficiente de correção $\geq 0,97$ recomendado para métodos microbiológico de quantificação de potência de antibióticos. Em adição, o método de avaliação da eficiência de proteção solar proposto nesse estudo foi padronizado com produtos comerciais cujos FPS foram determinados por ensaio *in vivo*, empregando seres humanos e a medida do eritema formado, e os FPS foram determinados somente no desenvolvimento dos produtos, e não lote a lote. Assim, o produto comercial que na embalagem está marcado FPS 30, pode ser na verdade 35 ou 25 no lote que foi utilizado para essa padronização. Desta forma, por todos esses problemas o método aqui proposto pode ser considerado padronizado.

Figura 12: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com protetores solares comerciais da marca A e da marca B expostos à radiação UVB. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, A = protetor comercial marca A com FPS -15/30/60 e B = protetor comercial marca B com FPS - 15/30/60. Os resultados representam a média de cinco determinações $\pm$ DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações de múltiplas de Tukey.

Figura 13: Relação entre o percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) versus o Log dos FPS de protetores solares comerciais expressa matematicamente por uma reta de regressão linear obtida pelo método de ajuste de mínimos quadrados. A) Protetores solares da marca A com FPS-15, FPS-30 e FPS-60 e B) Protetores solares da marca B com FPS-15, FPS-30 e FPS-60.

Após comprovar a capacidade do método em discriminar amostras com FPS diferentes, o procedimento foi aplicado na avaliação de extratos vegetais. Uma vez que, do grande número de estudos existentes para a determinação da atividade fotoprotetora de formulações cosméticas, poucos são aplicáveis a extratos vegetais (HUPEL; POUPART; AR GALL, 2011) e os métodos direcionados a avaliação de extratos estão relacionados à degradação de pigmentos fotossintéticos, considerados os primeiros alvos da radiação UVB em plantas (HUPEL; POUPART; AR GALL, 2011; MERZLYAK; SOLOVCHENKO, 2002). O propósito foi encontrar um novo método *in vitro* que fosse capaz de verificar a atividade fotoprotetora de extratos expostos à RUV e que fosse eficiente e reproduzível devido a sua complexa composição.

O delineamento experimental baseia-se na capacidade dos componentes dos extratos em absorverem a radiação e assim, impedirem e/ou amenizarem os danos às células. Para avaliar esta capacidade foram feitas soluções homogêneas de 50 mg/mL de diferentes extratos vegetais tais como extrato da semente de *Garcinia brasiliensis* (grupo de pesquisa de Alfenas – LFQM), extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (extrato em estudo), extrato de *Inga edulis* (ingá), extrato de *Euterpe oleracea* (açaí) e extrato de *Byrsonima crassifolia* (murici) (provenientes de Bélem – PA) e concomitantemente analisou-se também o controle não irradiado, controle irradiado, controle de solvente utilizado na solubilização de cada extrato e protetor solar comercial com FPS 15 da marca comercial A como padrão.

Os resultados mostraram por análise estatística de ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey que quatro dos cinco extratos analisados foram capazes

de amenizar os danos da radiação UVB aos fibroblastos uma vez que, a viabilidade celular apresentou percentual superior ao percentual obtido para o controle irradiado (Figura 14).

Figura 14: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com diferentes soluções de extratos vegetais na concentração de 50 mg/mL, expostas à radiação UVB. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, PS = protetor solar comercial utilizado como padrão, ES = extrato da semente de *Garcinia brasiliensis*, PR = propilenoglicol usado na solubilização do extrato da semente (controle de solvente), EE = extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis*, TR = triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico usado na solubilização do extrato do epicarpo (controle de solvente), IN = extrato de *Inga edulis* (ingá), IÇ = extrato de *Euterpe oleracea* (açaí), BY = extrato de *Byrsonima crassifolia* e P+A = propilenoglicol + água usados na solubilização dos extratos de *Inga edulis*, *Euterpe oleracea* e *Byrsonima crassifolia* (controle de solvente). Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao protetor solar (PS), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações de múltiplas de Tukey.

Para investigar melhor a atividade fotoprotetora do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* (extrato de interesse) foi testado também as concentrações de 10 mg/mL, 20 mg/mL e 100 mg/mL juntamente com o extrato bruto. Os resultados encontrados para as concentrações menores (10 e 20 mg/mL) não apresentaram potencial fotoprotetor (Figura 15) e assim, pode-se sugerir que as benzofenonas polipreniladas estariam em baixas concentrações não absorvendo eficientemente a radiação. Já a concentração de 100 mg/mL não apresentou diferença estatística quando comparada com a concentração de 50 mg/mL e com a formulação padrão (Figura 15). Isso sugere que o extrato do epicarpo pode ter potencial fotoprotetor, pois apresentou percentual de células viáveis semelhante à formulação padrão. O extrato bruto quando aplicado sobre a placa de quartzo apresentou opacidade, sugerindo assim que sua atividade fotoprotetora possa ter sido pelo bloqueio físico da radiação.

