UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato e das formulações tópicas contendo o extrato de *Cecropia obtusa*

Georgia de Assis Dias Alves

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato e das formulações tópicas contendo o extrato de *Cecropia obtusa*

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Georgia de Assis Dias Alves

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 28/08/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2017

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.

de Assis Dias Alves, Geórgia
Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato e das formulações tópicas contendo o extrato de *Cecropia obtusa*. Ribeirão Preto, 2017.
116 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Fonseca, Maria José Vieira

1. Antioxidante. 2. Estresse oxidativo. 3. Penetração.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Georgia de Assis Dias Alves
Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato e das formulações tópicas contendo o extrato de *Cecropia obtusa*

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

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pelo esforço em oferecer formação de qualidade.

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

Aos queridos colegas de laboratório e da pós-graduação pelas experiências trocadas.

À todos os professores. Com alguns tive a chance de ter algumas reuniões para discutir ideias ou resultados, outros conheci através de disciplinas, e vários conheci apenas pelo nome. Mas quaisquer que sejam, ofereceram o máximo que puderam para a capacitação dos alunos. Posso apenas agradecer por ter tido a oportunidade de conviver com esses mestres tão diferentes entre si e tão capacitados em suas áreas. Saio da pós graduação carregando um pouco de cada um em mim.

Aos colegas do laboratório “Skin Aging” pelas experiências trocadas e ao Dr. Hitoshi Masaki por me receber na Tokyo University of Technology.

À minha orientadora, Maria José Vieira Fonseca, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, por me mostrar o caminho mas me deixar caminhar com as minhas pernas, e por todo apoio. Espero um dia significar na vida de um aluno o que você significou na minha.

À minha família, que sorriu e sofreu comigo nesses quatro anos e meio. Vocês souberam entender os altos de baixos tão característicos da pós graduação, entenderam meus períodos de ausência e meus pedidos de colo.

Especialmente ao meu marido, Tales, por ter embarcado em todas as minhas loucuras e por me apoiar, 愛してる.

Ao meu grande amor, meu primeiro amor, minha melhor amiga e companheira, Tigresa. Nossos corações estão ligados para sempre.

A todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

E, finalmente, a Deus, por ter segurado na minha mão, estivesse eu olhando ou não.

”A mente que se abre a uma ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

ALVES, G. A. D. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato e das formulações tópicas contendo o extrato de *Cecropia obtusa*.** 2017. 116f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

*Cecropia obtu*sa é popularmente utilizada na Amazônia para vários fins medicinais, e possui atividade antioxidante comprovada por diferentes metodologias. Neste trabalho objetivou-se caracterizar o extrato; avaliar o potencial fotoquimioprotetor; separar os constituintes por CLAE; identificar os constituintes majoritários e desenvolver formulações tópicas. O conteúdo de polifenóis e flavonoides totais foi de 371,5 mg EGA/g e 66,68 mg EQ/g, respectivamente, e os IC_{50} para os radicais $DPPH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ e $^1O_2$ foram, respectivamente1,83, 0,34 e 0,55 µg/mL, respectivamente. Para o radical $OH^{\bullet}$, 125 µg/mL de extrato foi capaz de inibir a formação do radical em 35,48%. O extrato demonstrou fotoestabilidade e capacidade de absorver a radiação UVB e UVA-II. O FPS calculado pela metodologia de Mansur e estimado pelo experimento de fotoproteção em cultura de células foi de 16. O método analítico cromatográfico apresentou boa resolução e separação, sendo linear para o intervalo de 5 a 125 µg/mL e apresentando coeficientes de variação que variaram de 3,12% a 4,51%. Através da espectrometria de massas foi possível sugerir a presença do ácido clorogênico e três flavonas-C-heterosídicas (duas luteolinas-C-heterosídicas e uma apigenina-C-heterosídicas). Em cultura de células HaCaT submetidas à radiação UVA, o extrato diminuiu a produção de espécies reativas do oxigênio, protegeu contra o processo de peroxidação lipídica e contra a depleção da glutationa reduzida induzidos pela radiação, além de proteger contra a diminuição da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase. Em cultura de fibroblastos humanos submetidos à radiação UVA/UVB, o tratamento com o extrato forneceu maior proteção do que o ácido clorogênico contra o aumento da proteína carbonilada. O extrato foi capaz de retornar o conteúdo de ácido hialurônico ao nível basal enquanto o tratamento com ácido clorogênico foi capaz de aumentar acima do nível basal. Em relação ao conteúdo de colágeno, tanto o extrato quanto o ácido clorogênico foram capazes de retornar os valores ao nível basal da célula. O extrato também foi capaz de diminuir a atividade da enzima metaloproteinase enquanto o ácido clorogênico não exibiu efeito. Em relação às formulações desenvolvidas, as mudanças mais significativas nos parâmetros de estabilidade avaliados foram para as formulações incubadas a 40°C: o decréscimo da atividade antioxidante em aproximadamente 40% entre 0 e 2 meses, a diminuição do pH abaixo do limite de estabilidade do agente de viscosidade e, para a reologia, o aumento da área de histerese entre 4 e 6 meses. A formulação com oleato de isodecila dobrou a quantidade de extrato penetrada na pele em 12 e 6 horas, em comparação com as outras duas formulações, além de ter mantido a atividade de absorção da radiação. O extrato apresentou atividade fotoquimioprotetora e a formulação promoveu a penetração do extrato e manteve a atividade de absorção da radiação, sugerindo a incorporação do extrato de *C. obtusa* em formulações contendo filtros, visando aumentar o espectro de absorção e promover um efeito atenuador do estresse oxidativo na pele.

Palavras-chave: Antioxidantes, Fotoquimioproteção, Queratinócitos, Fibroblastos, Penetração cutânea, Formulação tópica, Ácido clorogênico, *Cecropia obtusa*.

ABSTRACT

ALVES, G.A.D. **Evaluation of the photoprotector and photochemoprotector effect of the topical formulations containing *Cecropia obtusa* extract.**2017. 116f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Cecropia obtusa is commonly used in Amazon with different medicinal purposes and the antioxidant activity of this specie has been proved by different methodologies. The aim of this work was: to characterize the purified extract of *C. obtusa*; to evaluate the photochemoprotective effect in cell culture; develop an HPLC methodology to separate the extract's compounds; suggest the identification of the major compounds, and develop a stable formulation that would be able to penetrate on the skin to exert the antioxidant effect, besides absorbing the radiation. The contents of total polyphenols and flavonoids were 371.5 mg GAE/g and 66.68 mg QE/g, respectively, and the IC_{50} for the radicals $DPPH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ and $^1O_2$ were respectively 1.83, 0.34 and 0.55 µg/mL. For the $OH^{\bullet}$ radical, 125 µg/mL of extract was able to inhibit the radical formation by 35.48%. The extract was photo stable and exhibited the ability to absorb UVB and UVA-II radiation. The SPF calculated by the Mansur methodology and confirmed by the photoprotection experiment in cell culture was 16. The HPLC method exhibited good resolution and separation, being linear from 5 to 125 µg/mL and presenting coefficients of variation ranging from 3.12% to 4.51%. By employing mass spectrometry, it was possible to suggest the presence of chlorogenic acid and three C-heterosidic flavones (two C-heterosidic luteolins and one C-heterosidic apigenin). In HaCaT culture exposed to UVA radiation, the extract decreased the production of reactive oxygen species, protected against the lipid peroxidation process and against the depletion of the reduced glutathione. In addition, extract also protected against the decrease in the activity of the enzymes catalase and superoxide dismutase. In human fibroblasts exposed to UVA/UVB radiation, the treatment with the extract provided higher protection than chlorogenic acid against the increase in the production of carbonyl protein. The extract was able to return the content of hyaluronic acid to the basal level while the treatment with chlorogenic acid was able to increase above the basal level. Regarding the collagen content, both the extract and the chlorogenic acid were able to return the values to the basal level of the cell. The extract was also able to decrease metalloproteinase activity, while chlorogenic acid had no effect. Regarding the developed formulations, the most significant changes in the stability parameters were for the formulations incubated at 40°C: the decrease in the antioxidant activity, which was, approximately, 40% between 0 and 2 months, and the increase of hysteresis area and decrease of the pH below the limit for the viscosity agent, between 4 and 6 months. The formulation with isodecyl oleate doubled the amount of extract penetrated into the skin in 12 and 6 hours compared with the other two formulations. The extract exhibited photochemoprotective effect, and the formulation penetrated on the skin, besides absorbing the UV radiation, which suggests the incorporation of C. obtusa extract in formulations containing filters, aiming to increase the absorption spectrum and to attenuate the oxidative stress in the skin.