Figura 15: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com o extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* bruto e em diferentes concentrações, expostos à radiação UVB. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, PS = protetor solar comercial utilizado como padrão, BR = extrato bruto, 10 = extrato na concentração de 10 mg/mL, 20 = extrato na concentração de 20 mg/mL, 50 = extrato na concentração de 50 mg/mL, 100 = extrato na concentração de 100 mg/mL e CS = controle de solvente usado no preparo das diferentes concentrações. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao protetor solar (PS), usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações de múltiplas de Tukey.

Como a metodologia aplicada foi capaz de discriminar concentrações diferentes do extrato do epicarpo, foi proposto analisar também formulações adicionadas de quantidades diferentes do extrato. A partir deste pressuposto, uma formulação cosmética base, cuja composição está descrita na Tabela 4, foi preparada e em seguida adicionada de 2%, 10% e 20% do extrato do epicarpo. A formulação utilizada foi desenvolvida por VILELA (2010) para avaliar a ação de filtros orgânicos UV e sua estabilidade foi garantida por análise de parâmetros físico-químicos. Assim, optou-se em reproduzir esta formulação com o intuito de empregá-la como veículo para a análise da atividade fotoprotetora do extrato.

Tabela 4: Composição percentual dos componentes da formulação cosmética base.

<i>Componentes</i>	<i>% (p/p)</i>
Álcool cetílico	3,50
Ácido esteárico	4,00
Monoestearato de glicerila	5,50
Polawax ^{®*}	3,00
Propilparabeno	0,05
Metilparabeno	0,05
EDTA	0,15
Propilenoglicol	10,00
Água destilada	Qsp

A análise dos resultados mostrou que o extrato do epicarpo no percentual 10% e 20% contém quantidade de compostos fotoprotetores UVB capazes de proteger as células de fibroblastos da ação da radiação UVB (Figura 16). Como já foram mencionados, o extrato do epicarpo contém 15% da benzofenona 7-epiclusianona (benzofenona majoritária identificada). Esta benzofenona associada com as demais benzofenonas também identificadas podem ser as responsáveis pelo efeito fotoprotetor observado.

Figura 16: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos (linhagem L929) tratados com formulações adicionadas de diferentes concentrações do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* expostas à radiação UVB.. Onde, CNI = controle não irradiado, PS = protetor solar comercial utilizado como padrão, CI = controle irradiado, PLAC = formulação placebo, 2% = formulação adicionada de 2% de extrato, 10% = formulação adicionada de 10% de extrato e 20% = formulação adicionada de 20% de extrato. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações de múltiplas de Tukey

O método desenvolvido mostrou ser capaz de avaliar a atividade fotoprotetora de extratos, de formulações adicionadas de extrato e de formulações comerciais de maneira simples, rápida, com baixo custo e utilizando baixa quantidade de amostra. Porém, não pode ser considerado um método robusto o qual necessita de um profissional qualificado e bem treinado para desenvolvê-lo.

4.5 Avaliação *in vivo* da eficácia fotoprotetora da formulação adicionada do extrato

A pele está constante e diretamente exposta ao ar, a radiação solar e poluentes que promovem a formação de radicais livres ou EROs que podem danificar lipídios intracelulares, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em efeitos deletérios como envelhecimento precoce e câncer de pele (PÉLISSIER et al., 1997; PEUS et al., 2001). O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre os mecanismos antioxidantes endógenos e as condições capazes de desencadear reações oxidativas é alterado, colocando em risco a integridade da pele e a manutenção da homeostase celular. Este processo oxidativo promove severa depleção dos antioxidantes que compõem o sistema de defesa endógeno tais como a glutathione reduzida, a

superóxido dismutase e a catalase favorecendo assim, o dano celular (PÉLISSIER et al., 1997; PEUS et al., 2001).

O uso de suplementos botânicos tem recebido imenso interesse nos últimos anos para proteger a pele humana dos efeitos adversos da radiação solar (VARANI et al., 2001). Desta maneira, há uma forte tendência para o desenvolvimento de produtos com componentes naturais, preferencialmente os de origem vegetal. Dentre estes produtos, os fotoprotetores estão sendo muito estudados quanto à adição de extratos vegetais em sua composição (FERRARI et al., 2007; VIOLANTE et al., 2009). Estes extratos contêm compostos fenólicos como flavonoides, taninos, antroquinonas, benzofenonas e alcaloides, que possuem estruturas semelhantes aos filtros orgânicos UV sintéticos e que podem também absorver radiação UV (FERRARI et al., 2007; VELASCO et al., 2008).

Desta forma, a capacidade do extrato do epicarpo incorporado a uma formulação cosmética em reduzir as lesões induzidas pela radiação UVB foi avaliada por medida da sua eficiência em proteger a pele da depleção do antioxidante endógeno GSH, pela inibição da secreção de mieloperoxidases (eficácia anti-inflamatória) e pela quantificação de interleucinas.

4.5.1 Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Para proteger-se do estresse oxidativo, as células possuem um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída por ácido ascórbico, glutathione-redutase (GSH-Rd) e GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986).