Keywords: Antioxidants, Keratinocytes, Fibroblasts, Skin penetration, Topical formulation, Chlorogenic acid, *Cecropia obtusa.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de formação de moléculas reativas simplificada..... 04
Figura 2. Árvore de *C. obtusa*..... 06
Figura 3. Diagrama metodológico 13
Figura 4. Representação esquemática do experimento de fotoproteção em cultura de células, que avalia a formação de EROS..... 20
Figura 5. Representação esquemática da reação xantina/XOD/luminol..... 30
Figura 6. Espectro ESR da produção de $OH^{\bullet}$ após irradiação UVA (a) e na presença de 125 μg/mL do extrato de C.obtusa (b)..... 32
Figura 7. Perfil cromatográfico do extrato de *C. obtusa* por CLAE em 320 nm 33
Figura 8. Cromatogramas da análise do extrato de *C. obtusa*, com detecção em 320 nm (a), ESIMS (modo negativo) (b), ESIMS (modo positivo) (c) 34
Figura 9. Estrutura do ácido 3-O-cafeorilquínico (ácido clorogênico) 35
Figura 10. Estrutura dos Flavonóides Luteolina, Orientina e Isoorientina 37
Figura 11. Espectro de absorção na região do UV da solução do extrato de *C. obtusa* na concentração de 0,2 mg/mL antes (NC) e após sua exposição às radiações UVA e UVB..... 40
Figura 12. Espectro de absorção na faixa de 280 a 400 nm da solução metanolica do extrato de *C. obtusa* de 0,2 mg/mL..... 41
Figura 13. Fotoproteção oferecida pelo extrato de *C. obtusa* e por protetores solares representada pela intensidade de fluorescência gerada pelo DCF em células HaCaT frente às radiações UVA - 4J/cm2 (a) e UVB - 0,02J/cm2 (b)..... 43
Figura 14. Viabilidade das células HaCaT após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *C. obtusa*..... 44
Figura 15. Intensidade de fluorescência gerada pelo DCF em células HaCaT expostas à radiação UVA ($4J/cm^2$) e tratadas com soluções do extrato *C. obtusa*..... 45
Figura 16. Esquema da reação de formação do complexo malondialdeído (MDA)-ácido tiobarbitúrico (TBA)..... 46
Figura 17. Diminuição da quantidade de MDA formada pelas células HaCaT exposta à radiação UVA ($4J/cm^2$) e tratadas com extrato de *C.obtusa*..... 47
Figura 18. Quantidade de GSH gerada em células HaCaT expostas à radiação UVA ($4J/cm^2$) e tratadas com extrato de *C.obtusa*..... 49
Figura 19.Atividade das enzimas Catalase (a) e Superóxido Dismutase (b) de células 52

HaCaT tratadas com extrato de *C.obtusa* e expostas à radiação UVA (4J/cm^2)
Figura 20. Intensidade de fluorescência gerada pela fluoresceína-5-tiossemicarbazida em fibroblastos humanos submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB) e tratados com soluções do extrato de *C. obtusa* ou com ácido clorogênico..... 57
Figura 21. Quantificação do ácido hialurônico em cultura de fibroblastos humanos tratados com extrato de *C.obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB)..... 59
Figura 22. Quantificação de colágeno em cultura de fibroblastos humanos tratados com extrato de *C.obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB)..... 62
Figura 23. Atividade da enzima metaloproteinase-1 de células de fibroblastos humanos tratados com meio de culta de células HaCaT, que foram tratadas com o extrato de *C. obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidas à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB)..... 65
Figura 24. pH das diferentes formulações acondicionadas a 40°C (a) e 4°C (b) em 0, 2, 4 e 6 meses..... 69
Figura 25. Estabilidade funcional pela medida da atividade antioxidante das formulações acondicionadas a 40°C (a) e a 4°C (b) em 0, 2, 4 e 6 meses..... 70
Figura 26. Reogramas das formulações armazenadas a 40° C em 0 (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) meses..... 72
Figura 27. Recuperação dos diferentes solventes testados (a) e das diferentes quantidades de extrato quando extraído em água (b)..... 75
Figura 28. Penetração das diferentes formulações em função da concentração de extrato em 12 horas (a) e comparação da penetração de F3 em 12 e 6 horas (b)..... 76
Figura 29. Fotoproteção oferecida pela formulação (F) e veículo (V) contendo oleato de isodecila para as radiações UVA (a) e UVB (b)..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente utilizado na eluição dos compostos do extrato de *C. obtusa* por Cromatografia Líquida..... 16

Tabela 2 – Composição (% w/w) das formulações adicionadas ou não do extrato de *C. obtusa*..... 26

Tabela 3 – Polifenóis (PT) e flavonóides totais (FT) e atividade antioxidante (apresentada como IC_{50}) em resposta ao $DPPH^{\bullet}$, ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e oxigênio singleto ($^1O_2$)..... 30

Tabela 4 – Substâncias propostas no extrato de *C. obtusa* por LC-DAD-MS/MS..... 35

Tabela 5 – Equação da regressão linear, valores do coeficiente de determinação (R2) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (%) da metodologia analítica desenvolvida por Cromatografia Líquida..... 39

Tabela 6 – Precisão do método analítico cromatográfico por CLAE expresso em função da área do pico ± erro padrão e Coeficiente de Variação (CV)..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1O_2$	Oxigênio singleto
A	Ångstrom
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína ativadora 1
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Ionização a pressão atmosférica
BSA	Soroalbumina bovina
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CID	Dissociação induzida por colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO_2	Dióxido de Carbono
CP	Protetor solar comercial
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
$DCFH_2$-DA	2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DMPO	5,5-dimetil-1-pyrrolina-N-óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
$DPPH^{\bullet}$	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGA	Equivalente de Ácido gálico
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EQ	Equivalente de quercetina
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERO's	Espécies Reativas do Oxigênio
ESI	Ionização por electrospray
ESR	Ressonância de Spin Eletrônico
FPS	Fator de Proteção Solar
GPx	Glutationa Peroxidase

GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
AH	Ácido hialurônico
IC_{50}	Metade da concentração inibitória máxima
ICH	International Conference on Harmonisation
IL	Interleucina
J/cm2	Joules por centímetro quadrado
JNK	C-jun N-terminal kinases
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
MMPs	Metaloproteinases
MS	Espectrometria de massas
m/z	Medida da razão massa sobre a carga
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NaH_2PO_4	Fostato de sódio monobásico
NC	Controle negativo (células não irradiadas e sem extrato)
NFκB	Factor Nuclear *kappa B*
$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
$OH^{\bullet}$	Radical Hidroxila
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Solução de 0,05% de Tween 20 em PBS
PC	Controle positivo (células irradiadas sem extrato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
R^2	Coeficiente de determinação
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TIA	Células pré-tratadas por 24 horas e irradiadas na ausência do extrato

TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TIP	Células pré-tratadas por 24 horas e irradiadas na presença do extrato
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TMPD	2,2,6,6-tetrametil cloridrato de piperidona
TNF-α	Factores de Necrose Tumoral Alfa
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
UV A/B/C	Ultravioleta A/B/C
v/v	Volume/volume
w/v	Peso/volume
w/w	Peso/peso
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de abreviaturas e siglas vi

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 O fotoenvelhecimento da pele 1
1.2 Mecanismos do fotoenvelhecimento e estresse oxidativo 2
1.3 Agentes naturais bioativos e fotoquimioprotetores 5
1.4 Caracterização química de agentes naturais bioativos 7
1.5 Desenvolvimento de formulações fotoquimioprotetoras 8

2. OBJETIVOS 12
1.1 Objetivo Geral 12
1.2 Objetivos Específicos 12

3. MATERIAIS E MÉTODOS 13
3.1 Obtenção do extrato de *C. obtusa* 14
3.2 Caracterização do extrato 14
3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais 14
3.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais 14
3.2.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH$^{\bullet}$ 14
3.2.4 Determinação do sequestro do radical O2$^{\bullet -}$ por medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/ XOD/luminol 15
3.2.5 Atividade sequestradora do oxigênio singleto- $^1O_2$ 15
3.2.6 Atividade sequestradora do radical hidroxila- OH$^{\bullet}$ 15
3.2.7 Identificação e Quantificação dos componentes do extrato de *C. obtusa* por CLAE/UV e CLAE-DAD-MS/MS 16
3.2.7.1 Identificação dos constituintes 16
3.2.7.2 Validação do método analítico e quantificação dos componentes do extrato por CLAE/UV 17
3.2.8 Avaliação da fotoestabilidade e determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS) 18
3.3 Avaliação da fotoquimioproteção em cultura de células 18
3.3.1 Condições de cultivo celular 19
3.3.2 Avaliação da fotoproteção 19
3.3.3 Solubilização do extrato de *C. obtusa* e do Ácido clorogênico 20
3.3.4 Citotoxicidade- ensaio de captura do corante vermelho neutro 20
3.3.5 Protocolo de cultivo e tratamento 21
3.3.6 Preparo do lisado celular 22
3.3.7 Determinação do conteúdo de proteína 22
3.3.8 Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular 23
3.3.9 Quantificação do nível de peróxidos lipídicos 23
3.3.10 Avaliação quantitativa da glutationa reduzida 23
3.3.11 Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT 24
3.3.12 Avaliação da formação de proteina carbonilada 24

3.3.13 Avaliação do conteúdo de ácido hialurônico 24
3.2.14 Avaliação do conteúdo de Colágeno 25
3.3.15 Avaliação da atividade da enzima metaloproteinase 1 25
3.4 Desenvolvimento da formulação contendo o extrato de *C. obtusa*, adicionada ou não, de promotores de absorção 26
3.5 Avaliação da estabilidade física, físico-química e funcional das formulações 26
3.5.1 Estabilidade físicoquimica 27
3.5.2 Estabilidade funcional 27
3.5.3 Estabilidade física por avaliação do comportamento reológico das formulações... 27
3.6 Estudo in vitro de Penetração⁄Retenção dos componentes do extrato na pele humana 27
3.6.1 Escolha do solvente extrator..... 27
3.6.2Avaliação da recuperação..... 28
3.6.3 Estudos in vitro de penetração/retenção 28
3.7 Avaliação da fotoproteção da formulação contendo oleato de isodecila 29
3.8 Análise estatística 29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4.1 Caracterização do extrato de *C. obtusa* 30
4.1.1 Determinação de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante 30
4.1.2 Identificação e quantificação dos componentes do extrato de *C. obtusa* por CLAE/UV e UFLC-DAD-MS/MS..... 33
4.1.2.1 Identificação dos componentes por UFLC-DAD-MS/MS 34
4.1.2.2 Validação do método analítico e quantificação dos componentes do extrato por CLAE/UV..... 38
4.1.3 Avaliação da fotoestabilidade e determinação in vitro do Fator de Proteção Solar (FPS) 40
4.2 Avaliação da fotoquimioproteção em cultura de células..... 34
4.2.1 Avaliação da Fotoproteção 41
4.2.2 Citotoxicidade- ensaio de captura do corante vermelho neutro 41
4.2.3 Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular..... 43
4.2.4 Quantificação do nível de peróxidos lipídicos 44
4.2.5 Avaliação quantitativa da glutationa reduzida 46
4.2.6 Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT 48
4.2.7 Avaliação da formação de proteina carbonilada 51
4.2.8 Avaliação do conteúdo de Ácido Hialurônico 56
4.2.9 Avaliação do conteúdo de Colágeno 58
4.2.10 Avaliação da atividade da enzima MMP-1 61
4.3 Desenvolvimento da formulação contendo o extrato de *C. obtusa*, adicionada ou não, de promotores de absorção 63
4.4 Avaliação da estabilidade física, físico-química e funcional das formulações 67
4.4.1 Estabilidade físico-química 67
4.4.2 Estabilidade funcional 68
4.4.3 Estabilidade física por avaliação do comportamento reológico das formulações... 69
4.5 Estudo in vitro de Penetração⁄Retenção dos componentes do extrato na pele humana 70
4.5.1 Escolha do solvente extrator e avaliação da recuperação..... 74
4.5.2 Estudos *in vitro* de penetração..... 74
4.6 Avaliação da fotoproteção da formulação contendo oleato de isodecila 75
77

5. CONCLUSÕES 79

6. REFERÊNCIAS 80

ANEXOS 92

1. INTRODUÇÃO

1.1 O fotoenvelhecimento da pele

O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo associado com a perturbação da integridade física da pele e pode ser dividido em envelhecimento intrínseco e extrínseco. Envelhecimento intrínseco, também conhecido como envelhecimento inato, é um processo natural que resulta da acumulação irreversível de mudanças degenerativas relacionadas com o envelhecimento biológico que ocorre com o passar dos anos (Polefka *et al.*, 2012).

O envelhecimento extrínseco ocorre devido à pele estar diretamente exposta a vários fatores adversos, sejam estes químicos, físicos ou microbiológicos. Dentre os principais fatores estão a poluição e o fotoenvelhecimento, e sabe-se que grande parte do envelhecimento extrínseco é resultante de exposição à radiação UV (Uitto, 2008).

A radiação UV é dividida em três faixas em relação ao comprimento de onda: UVC (100–290 nm), UVB (290–320 nm), e UVA (320– 400 nm) (Epstein, 1990). A forma de radiação ultravioleta mais energética é a UVC, que não chega à superfície terrestre, pois é absorvida pela camada de ozônio. A radiação UVB representa 5% da radiação ultravioleta que alcança a superfície terrestre e a radiação UVA, 95% (Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006). A radiação UVB é o componente mais prejudicial da radiação solar que atinge a superfície da terra, pois é capaz de induzir uma série de danos à pele humana, sendo menos penetrante e mais genotóxica do que a radiação UVA, e atuando principalmente na camada epidérmica da pele. Embora a radiação UVA seja menos energética, é a que mais atinge a Terra e possui o maior potencial penetrante; alcança a derme estimulando a formação da melanina, a qual protege a pele de queimaduras imediatas (Abu Zaid et al., 2007; Maverakis et al., 2010).

A exposição excessiva à luz solar é um fator de risco para o desenvolvimento de eritema, fotodermatoses, fotoenvelhecimento, imunossupressão e carcinogênese, devido à ação da radiação UVB e UVA (Polefka *et al.*, 2012). O fotoenvelhecimento se sobrepõe ao processo de envelhecimento inato e é um grande perigo para a saúde, já que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de pele (Uitto, 2008).

A epiderme consiste de um epitélio estratificado, queratinizado e escamoso, no qual 80% das células são queratinócitos, principais células responsáveis pela produção de citocinas epidérmicas (Grone, 2002).