A GSH é um tripeptídeo endógeno que representa cerca de 90% do grupo tiol (-SH) intracelular não proteico, existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (STEENVOORDEN; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH da cisteína que atua como sequestrador direto dos radicais livres pela transferência de hidrogênio ao radical. Após a exposição do GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG com a participação da

enzima glutathiona peroxidase. Outra enzima que age conjuntamente com a glutathiona peroxidase é a enzima glutathiona redutase, responsável pela regeneração da glutathiona na sua forma reduzida. Sob condições de excesso de agentes oxidantes haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a redução da sua forma oxidada GSSG, estabelecendo assim o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

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

Os resultados demonstraram que a dose de radiação UVB empregada ($2,87 \text{ J/cm}^2$) causou depleção de 28,28% nos níveis de GSH da pele dos camundongos quando comparado ao grupo controle que não recebeu irradiação (Figura 17). Estes dados estão de acordo com FUCHS et al. (1989), que verificaram uma diminuição significativa imediata da GSH na pele de camundongos sem pelos expostos à radiação UVB em comparação ao controle não irradiado, indicando que o sistema glutathiona é fortemente alterado pelo estresse fotooxidativo.

Ao analisar a Figura 17, foi possível observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos controle não irradiado e não irradiado tratado com a formulação adicionada do extrato do epicarpo, indicando que os componentes da formulação, não promovem modificações nos níveis normais de GSH.

No entanto, o tratamento tópico com a formulação adicionada do extrato do epicarpo exposta a radiação UVB foi capaz de inibir a depleção do GSH em 68,18% (Figura 17). A formulação cosmética base utilizada neste estudo foi desenvolvida por VILELA (2010), a qual verificou que a formulação placebo não causou inibição da depleção dos níveis de GSH. Isto levou a sugerir que a atividade da formulação estudada é atribuída ao extrato incorporado, ou seja, pode ser pelo efeito fotoprotetor das benzofenonas polipreniladas presentes no extrato.

Figura 17: Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação adicionada do extrato do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* pela recuperação dos níveis de GSH depletados em camundongos hairless. Onde, CNI = controle não irradiado (animais não expostos à RUVB), CI = controle irradiado (animais expostos à RUVB), IF = animais irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo, NIF = animais não irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo. * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle não irradiado (CNI) e ** $p < 0,05$ diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

A eficácia da formulação enriquecida com o extrato do epicarpo em proteger a pele exposta à radiação UV da depleção do GSH foi semelhante àquela obtida pelas formulações adicionadas de quercetina, como demonstrado por CASAGRANDE et al. (2006) e VICENTINI et al. (2008) e de extrato concentrado de calêndula, visto por FONSECA (2010).

4.5.2 Avaliação da eficácia anti-inflamatória da formulação adicionada de extrato do epicarpo pela medida da atividade da mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma hidrogênio-peróxido oxidorreductase pertencente à primeira linha de defesa do sistema imune inespecífico, responsável pela atividade microbicida dentro dos neutrófilos humanos (JANTSCHKO et al., 2005). Esta enzima é encontrada especificamente em leucócitos granulocíticos, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, basófilos e eosinófilos (TRUSH; EGNER; KENSLER, 1994). Desde que BRADLEY et al. (1982) descreveram o procedimento utilizado para avaliar a inflamação cutânea pela quantificação de mieloperoxidase epidermal (MPO), esta enzima passou a ser considerada um biomarcador útil para medir e quantificar o influxo de PMNs na pele após exposição a um agente irritante (TRUSH; EGNER; KENSLER, 1994). Sugere-se que o ensaio

de MPO é um método simples e específico para quantificar PMN acumulado ou infiltrado em vários processos patológicos que acompanham a inflamação (XIA; ZWEIER, 1997).

Estudos conduzidos por CASAGRANDE et al. (2006) descreveram que a irradiação UVB induz um aumento dose dependente (0,61- 3,69 J/cm²) na atividade de MPO na pele de camundongos sem pelos. No presente estudo, a irradiação UVB (2,87 J/cm²) induziu um aumento de 175% na atividade de MPO comparado ao grupo controle sem irradiação (Figura 18).

A administração tópica da formulação adicionada do extrato do epicarpo provocou uma queda de 100% da atividade da MPO em relação ao controle irradiado (CI) (Figura 18). Este resultado sugere que a formulação contendo o extrato do epicarpo foi capaz de inibir de forma efetiva a migração leucocitária induzida pela radiação UVB. Observou-se também que não houve diferença significativa entre o controle não irradiado e o grupo tratado com a formulação e não irradiado, o que indica que os componentes da formulação e do extrato não irradiado não foram capazes de alterar os níveis normais de MPO presente na pele (Figura 18).

A atividade da enzima no grupo irradiado tratado com a formulação adicionada de extrato foi muito menor que atividade do grupo controle irradiado sem a formulação e muito próxima à atividade do grupo controle sem irradiação com e sem formulação (Figura 18). Mais uma vez fica evidenciado que a formulação adicionada de extrato foi eficiente no bloqueio da radiação UVB, impedindo a geração de radicais livres, responsáveis pela ativação dos mediadores do processo inflamatório, como a migração de neutrófilos para a área exposta.