A derme é um tecido conjuntivo denso que apoia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. A derme e epiderme são interligadas por papilas

dérmicas e epidérmicas, compostas principalmente por fibras de colágeno e elastina, que conferem elasticidade à pele. As principais células da derme são os fibroblastos, que sintetizam as fibras dérmicas. As fibras dérmicas conferem resistência mecânica à pele, e são constituídas, em sua maioria por colágeno intersticial, principalmente de tipos I e III, porém outros tipos de colágenos são encontrados na derme como os colágenos do tipo IV e VII (Kanitakis, 2002).

As células epidermais, especialmente os queratinócitos, possuem um metabolismo interno capaz de prevenir, até certo ponto, a ocorrência das lesões induzidas pela radiação UV. Sob exposição excessiva à radiação, o nível de dano acumulativo pode ultrapassar a capacidade endógena de reparação da célula e o comprometimento causado pode não ser reversível (Lorencini *et al.*, 2014). A radiação ultravioleta, assim como a produção endógena de radicais livres pelo metabolismo celular, e poluição podem danificar a pele e aumentar a produção de agentes oxidativos, podendo levar ao desenvolvimento do dano oxidativo, câncer de pele, imunossupressão e envelhecimento cutâneo precoce (Steenvoorden e Van Henegouwen, 1997; Chen *et al.*, 2012)

1.2 Mecanismos do fotoenvelhecimento e estresse oxidativo

A derme é o tecido conectivo da pele e é composta principalmente de elastina e colágeno. O primeiro dá integridade estrutural e mecânica à pele, enquanto o segundo confere à pele importante propriedade elástica. A exposição à radiação UV diminui a produção de ácido hialurônico (HA) e induz atividade das enzimas metaloproteinases (MMPs), que degradam o colágeno. Essas alterações estão diretamente ligadas à percepção visual do envelhecimento cutâneo e aparecimento de rugas (Kobayashi *et al.*, 2008).

Colágeno tipo 1 é a proteína estrutural presente em maior quantidade na matriz extracelular dérmica. Moléculas precursoras do colágeno (pró-colágeno) são sintetizadas por fibroblastos presentes na derme. O pró-colágeno é secretado no espaço extracelular e é enzimaticamente convertido em colágeno maduro. Este colágeno espontaneamente forma fibras que são estabilizadas por ligação cruzadas. Fibras de colágeno são responsáveis por fornecer força e resistência à pele (Quan *et al.*, 2009).

Através de alterações na matriz dérmica os níveis de colágeno podem ser diminuídos. Dessa forma, o aparecimento das rugas ocorrerá pela pouca síntese ou pela acelerada quebra do mesmo (Masaki, 2010). Após a exposição à radiação UV, ocorre um aumento da expressão das enzimas MMP-1, MMP-3 e MMP-9, que são proteases que degradam fibras de colágeno e elastina na matriz extracelular (Cerutti, 1985; Chen *et al.*,

2012). A colagenase intersticial MMP-1 é responsável pela degradação do colágeno tipo I, processo que pode comprometer a integridade estrutural da pele (Mohamed *et al.*, 2014). Após repetidas exposições, ocorre uma resposta de cicatrização típica, com deposição de colágeno tipo I ao invés da mistura típica de colágeno tipos I e III, que proporciona elasticidade e flexibilidade à pele (Stern, R. e Maibach, H. I., 2008).

Assim, a exposição crônica à radiação UV além de induzir a quebra de colágeno, também degrada outras moléculas da matriz dérmica extracelular, como por exemplo, o HA, além de alterar a composição dérmica de proteoglicanas (Stern, R. e Maibach, H. I., 2008).

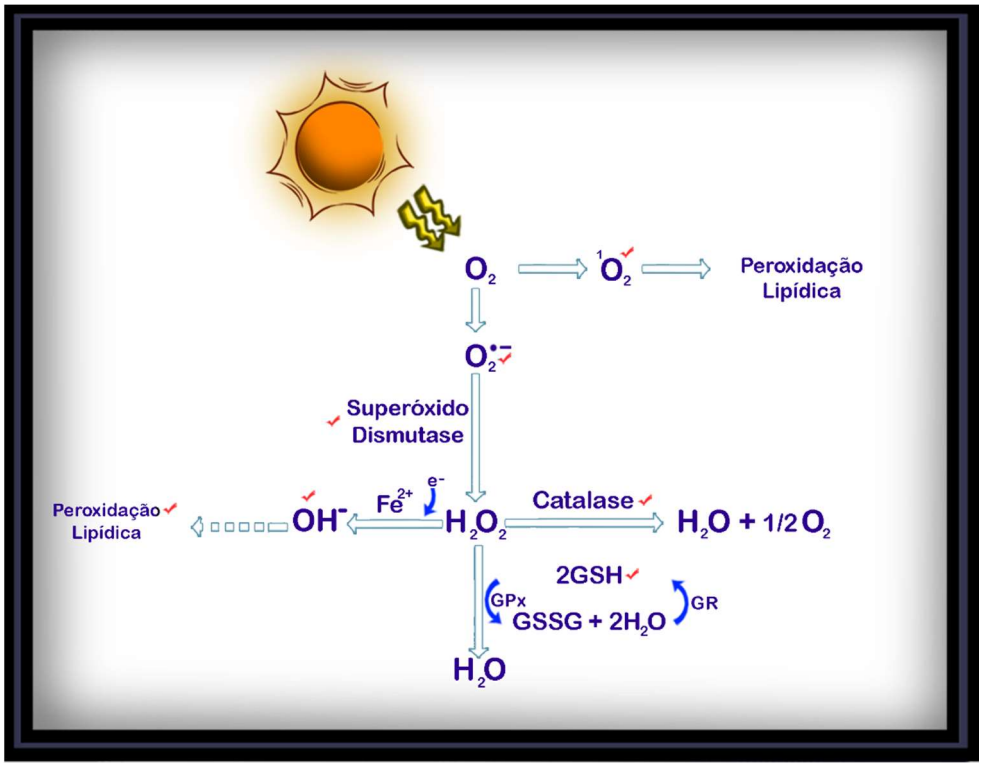
A pele contém mais de 50% do conteúdo total de AH presente no corpo e além de manter a umidade, arquitetura e elasticidade do tecido, o AH também facilita a troca de nutrientes e a excreção de resíduos na pele (Manuskiatti e Maibach, 1996; Schiller *et al.*, 2011). Essa macromolécula, apesar de ser um componente minoritário das glicosaminoglicanas presentes na pele, corresponde a uma faixa entre 0,1% e 0,3% do total do peso seco da pele e desempenha um papel fundamental de hidratação da mesma. Aproximadamente 60% do peso total da derme é água, retida em grande parte como resultado da capacidade de glicosaminoglicanas como o HA, que são capazes de reter até 1000 vezes mais água do que seu próprio peso (Uitto, 2008).

A alteração histoquímica mais dramática observada em pele senescente é o acentuado decréscimo de AH epidérmico. Concomitantemente, ocorre o acentuado aumento da expressão de AH de baixo peso molecular, o que está relacionado com a diminuição significativa das enzimas de síntese e um aumento da expressão das enzimas de degradação (hialuronidases) de AH, além da diminuição da expressão de receptores celulares para o AH, o que ocorre em paralelo com o progressivo cross-linking do colágeno. O aumento da atividade da hialuronidase não é apenas responsável pela degradação da matriz extracelular e pelo aumento da permeabilidade do tecido, mas também, juntamente com a EROs, pode promover a fragmentação do AH em pequenos oligossacarídeos que podem levar à um processo inflamatório e à ativação de MMPs. Estes achados contribuem para a aparente desidratação, atrofia e perda de elasticidade que caracteriza a pele fotoenvelhecida (Papakonstantinou *et al.*, 2012; Vigetti *et al.*, 2014; Piwowarski e Kiss, 2015).

Adicionalmente, as radiações UVA e UVB promovem um quadro de estresse oxidativo na pele através da produção de radicais livres e espécies reativas do oxigênio (ERO´s), que podem danificar diferentes componentes celulares através da propagação de

reações de geração de radicais livres e indução de danos oxidativos em proteínas no estrato córneo, danificando a função de barreira (Lorencini *et al.*, 2014). Sabe-se que reações em cadeia nas mitocôndrias desencadeiam a formação das EROs (Masaki *et al.*, 2009). Dentre as ERO´s formadas pode-se citar o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), oxigênio singleto ($^1O_2$) e peróxidos lipídicos. Essas espécies reativas estão relacionadas ao envelhecimento cutâneo, fototoxicidade, inflamação, e formação de tumores malignos (Sakurai *et al.*, 2005). Terra et al. (2012) demonstraram que os danos oxidativos que ocorrem na pele após exposição à radiação são mediados predominantemente pelas ERO´s (principalmente $^1O_2$ e $^{\bullet}OH$). A via de formação de radicais livres ou moléculas reativas é esquematicamente mostrada de forma simplificada na Fig. 1.

Figura 1. Via de formação de moléculas reativas simplificada



A radiação UV reage com fotossensibilizadores ou cromóforos na pele e estes cromóforos absorvem energia e migram para um estado excitado e instável. A energia liberada ao retornar ao estado estável é transferida para moléculas de oxigênio próximas, gerando o oxigênio singleto (Chen *et al.*, 2012). As moléculas de oxigênio normalmente seriam reduzidas a água e ganhariam 4 elétrons, mas elas podem também escapar com um elétron, como $O_2^{\bullet-}$. Estes, por sua vez, são neutralizados por uma enzima antioxidante, a

superóxido dismutase (SOD), que converte $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2, que é menos reativo. As enzimas catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) reduzem H_2O_2 para H_2O. O H_2O_2 pode reagir com Fe (II) sob influência da radiação UV na reação de Fenton. Esta reação produz o $^{\bullet}OH$, que pode iniciar a peroxidação lipídica (Kammeyer e Luiten, 2015).

SOD, CAT e GPx são enzimas antioxidantes endógenas que combatem a formação de radicais livres e impedem que os mesmos causem oxidação de lipídeos (Steenvoorden e Van Henegouwen, 1997; Chen *et al.*, 2012). Vários sistemas de eliminação de ERO´s se desenvolveram em tecidos de mamíferos para eliminar os componentes reativos e proteger as células. A SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em O_2 (oxigênio molecular) e H_2O_2, e a CAT decompõe H_2O_2 em O_2 e H_2O (Mccord e Fridovich, 1988; Chelikani *et al.*, 2004). A combinação de SOD e CAT sequestra completamente o $O_2^{\bullet-}$, que é a espécie radicalar que inicia a formação das ERO´s. A GPx, assim como a CAT, decompõe H_2O_2 na presença da forma reduzida do antioxidante endógeno, glutationa (GSH) (Muller *et al.*, 2007).

Outro marcador do processo oxidativo são as proteínas carboniladas, que são formadas através da clivagem oxidativa de proteínas ou pela oxidação direta de resíduos de aminoácidos. Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos nas proteínas por reações com aldeídos derivados da peroxidação lipídica. A presença de proteína carbonilada é utilizada como indicador de alterações proteicas mediadas por moléculas reativas de oxigênio, que são frequentemente associadas com o fotoenvelhecimento. Sabe-se que proteínas no estrato córneo e na derme são alvos de oxidação e altos níveis de proteínas carboniladas são detectados na camada mais externa do estrato córneo de áreas da pele expostas ao sol (Kobayashi *et al.*, 2008).

1.3 Agentes naturais bioativos e fotoquimioprotetores

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas – quase 19% da flora mundial (Giulietti *et al.*, 2005). *Cecropia obtusa* Trécul. (Fig. 2), popularmente conhecida como embaúba branca (Muniz, 2008), é uma planta pertencente à família Urticacea, nativa de regiões tropicais, predominantemente encontrada na América do Sul e Central. Embaúba é a designação comum de várias espécies de árvores, principalmente do gênero Cecropia. Embaúbas são leves e possuem caule e ramos ocos. Essas plantas vivem em simbiose com formigas, que protegem as arvores dos animais herbívoros. Além disso, características marcantes são a rápida dispersão e pouca exigência de solo, o que leva essas plantas a serem comumente encontradas em áreas desmatadas em recuperação (Rocque e Soares, 2001; Gaglioti *et al.*, 2014).

Figura 2. Árvore de *C. obtusa*

Fonte: Gaglioti, Carvalho et al., 2014.

Apesar da família Urticacea ser composta por raríssimas árvores, *C. obtusa* é uma exceção, já que trata-se de árvores que podem atingir até 15 m de altura. A planta é dióicas (indivíduos femininos e masculinos) e possui tricoma (pelos) no caule e folhas. *C. obtusa* é utilizada na medicina popular para anemia, anti-inchaço dos olhos, diabetes, ferimentos, hepatite, inflamação e tosse. É eficaz também para a microcirculação e fragilidade capilar (Gaglioti *et al.*, 2014).

A espécie *C. obtusa* possui atividade antioxidante comprovada por diferentes métodos (Silva *et al.*, 2007), porém ainda faltam muitas informações a respeito de suas possíveis aplicações. Na França, estudos *in vitro* com a espécie demonstraram a atividade lipolítica do extrato aquoso da planta e testes clínicos demonstraram a eficácia de uma formulação incorporada do extrato na redução da textura rugosa e alaranjada de celulites (© LABORATOIRES SÉROBIOLOGIQUES, DIVISION DE COGNIS FRANCE).

A literatura sugere que um bom antioxidante não deve ser apenas um bom sequestrador de radicais, mas também ativar fatores de transcrição que induzam a expressão de enzimas antioxidantes, melhorando assim o estresse oxidativo. Para avaliar um novo produto como antioxidante, como um composto capaz de alterar o estado redox celular, ensaios antioxidantes em células devem ser realizados, uma vez que a participação

de diferentes componentes da célula é crítica para finalmente ser desenvolvida uma resposta antioxidante (López-Alarcón e Denicola, 2013).

Quimioprevenção são meios de controlar o estabelecimento de doenças, podendo o seu aparecimento ser inteiramente prevenido, diminuído ou revertido através de administração tópica ou oral de compostos naturais ou sintéticos. Apesar de possuírem fator de proteção solar (FPS), sabe-se que muitos protetores solares apesar de protegerem contra o aparecimento de eritema, não são capazes de proteger contra danos oxidativos na pele induzidos pela radiação (Vilela *et al.*, 2013).

Estudos mostram que quando os filtros solares benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila penetram na epiderme viável da pele, o nível de EROs aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob irradiação. Assim, a fotoquimioproteção tem sido apreciada como uma maneira viável de reduzir a ocorrência de uma variedade de desordens de pele (Hanson *et al.*, 2006). Em função disso, alguns autores propõem que agentes fotoquimioprotetores para uso humano devem atenuar os efeitos adversos biológicos da radiação UV (Afaq *et al.*, 2005) e que o protetor solar ideal, além de ser seguro e estável, deve proteger a pele contra as radiações UVA e UVB, sequestrar radicais livres e conter enzimas ou outros ingredientes ativos que estimulem a reparação do DNA (Gilaberte e González, 2010).

1.4 Caracterização química de agentes naturais bioativos

Para que os extratos de origem vegetal possam ser empregados com finalidades farmacêuticas, estes devem ser padronizados e possuir caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança. Metodologias empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são utilizadas com várias finalidades e para analisar diferentes produtos. Uma das vantagens da utilização do CLAE é a possibilidade de analisar uma grande variedade de compostos. Um procedimento analítico específico é designado de forma a atingir determinada meta, como seletividade, sensibilidade, limite de detecção, rápido tempo de análise e reprodutibilidade, que são parâmetros dependentes das propriedades do composto a ser analisado (Kamour *et al.*, 2013).