Figura 18: Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação adicionada do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* no processo de inibição da atividade de mieloperoxidase (MPO) em camundongos sem pelos. Onde, CNI = controle não irradiado (animais não expostos à RUVB), CI = controle irradiado (animais expostos à RUVB), IF = animais irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo, NIF = animais não irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo. Os resultados representam a média de $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.5.3 Avaliação da eficácia fotoprotetora da formulação adicionada do extrato do epicarpo pela quantificação da interleucina IL-1 β e TNF- α

Uma das primeiras respostas detectáveis da radiação solar UV, principalmente UVB, sobre a pele humana é o aumento da expressão do fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , e citocinas pró-inflamatórias, como também, a ativação de múltiplos receptores de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidermal, receptor do fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), fator de ativação plaquetário, receptor de insulina, receptor da interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (RITTIE, FISHER, 2002). Assim, a liberação dos fatores de crescimento e de citocinas das células epidermais ou de leucócitos infiltrados que atuam de modo autócrina e parácrina para estimular as vias de sinalização intracelular é o modo mais simples no qual a radiação UVB pode modular transdução de sinal (HECK et al., 2004). A ativação dos receptores dos fatores de crescimento e citocinas de modo autócrina e/ou parácrina inicia a sinalização intracelular da MAP quinases, várias tirosina quinases e fosfatases, fosfolípidos e proteína quinase C.

Muitos desses passos levam a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 que são importantes para o controle da expressão gênica. Ativação do fator de transcrição AP-1 pela radiação UV leva a síntese e atividade de metaloproteinases, MMP-3, MMP-9 e MMP-1 que estão envolvidas na degradação do colágeno (XU, FISHER, 2005).

A dose de irradiação UVB de 2,87 J/cm² sobre a pele dos camundongos induziu a um aumento significativo de 463% nos níveis de IL-1 β comparado ao grupo controle sem irradiação (Figura 19). O tratamento tópico com a formulação adicionada do extrato do epicarpo protegeu a pele do aumento dos níveis dessa citocina, com uma diminuição de 63% da liberação do IL-1 β em relação ao controle irradiado. Desta forma, a quantidade da citocina IL-1 β na pele dos animais tratados com a formulação adicionada do extrato e irradiada ficou próximo ao do controle não irradiado (Figura 19).

Figura 19: Concentração de IL-1 β na pele do dorso de camundongos sem pelos tratados com a formulação adicionada de 20% de extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* expostos à radiação UVB. Onde, CNI = controle não irradiado (animais não expostos à RUVB), CI = controle irradiado (animais expostos à RUVB), IF = animais irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo e NIF = animais não irradiados e tratados com a formulação contendo extrato do epicarpo. Os resultados representam a média de $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

O TNF- α foi descoberto em 1975 por Carswell et al., sendo considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunológicos, agindo em diferentes partes do corpo (VITALE; RIBEIRO, 2007). Ele é secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos o principal estímulo para que isto ocorra (VITALE; RIBEIRO, 2007).

Entre as funções benéficas de TNF- α estão os baixos níveis dessa citocina que podem auxiliar na manutenção da homeostase e promover a remodelação ou a substituição de tecido lesionado, o seu papel na resposta imunitária a bactérias, fungos e certas invasões virais e parasíticas, o seu papel na necrose de tumores específicos e como um mediador chave na resposta inflamatória imune local. TNF- α é uma proteína de fase aguda, que inicia uma cascata de citocinas e aumenta a permeabilidade vascular, assim recrutando macrófagos e neutrófilos para um local de infecção (JANEWAY et al., 1999).

A exposição dos animais sem tratamento a 2,87 J/cm² de irradiação UVB promoveu um aumento de 234% na expressão de TNF- α comparado ao grupo controle sem irradiação (Figura 20). Com a aplicação da formulação adicionada de extrato do epicarpo e exposta a radiação, ocorreu uma inibição de 64% na liberação de TNF- α em relação ao controle irradiado (CI), sendo esta quantidade foi muito próxima ao da pele não irradiada (Figura 20).

Figura 20: Concentração de TNF- α na pele do dorso de camundongos sem pelos tratados com a formulação adicionada de 20% de extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* expostos à radiação UVB. Onde, CNI = controle não irradiado (animais não expostos à RUVB), CI = controle irradiado (animais expostos à RUVB), IF = animais irradiados e tratados com a formulação contendo o extrato do epicarpo e NIF = animais não irradiados e tratados com a formulação contendo extrato do epicarpo. Os resultados representam a média de $\pm$ EPM (n=5 animais por grupo). * $p < 0,05$ diferença significativa comparada ao controle irradiado (CI), usando ANAVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

O efeito agudo da radiação solar na pele é complexo e envolve alteração da expressão gênica, liberação de mediadores lipídicos, como prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno B₄, processo este associado ao aumento da síntese de ciclooxygenase -2, prostaglandina e leucotrieno sintetase. A prostaglandina e o óxido nítrico estão envolvidos na primeira fase do

processo inflamatório induzido pela radiação solar que é a vasodilatação, seguido pela segunda fase onde vários tipos de células e mediadores participam das mudanças eritematosas e finalmente a última etapa deste processo é chamada fase regressiva que consiste em um evento anti-inflamatório, onde alguns mediadores e células estão envolvidos. A radiação UVB pode favorecer a ativação de todas essas alterações direta ou indiretamente pela liberação de EROs.