Outra técnica instrumental muito abrangente com inúmeras aplicações é a espectrometria de massas (MS). Esta técnica é utilizada para detectar e identificar moléculas por meio da medição da sua massa e pela relação massa/carga (*m/z*) dos íons

formados. A espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (EM-EM) utiliza dois estágios de espectrometria de massas (MS1 e MS2), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. Dessa forma, uma das principais etapas desse processo é a formação de íons. Um dos sistemas de cromatografia líquida com ionização à pressão atmosférica pode ser do tipo ESI (ionização por electrospray), que é recomendado para compostos com elevada massa molecular. Para ESI, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, íons quasi-moleculares (moléculas protonadas/desprotonadas: $[M+H]^+$ / $[M-H]^-$) e moléculas cationizadas ou anionizadas. A massa isotópica e o perfil de fragmentação são então comparados à uma base de dados. Considerando a grande variedade de metabólitos e suas diferentes concentrações, não é possível analisar todos os componentes de uma amostra com apenas uma técnica analítica, e a elucidação estrutural só é alcançada com a utilização de ressonância magnética nuclear (Crotti *et al.*, 2006; Dettmer *et al.*, 2007; Chiaradia *et al.*, 2008; Courant *et al.*, 2014).

1.5 Desenvolvimento de formulações fotoquimioprotetoras

Filtro solar físico ou inorgânico é aquele que funciona como barreira contra a radiação. Eles são impermeáveis à radiação, refletindo-a em sua maior parte. Na reflexão/dispersão, a luz incidente nas partículas inorgânicas é redirecionada, refletindo de volta ou se espalhando por diferentes caminhos. Este processo é responsável pela translucidez e opacidade das partículas de filtros inorgânicos aplicadas sobre a pele (Cabral, 2011).

Os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados com um grupo carbonila. A estrutura dos filtros orgânicos permite que absorvam a radiação com alta energia, convertendo-a numa radiação inócua com baixa energia. As moléculas dos filtros absorvedores contidos no protetor solar possuem numerosas duplas ligações em sua configuração, seja no anel benzênico ou na cadeia linear. Este arranjo permite que muitos dos elétrons que se encontram em orbitais de mais baixa energia absorvam a radiação UV incidente e sejam excitados para orbitais de mais alta energia, realizando a conversão das radiações de alta energia e pequenos comprimentos de onda, que são altamente danosas, em radiações de pequena energia e altos comprimentos de onda. A energia UV absorvida por uma molécula é liberada quando esta retorna ao seu estado de repouso. Todavia, a

liberação da mesma se dá na forma de luz fluorescente ou fosforescente e calor, podendo, ainda, se decompor e formar fotoprodutos (Cabral, 2011)

Os métodos espectrofotométricos são frequentemente utilizados como "screening" de substâncias promissoras para absorção da radiação. Apesar de metodologias *in vitro* predizerem a capacidade da amostra absorver/refletir a radiação, os resultados obtidos por essas metodologias muitas vezes não são reproduzidos quando é utilizada a metodologia de determinação do FPS *in vivo*. As metodologias *in vitro* não substituem a determinação do FPS *in vivo*, porém são necessárias para avaliar substâncias no processo inicial de triagem e selecionar as amostras mais promissoras para prosseguirem para a determinação *in vivo*. Além disso, os métodos *in vitro* apresentam vantagem como: rapidez de execução, custo acessível, reprodutibilidade, facilidade de treinamento do operador e não necessita de exposição do voluntário a riscos (Velasco, 2011).

Os primeiros filtros solares foram propostos para prevenir os efeitos da radiação solar na pele, evitando a passagem da radiação ultravioleta por meio de mecanismos de reflexão, refração e absorção das mesmas (Gilaberte e González, 2010). Além disso, sabe-se que os filtros solares sofrem processos de degradação induzidos pela radiação UV, o que leva à uma redução na capacidade de proteção da pele e também à geração de espécies potencialmente tóxicas (Scalia e Mezzena, 2010).

Assim, é interessante o desenvolvimento de protetores solares contendo concentrações reduzidas de filtros sintéticos, mas que mantenham eficácia de amplo espectro e apresentem atividade biológica, o que pode ser conseguido pela incorporação de matérias-primas vegetais que melhorem a absorção UV e sejam capazes de proteger do dano oxidativo.

Dessa forma, a proteção antioxidante proporcionada pelos componentes dos extratos vegetais também está relacionada com a capacidade das substâncias em penetrar na pele e atingir as células da epiderme (queratinócitos) e derme (fibroblastos).

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

Para a realização dos estudos de penetração cutânea de uma formulação, as substâncias ativas são quantificadas por metodologia analítica. Normalmente a quantidade de substância ativa detectada é muito pequena e desta forma métodos analíticos muito sensíveis como CLAE são utilizados. Sabe-se que extratos vegetais são amostras complexas formadas por vários constituintes, então a atividade esperada pode ser devido à ação sinérgica de vários compostos que estão presentes no extrato, o que torna importante a avaliação da penetração da maior quantidade de compostos possíveis.

Estudos demonstram que a escolha dos excipientes influencia claramente o destino do ativo na pele e a liberação do mesmo. Esse processo não deve comprometer irreversivelmente a função de barreira da pele. As emulsões, por exemplo, requerem agentes emulsificantes, estabilizantes e conservantes para que permaneçam estáveis. Os compostos que apresentam essas atividades podem interagir entre si e com o ativo e apresentar efeito irritante e sensibilizador, além de promover a degradação e desestabilização da formulação, podendo causar dano à pele ao invés de protegê-la (Mugglestone *et al.*, 2012)

Silicones são compostos hidrofóbicos muito eficientes na geração de emulsões altamente estáveis. Os polímeros de silicone de cadeia linear e de cadeia cruzada foram modificados para aplicações específicas, que incluem produtos farmacêuticos, cosméticos, cuidados pessoais, revestimento e liberação de fármacos. Além disso, eles possuem características estruturais que fazem com que eles possam ser utilizados em baixas dosagens (Purohit e Somasundaran, 2014). Dentre dessas características, pode-se citar: ângulos de ligação Si-O-Si (140°) que são maiores que ângulos de ligação COC (110°); comprimentos de ligação Si-O (1,64 A) que são mais longos do que CC (1,53 A); maior liberdade de rotação em torno da ligação Si-O comparada com a ligação CC; e grupos de metila livremente rotativos que podem orientar-se para as interfaces. Essas características conferem propriedades como estabilidade ao calor e alta resistência ao ataque químico (Somasundaran, 2010).

As emulsões são uma mistura de dois líquidos imiscíveis. Geralmente, uma das fases líquidas é água e a outra fase líquida orgânica insolúvel em água, é um óleo. A estabilidade geral de um processo de emulsão pode estar relacionada com a natureza física do filme interfacial, existência de uma barreira elétrica ou estérica sobre as gotas, viscosidade da fase contínua, distribuição de tamanho das gotas, temperatura e densidade das duas fases (Somasundaran, 2010).

O estudo do comportamento reológico assume cada vez mais importância na avaliação da estabilidade (Camargo Junior, 2006). A reologia é o estudo do fluxo de materiais quando aplicada uma força externa. Sendo que esses materiais podem apresentar dois tipos diferentes de comportamentos reológico de acordo com as características do seu fluxo. O fluxo Newtoniano é caracterizado por valores constantes de viscosidade independentemente da força aplicada, enquanto que, o fluxo não-newtoniano apresenta redução (pseudoplastico) ou aumento da viscosidade (dilatante) de acordo com a força aplicada (Martin *et al.*, 1993).

A análise dos parâmetros viscosidade, índice de fluxo, índice de consistência e tixotropia, permitem compreender melhor a natureza físico-química do veículo na fase de desenvolvimento, controlar a qualidade de matérias-primas e produtos acabados, avaliar o efeito da consistência do produto na liberação e penetração dos ativos, além de contribuir na previsão do prazo de validade do produto (Camargo Junior, 2006).