O extrato do epicarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis* não apresentou eficiência antioxidante e/ou sequestradora de radical livre pelos métodos utilizados, mas mostrou atividade fotoprotetora protegendo as células de fibroblastos da linhagem L929 da morte por absorver a radiação UVB. Assim, os efeitos benéficos do extrato, observados nos testes *in vivo*, podem estar relacionados a sua eficiência em absorver a radiação UVB pela presença das benzofenonas que fazem parte da sua composição química. Com a absorção da radiação UVB, pode não ter ocorrido o aumento das prostaglandinas e do óxido nítrico, conseqüentemente levando à diminuição da vasodilatação, primeira fase do processo inflamatório. Esta absorção proporcionou uma drástica diminuição na liberação das citocinas pró-inflamatórias e do TNF- α promovendo assim, a diminuição da migração de leucócitos PMN e linfócitos T para a área exposta à radiação, tendo-se desta forma alteração da segunda fase do processo inflamatório. Com a menor migração destes leucócitos PMN ocorre uma menor atividade da mieloperoxidase e uma menor quantidade de radicais livres liberados por estes PMN e pela radiação UVB bloqueada pelo extrato. Assim, a inibição da depleção do GSH observado pelo extrato pode ser devido à menor produção das EROs do que pelo efeito antioxidante e/ou sequestrador desse extrato.

5. Conclusões

O processo de obtenção do extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* possibilitou a aquisição de um extrato rico em compostos fenólicos e prenitados como as benzofenonas polipreniladas, com baixo teor de umidade o que pode ter proporcionado sua estabilidade durante todo o estudo.

O conteúdo de polifenóis totais e flavonoides presentes no extrato foi baixo resultando em baixa atividade antioxidante pelos diferentes métodos *in vitro* avaliados. Essa caracterização funcional demonstrou o baixo potencial fotoquimioprotetor do extrato em estudo.

A toxicidade celular dose dependente do extrato foi relativamente maior que extratos vegetais do grupo de pesquisa e substâncias fotoprotetoras descritas na literatura.

A análise da fotoestabilidade mostrou maior sensibilidade do extrato quando exposto à radiação UVA que a radiação UVB. Este fato pode ter ocorrido devido ao alto teor de lipídios apresentado, sendo que estes oxidam facilmente formando subprodutos.

O método *in vitro* adaptado para avaliação da fotoproteção possibilitou discriminar amostras diferentes tais como formulações fotoprotetoras comerciais, extratos vegetais e formulações adicionadas de extrato. Este método não é considerado robusto e demanda de experiência em sua execução.

O extrato avaliado pelo método *in vitro* foi capaz de reduzir a morte celular induzida pela radiação UVB, o que sugere presença de compostos em sua constituição responsáveis pela absorção da radiação e consequentemente, um efeito fotoprotetor.

Esta atividade fotoprotetora também foi visualizada pelos ensaios *in vivo* com a inibição da depleção do antioxidante endógeno GSH, com inibição significativa na migração leucocitária pela queda nos níveis de mieloperoxidase e com inibição na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α .

6. *Referências*

- ACUÑA, U. M.; DASTMALCHI, K.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, n. 2, p. 215-220, 2012.
- AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, p. 144-151, 2011.
- AGUIAR, J. P. L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 26, n. 1/2, p. 121-126, 1996.
- ALMEIDA, L. S.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; Dos SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 886-891, 2008.
- ALTENBERGER, E. A.; POPE, H. A.; WEWERS, M. D. Detection of soluble type II receptor in the presence of its natural ligand IL-1 β Quantification by sandwich ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 115-122, 1995.
- ANDRADE, C. A. D.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 231-235, 2007.
- ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n. 11, p. 1-7, 2008.
- BALBOA, E. M.; CONDE, E.; MOURE, A.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1764-1785, 2013.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. Journal Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- 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.
- BOZA, Y.; YEFI, R.; RUDOLPH, M. I.; SMITH, P. C.; OBERYSYN, T. M.; TOBER, K. L.; ROJAS, I. G. Single Exposure of Human Oral Mucosa Fibroblasts to Ultraviolet B Radiation Reduces Proliferation and Induces COX-2 Expression and Activation. **Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral**, v. 3, p. 123-127, 2010.

- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de Matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52c, p. 302-310, 1978.
- CARINI, M., et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco**, v. 55, p. 526-534, 2000.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 0, p. 15-25, 2013.
- CARVALHO-SILVA, L. B.; OLIVEIRA, M. V.; GONTIJO, V. S.; OLIVEIRA, W. F.; DEROGIS, P. B. M. C.; STRINGHETA, P. C.; NAGEM, T. J.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; Dos SANTOS, M. H. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 180-186, 2012.
- CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A. Jr.; DORTA, D. J.; Dos SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21-27, 2006.
- CAYROL, C.; SARRAUTE, J.; TARROUX, R.; REDOULES, D.; CHARVERON, M.; GALL, Y. A mineral sunscreen affords genomic protection against ultraviolet (UV) B and UVA radiation: in vitro and in situ assays. **British Journal of Dermatology**, v. 141, n. 2, p. 250-258, 1999.
- 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, n. 178-182, 2002.
- CHANG, N.-B.; FENQ, R.; GAO, Z.; GAO, W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 5, p. 359-368, 2010.
- CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

- CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology in Vitro**, v. 12, p. 251-258, 1998.
- CHOI, E. J.; CHEE, K.-M.; LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 482, n. 1-3, p. 281-285, 2003.
- CHRÉTIEN, M. N.; HEAFEY, E.; SCAIANO, J. C. Reducing Adverse Effects from UV Sunscreens by Zeolite Encapsulation: Comparison of Oxybenzone in Solution and in Zeolites. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 153-161, 2010.
- COELHO, L. P.; SERRA, M. F.; PIRES, A. L.; CORDEIRO, R. S.; RODRIGUES e SILVA, P. M.; Dos SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 206-214, 2008.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH• method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, p. 1037-1043, 2012.
- DE GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2003-2009, 1999.
- DE GRUIJL, F. R.; VAN DER MEER, J. B.; VAN DER LEUN, J. C. Dose-time dependency of tumor formation by chronic UV exposure. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, p. 53-62, 1983.
- DE MARINO, S.; FESTA, C.; ZOLLO, F.; INCOLLINGO, F.; RAIMO, G.; EVANGELISTA, G.; IORIZZI, M. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 21-28, 2012.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.
- DEROGIS, P. B. M. C.; MARTINS, F. T.; de SOUZA, T. C.; MOREIRA, M. E. C.; FILHO, J. D. S.; DORIGUETTO, A. C.; de SOUZA, K. R. D.; VELOSO, M. P.; Dos SANTOS, M. H. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 278-282, 2008.
- DIFFEY, B. Sunscreen isn't enough. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, n. 2-3, p. 105-108, 2001.
- EDZIRI, H.; MASTOURI, M.; AOUNI, M.; VERSCHAEVE, L. Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 80, n. 0, p. 104-109, 2012.

- EL-SHITANY, N. A.; EL-HAGGAR, S.; EL-DESOKY, K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2422-2428, 2008.
- ESCOBEDO, J. F.; GOMES, E. N.; OLIVEIRA, A. P.; SOARES, J. Ratios of UV, PAR and NIR components to global solar radiation measured at Botucatu site in Brazil. **Renewable Energy**, v. 36, n. 1, p. 169-178, 2011.
- FARMACOPEIA AMERICANA 34, 2011.
- FERNANDES, D. S. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico-químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- FERRARI, M.; OLIVEIRA, M. S. C.; NAKANO, A. K.; ROCHA-FILHO, P. A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 626-630, 2007.
- 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. 61-81, 1997.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.
- FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de calêndula**. 2010. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- FORTES, A. L. S. A. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- FU, M.; FENG, H. J.; CHEN, Y.; WANG, D. B.; YANG, G. Z. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts *in vitro*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129-134, 2012.
- FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, l-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 7, p. 848-873, 1998.
- FUCHS, J.; HUFLEJT, M. E.; ROTHFUSS, L. M.; WILSON, D. S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 93, p. 769-773, 1989.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

- GAROLI, D.; PELIZZO, M. G.; BERNARDINI, B.; NICOLOSI, P.; ALAIBAC, M. Sunscreen tests: Correspondence between *in vitro* data and values reported by the manufacturers. **Journal of Dermatological Science**, v. 52, n. 3, p. 193-204, 2008.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 123-128, 2006.
- GEORGETTI, S. R. C., R.; DI MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A. E. S. S.; FONSECA, M. J. V. . Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescent method. **AAPS PharmSci**, v. 5, p. 210-214, 2003.
- GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 101, n. 8, p. 659-672, 2010.
- GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, p. 685-692, 2000.
- GONÇALVES, M. Experimentação animal: o debate na universidade e nos laboratórios de pesquisa. **ComCiência**, p. 0-0, 2011.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição Centesimal e de minerais em Cascas de frutas. **Ciências Tecnológica Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.
- GONZALEZ, S.; FERNANDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614-626, 2008.
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206-213, 2007.
- HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2, p. 107-120, 2005.
- HALLIDAY, G. M.; DAMIAN, D. L.; RANA, S.; BYRNE, S. N. The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: Implications for autoimmunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, n. 3, p. 176-182, 2012.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology** v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. In. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^a ed. New York: Pergamon Press, 1990, p. 1-104.

- HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1205-1212, 2006.
- HASNAH, O.; AFIDAH, A. R.; RIZAL, R.; NORNAEMAH, M. B.; NURULAFIQAH, M. T.; NOR HAFIZAH, N. Total phenolic, flavonoids, tannin content and antioxidant activity of dried plants *Garcinia mangostana* Linn. and *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. **Food Science: Research and Technology**, v. 4, p. 28-37, 2011.
- HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 401-405, 1986.
- HECK, D. E.; GERECKE, D. R.; VETRANO, A. M.; LASKIN, J. D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 288-297, 2004.
- HISSIN, P. J.; HILF, R. 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.; HONQ, 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 and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1244-1248, 2005.
- HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 27-38, 2011.
- HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta** v. 86, n. 0, p. 362-371, 2011.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa. **Incidência de câncer no Brasil**. 2012. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 10 jan 2013.
- IVERSON SJ; LANG SLC; MH., C. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, n. 11, p. 1283-1287, 2001.
- JANEWAY, C.; WALPORT, M. J.; TRAVERS, P. Immunobiology : The Immune System in Health and Disease. **Garland Publishers**, 1999.
- JANTSCHKO, W.; FURTMÜLLER, P. G.; ZEDERBAUER, M.; NEUGSCHWANDTNER, K.; LEHNER, I.; JAKOPITSCH, C.; ARNHOLD, J.; OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 8, p. 1149-1157, 2005.
- KALIA, K.; SHARMA, K.; SINGH, H. P.; SINGH, B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atosanguinea* Lodd.