Em suma, vários fatores estão relacionados ao desenvolvimento de formulações tópicas contendo extratos naturais, e vários parâmetros são utilizados para avaliar a estabilidade dessas formulações e a penetração na pele. A penetração das substâncias ativas pode ser auxiliada dependendo dos constituintes da formulação, mas o parâmetro mais importante a ser avaliado antes da etapa de desenvolvimento é a atividade biológica. Para tal, diferentes parâmetros antioxidantes podem ser analisados na pele ou em cultura de células, e a capacidade de sequestrar EROs é de extrema importância, visto que elas iniciam o processo de estabelecimento do estresse oxidativo na pele e são compostos altamente reativos, especialmente o $^{\bullet}OH$.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do extrato de *C. obtusa* para utilização como agente fotoquimioprotetor tópico, englobando sua atividade redutora do estresse oxidativo. Também objetivou-se avaliar o comportamento de formulações tópicas contendo o extrato e sua eficiência em promover a penetração dos componentes do extrato em pele humana.

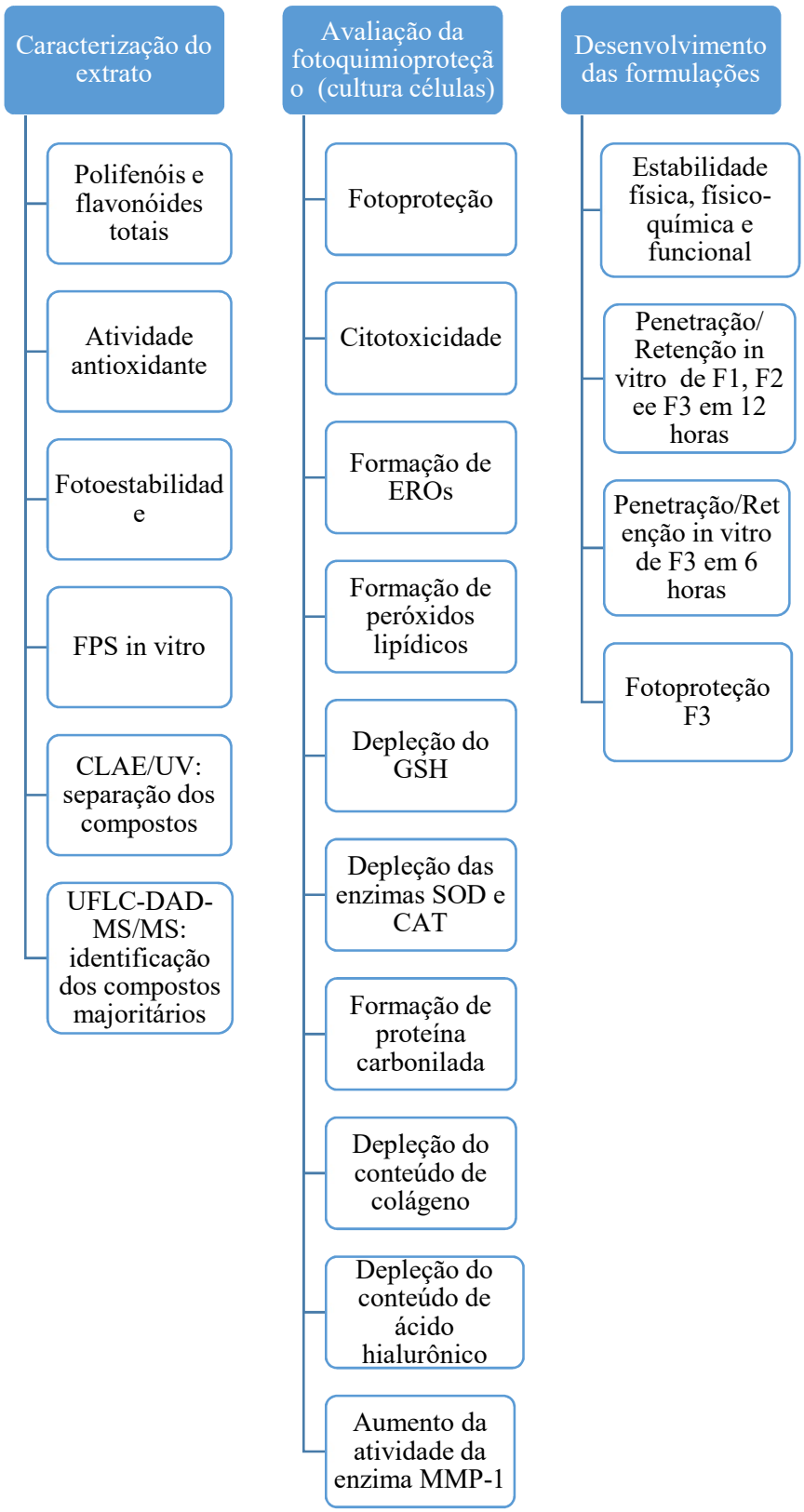
2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente e funcionalmente, por medida da atividade antioxidante *in vitro*, o extrato de *C. obtusa.*
- Avaliar a atividade protetora do extrato contra o estresse oxidativo promovido pela radiação UVA em cultura de queratinócitos e fibroblastos humanos.
- Avaliar a proteção oferecida pelo extrato frente à radiação UVA/UVB através da análise do estresse oxidativo sobre proteínas e ácido hialurônico em cultura de células.
- Desenvolver e validar uma metodologia para separar os compostos majoritários por CLAE/UV.
- Identificar por UFLC/MS/MS as substâncias presentes em maior quantidade no extrato de *C. obtusa*.
- Desenvolver formulações contendo 4% de extrato contendo diferentes promotores de absorção.
- Avaliar a estabilidade físico-química e funcional e o comportamento reológico das formulações
- Avaliar as formulações desenvolvidas frente à penetração dos componentes do extrato na pele.
- Avaliar a atividade fotoprotetora e de absorção da radiação do extrato e das formulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir está apresentado um diagrama das metodologias empregadas no desenvolvimento do estudo.

Figura 3. Diagrama metodológico



3.1 Obtenção do extrato de *C. obtusa*

O extrato foi gentilmente cedido pela empresa AMAZONDREAMS (Belém /PA). As folhas secas foram extraídas com etanol a 50ºC, seguindo-se purificação em resina macroporosa e processo de secura por liofilização. O extrato possui autorização de acesso e remessa do CGEN número 010526/2015-3.

3.2 Caracterização do extrato

3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão de referência para a construção da curva de calibração. Foram adicionados a 500µL da amostra ou solução de ácido gálico, 500µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500µL da solução de Na_2CO_3 (10%). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 760nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de amostra foi substituída pela mesma quantidade de água deionizada. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato (Kumazawa *et al.*, 2004).

3.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonóides totais foi avaliado de acordo com Kumazawa e colaboradores (2004), sendo a quercetina empregada como padrão de referência para a construção da curva de calibração. Foram adicionados a 500µL de soluções de extrato ou do padrão quercetina, 500µL de solução hidroetanólica 50% (v/v) de cloreto de alumínio a 2% (w/v). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de cloreto de alumínio (2%) foi substituída pela mesma quantidade de etanol 50% (v/v). O conteúdo de flavonóides totais foi expresso como mg de equivalente de quercetina (EQ) por g de extrato (Kumazawa *et al.*, 2004).

3.2.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH$^{\bullet}$

A atividade antioxidante foi determinada utilizando a solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH$^{\bullet}$) pelo método descrito por Blois (1958). 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$^{\bullet}$ (200µM). Após 10 minutos a leitura

foi realizada no comprimento de onda de 517nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001, e os resultados foram expressos como a concentração que inibe o processo oxidativo em 50% (IC_{50}).