- and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10129-10134, 2008.
- KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 91-110, 2012.
- KOH, E.; MITCHELL, A. Trends in the analysis of phytochemicals flavonoids and carotenoids. **Phytochemicals**, p. 39-76, 2008.
- KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, n. 2-3, p. 149-157, 2000.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.
- LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. **The Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 528-537,
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LOPES, V. R.; SCHMIDTKE, M.; HELENA FERNANDES, M.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex virus type 1 Kupka by estuarine cyanobacteria extracts. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 4, p. 944-950, 2011.
- MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-1418, 2007.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, 1998.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicos fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo**. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; de FREITAS, O.; FONSECA, M. J. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 40-48, 2007.

- MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 461-468, 2006.
- MARQUELE, F. D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of brazilian extracts of própolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 455-462, 2005.
- MARTINS, F. T.; ASSIS, D. M.; Dos SANTOS, M. H.; CAMPS, I.; VELOSO, M. P.; JULIANO, M. A.; ALVES, L. C.; DORIGUETTO, A. C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1230-1239, 2009.
- MARTINS, F. T.; CAMPS, I.; DORIGUETTO, A. C.; Dos SANTOS, M. H.; ELLENA, J.; BARBOSA, L. C. A. Crystal structure of garciniaphenone and evidences on the relationship between keto-enol tautomerism and configuration. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 7, p. 1313-1325, 2008.
- MARTINS, F. T.; CRUZ Jr., J. W.; DEROGIS, P. B. M. C.; Dos SANTOS, M. H.; VELOSO, M. P.; ELLENA, J.; DORIGUETTO, A. C. Natural polyprenylated benzophenones: keto-enol tautomerism and stereochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1515-1523, 2007.
- MARTINS, F. T.; Dos SANTOS, M. H.; COELHO, C. P.; BARBOSA, L. C.; DIAS, G. C.; FRACCA, M. P.; NEVES, P. P.; STRINGHETA, P. C.; DORIGUETTO, A. C. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 3, p. 451-457, 2011.
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.
- MATSUI, M. S.; HSIA, A.; MILLER, J. D.; HANNEMAN, K.; SCULL, H.; COOPER, K. D.; BARON, E. Non-sunscreen photoprotections: antioxidants add value to a sunscreen. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, p. 56-59, 2009.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 298-308, 2004.
- MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2, p. 91-106, 2005.
- MERZLYAK, M. N.; SOLOVCHENKO, A. E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 881-888, 2002.

- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.
- MONACHE, G. D.; BOTTA, B.; MELLO, J. F.; COELHO, J. S. B.; MENICHINI, F. Chemical Investigation of the Genus *Rheedia*, IV. Three New Xanthenes from *Rheedia brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 620-625, 1984.
- MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D.; WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G.; De LIMAS, R. A. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1757-1759, 1984.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares fo fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 1-9, 2009.
- MURATA, R. M.; BRANCO DE ALMEIDA, L.S.; FRANCO, E. M.; YATSUDA, R.; Dos SANTOS, M. H.; De ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 865-872, 2010.
- MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; Dos SANTOS, M. H.; KOHN, L. K.; MARTINS, F. T.; NAGEM, T. J.; ALENCAR, S. M.; De CARVALHO, J. E.; ROSALEN, P. L. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phyther Research**, v. 24, n. 3, p. 379-383, 2010.
- MURRAY, J. C.; BURCH, J. A.; STREILEIN, R. D.; IANNACCHIONE, M. A.; HALL, R. P.; PINNELL, S. R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 3, p. 418-425, 2008.
- NAKAGAWA, Y.; SUZUKI, T.; TAYAMA, S. Metabolism and toxicity of benzophenone in isolated rat hepatocytes and estrogenic activity of its metabolites in MCF-7 cells. **Toxicology**, v. 156, n. 1, p. 27-36, 2000.
- NALDONI, F. J.; CLAUDINO, A. L.; CRUZ, J. W. Jr.; CHAVASCO, J. K.; FARIA e SILVA, P. M.; VELOSO, M. P.; Dos SANTOS, M. H. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.
- NASH, J. F.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J. Ultraviolet A Radiation: Testing and Labeling for Sunscreen Products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 63-74, 2006.
- NEVES, J. S.; COELHO, L. P.; CORDEIRO, R. S.; VELOSO, M. P.; RODRIGUES e SILVA, P. M.; Dos SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med**, v. 73, p. 644-649, 2007.

- NUNES, C. A.; CAMPOS, D. H.; MAGALHÃES, E. C. S. Determinação simultânea de acetona e benzofenona-3 em removedor de esmalte de unhas por espectrofotometria UV-Vis. **Revista Analytica**, n. 33, p. 56-61, 2008.
- 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, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.
- PAZ, M. L.; FERRARI, A.; WEILL, F. S.; LEONI, J.; MAGLIO, D. H. Time-course evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 70-77, 2008.
- PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N.; OROZCO-IBARRA, M.; PÉREZ-ROJAS, J. M. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3227-3239, 2008.
- PEDRO P. V. VARELLA; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopltologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.
- PÉLISSIER, M. A.; SAVOURÉ, N.; BRIAND, G.; ALBRECHT, R. Endogenous glutathione as potential protectant against free radicals in the skin of vitamin A deficient mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 693-696, 1997.
- PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L.; CODONHO, B. S.; BARBIÉRI, C. L.; BEIJO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; D'MARTIN, E. C.; Dos SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.
- 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 and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 425-432, 2001.
- PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PODDA, M.; TRABER, M. G.; WEBER, C.; YAN, L. J.; PACKER, L. UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 55-65, 1998.
- RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L.; OTONKOSKI, T.; LAPATTO, R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1297-1304, 2002.
- RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 4, p. 705-720, 2002.

ROCHA, S. A. D.; LIMA, G. P. P.; LOPES, A. M.; BORGUINI, M. G.; CICCONE, V. R.; BELUTA, I. Fibras e lipídios em alimentos vegetais oriundos do cultivo orgânico e convencional. **Revista Simbio-Logias**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2008.

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

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

ROSA, F.S. **Influência de protetor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2002. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

COSTA, R. D.; MENDONÇA, V. A.; LYON, S.; PENIDO, R. A.; COSTA, A. M. D.; COSTA, M. D.; NISHI, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L.; ANTUNES, C. M. F. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 99-103, 2008.

SANTA-CECILIA, F. V.; FREITAS, L. A.; VILELA, F. C.; VELOSO Cde, C.; da ROCHA, C. Q.; MOREIRA, M. E.; DIAS, D. F.; GIUSTI-PAIVA, A.; Dos SANTOS, M. H. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280-285, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; SANTOS, G. B.; FUZISSAKI, C. N.; DEROGIS, P. B. M. C.; FREITAS, L. A. S.; GONTIJO, V. S.; STRINGHETA, P. C.; NAGEM, T. J.; BRIGADÃO, M. R. P. L.; Dos SANTOS, M. H. 7-Epiclusianona, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. . **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 2, p. 200-205, 2012.

SANTA-CECILIA, F. V.; VILELA, F. C.; da ROCHA, C. Q.; DIAS, D. F.; CAVALCANTE, G. P.; FREITAS, L. A.; Dos SANTOS, M. H.; GIUSTI-PAIVA, A.. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 133, n. 2, p. 467-473, 2011.

SANTOS, M. H. D.; NAGEM, T. J.; de OLIVEIRA, T. T.; BRAZ-FILHO, R. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, p. 654-660, 1999.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane–octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 2, p. 273-278, 2010.

- SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794-802, 2007.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 470-475, 1994.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 260-265, 1993.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.
- SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.
- SIQUEIRA, S. **Atividades biológicas de extratos de *Solanum paludosum* Moric. Obtidos por maceração e extração supercrítica**. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- SIQUEIRA, S.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AGRA, M. F.; DARIVA, C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; FONSECA, M. J. V. Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 3, p. 391-397, 2011.
- SOUSA, C. M. D. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA-Jr., G. M.; AYRES, M. C. C.; da COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.
- SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 106, p. 331-339, 2008.
- STEENVOORDEN, D. P. T.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet Light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 150, n. 1, p. 25-38, 2006.
- 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.
- TIANO, L.; ARMENI, T.; VENDITTI, E.; BARUCCA, G.; MINCARELLI, L.; DAMIANI, E. Modified TiO₂ particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 3, p. 408-415, 2010.
- TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n. 7, p. 573-577, 2001.
- TRUSH, M. A.; EGNER, P. A.; KENSLER, T. W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 1994.
- VARANI, J.; SPEARMAN, D.; PERONE, P.; FLIGIEL, S. E.; DATTA, S. C.; WANG, Z. Q.; SHAO, Y.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro*. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 3, p. 931-942, 2001.
- VELASCO, M. V. R.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 50-57, 2008.
- VENDITTI, E.; BRUGÈ, F.; ASTOLFI, P.; KOICHEVAR, I.; DAMIANI, E. Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, n. 1, p. 55-61, 2011.
- VICENTINI, F. T. M. C.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: A liquid crystalline formulation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 805-810, 2007b.
- VICENTINI, F. T. M. C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M. J.; VERRI, W. A. Jr.; FISHER, G. J.; XU, Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 61, n. 3, p. 162-168, 2011.
- VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R.; DEL CIAMPO, J. O.; WOLGA, N. O.; PITOL, D. L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V.; FONSECA, M. J. Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 948-957, 2008.
- VIELHABER, G.; GREITHER-BECK, S.; KOCH, O.; JOHNCOCK, W.; KRUTMANN, J. Sunscreens with an absorption maximum of [greater-than-or-equal]360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1,

and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 275-282, 2006.

VILELA, F. M. P. **Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

VILELA, F. M. P.; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T.; FONSECA, M. J. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 387-392, 2012.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 452-457, 2009.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. D. A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, p. 123-127, 2007.

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, n. 2, p. S1-S8, 2005.

YOUNG, A. R. Acute effects of UVR on human eyes and skin. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 80-85, 2006.