3.2.4 Determinação do sequestro do radical $O_2^{\bullet-}$ por medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/ XOD/luminol

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade sequestradora do $O_2^{\bullet-}$ pelo extrato segundo a metodologia descrita por Marquele et al. (2007), na qual são adicionados 400µL da solução de EDTA (1mM) em tampão glicina (0,1M, pH 9,4), 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 de xantina oxidase (XOD) (20mUN/mL) e a medida da quimioluminescência foi realizada em lumiômetro Autolumat LB953 durante 5 minutos a 25ºC. A atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ pelo extrato, determinada pela inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida da área sob a curva (ASC) e os resultados foram expressos como IC_{50}.

3.2.5 Atividade sequestradora do oxigênio singleto- $^1O_2$

A atividade sequestradora do $^1O_2$ foi estimada por ressonância de spin eletrônico (ESR-spin trapping) (Masaki *et al.*, 1995). O meio reagente consistiu de 50µL de tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,0), 50µL de 2,2,6,6-tetrametil cloridrato de piperidona (TMPD) 200 mM, 50µL de 0,1mM de vitamina B2 (riboflavina), e 50 µL das amostras diluídas em metanol 80%. A solução resultante foi incorporada em um tubo capilar (caps® anel, HIRSCHMANN) e submetida à irradiação UVA durante 30 segundos (SUPER CURE-203S UV Lightsource; SAN-EI ELECTRIC). Os espectros de ESR foram gravados pelo espectrômetro (RFR-30, Radical Research, Inc.), com uma frequência de modulação de campo de 100 kHz e uma amplitude de modulação de 0,1 mT, com uma fonte de saída de 5 mW. Azida de sódio foi usada como controle positivo e os resultados foram expressos como IC_{50}.

3.2.6 Atividade sequestradora do radical hidroxila- $^{\bullet}OH$

O radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) foi fornecido pela reação de Fenton com H_2O_2 e Fe^{2+}, e o spin trap utilizado foi o 5,5-dimetil-1-pyrrolina-N-oxido (DMPO). O meio reacional consistiu de 50µL de $Fe(ClO_4)_2/6H_2O$ (0,5 mM em água deionizada), 50µL de 1 mM de H_2O_2, 50µL de 5,1% de DMPO e 50 µL das amostras diluídas em água deionizada contendo DMSO (0,3% v/v). Trinta segundos após a adição de H_2O_2, a solução foi incorporada num

tubo capilar (anel caps®, HIRSCHMANN) e o espectro de ESR foi registrado com um espectrômetro (RFR-30, Radical Research, Inc.) com uma frequência de modulação de campo 100 kHz e uma amplitude de modulação de 0,1 mT, com uma fonte de saída de 5 mW. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

3.2.7 Identificação e Quantificação dos componentes do extrato de *C. obtusa* por CLAE/UV e UFLC-DAD-MS/MS

3.2.7.1 Identificação dos constituintes

Antes da identificação dos componentes majoritários, o extrato foi separado em picos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo liquido acoplado a detector de UV, empregando condições cromatográficas estabelecidas no laboratório e tendo como base o trabalho de Costa et al. (2011). Para a análise por CLAE utilizou-se o cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador, modelo C-R6A, onde as amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne com um loop de 20 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 320 nm. A separação cromatográfica foi feita através de eluição por gradiente (Tabela 1) em coluna C18 Hypersil GOLD (5µm)- Thermo Scientific, 4,5 x 250 mm acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel constituiu-se de água (A) e acetonitrila (B), ambas adicionadas de ácido fórmico 1%, a vazão utilizada foi de 1 mL/min.

Para o preparo das soluções, 10 mg do extrato foi solubilizado em 10 mL de álcool metílico 80%. Posteriormente, essa solução foi diluída em álcool metílico 50% visando obter diferentes concentrações que, em seguida foram filtradas em filtro tipo milex 0,45 µm.

Tabela 1 – Gradiente utilizado na eluição dos compostos do extrato de *C. obtusa* por Cromatografia Líquida.

Tempo (minutos)	%B
0,01	7,0
7,00	15,0
25,00	20,0
37,00	20,0
42,00	35,0
45,00	7,0
50,00	7,0

Para a identificação das substâncias referentes aos picos majoritários utilizou-se cromatografia líquida acoplada a detector de diodos e espectrômetro de massas. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas acima, exceto que na fase móvel o ácido fórmico foi reduzido para 0,1%.

O Equipamento utilizado foi o UFLC Shimadzu acoplado DAD (SPD-M20A) e Espetrômetro de Massas Amazon SL- Bruker, com ionização por electrospray e analisador Ion Trap.

3.2.7.2 Validação do método analítico e quantificação dos componentes do extrato por CLAE/UV

O método analítico estabelecido para separação dos componentes do extrato de *C.obtusa* por CLAE/UV, descrito acima, foi validado visando sua utilização nos estudos de penetração/retenção *in vitro* para quantificar os componentes que penetraram na pele humana. A validação foi desenvolvida de acordo com as diretrizes de Validação de Procedimentos Analíticos do ICH-Q2 (R1) (2005) e do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL. ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

A) Linearidade

Neste ensaio várias concentrações foram avaliadas e determinou-se o intervalo linear entre a área e diferentes concentrações do extrato e do ácido clorogênico. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração.

B) Precisão

De acordo com as especificações do ICH, a precisão pode ser subdivida em: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste estudo não foi levada em consideração a precisão entre laboratórios, portanto o estudo foi focado na repetibilidade inter-dia com o mesmo analista e mesma instrumentação. Ainda de acordo com o ICH, para uma correta abordagem, no mínimo 9 determinações devem ser feitas (como por exemplo 3 concentrações/triplicata cada).

Assim, a precisão foi avaliada através da medida da área dos 3 picos majoritários e pela determinação do teor de ácido clorogênico no extrato, além do estabelecimento do coeficiente de variação (CV) obtido entre as análises.

3.2.8 Avaliação da fotoestabilidade e determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

A fotoestabilidade do extrato foi avaliada por medida espectrofotométrica das soluções do extrato irradiadas e não irradiadas na região do UV (280 a 400 nm). Cem miligramas do extrato foram solubilizados em 5 mL de metanol 80%. Estas soluções foram diluídas para 0,2mg/mL em metanol 80% e os espectros de absorção foram obtidos em espectrofotômetro. A solução do extrato de 0,2 mg/mL foi submetida à radiação UVA (4J /cm^2) ou UVB (0,02J /cm^2), em doses previamente padronizadas no laboratório. Os perfis de absorção das soluções de extratos irradiadas e não irradiadas foram comparados.

Para determinação *in vitro* do FPS, a amostra foi preparada conforme descrito acima, e foi utilizado o método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986). A solução do extrato foi lida em espectrofotômetro de 290 a 320nm a cada 5nm. O valor de FPS foi calculado pela fórmula:

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot i(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde: Abs é a absorvância da amostra no comprimento de onda, SPF é o fator de proteção solar, CF é o fator de correção (CF=10), EE é o efeito eritematoso da radiação e I é a intensidade da luz, sendo que EE x I são constantes para cada comprimento de onda.

As analises foram realizadas à temperatura ambiente. Os espectros de absorção da solução do extrato foram obtidos na região do UV empregando-se espectrofotômetro Shimadzu mod. UV – 1601 PC de varredura, que apresenta as seguintes características: duplo feixe entre 290-320 nm, banda espectral de 5 nm interfaceado por software que permite correção automática de linha de base e manipulação total do espectro.

3.3 Avaliação da fotoquimioproteção em cultura de células

A fotoquimioproteção em cultura de células foi estudada através avaliação da fotoproteção e do estresse oxidativo. A avaliação do estresse oxidativo englobou a avaliação dos marcadores do estresse oxidativo: formação de EROs, peróxidos lipídicos, depleção dos níveis de GSH, atividade das enzimas CAT e SOD, formação de proteína carbonilada, depleção dos níveis de colágeno e ácido hialurônico e atividade da enzima MMP-1.

3.3.1 Condições de cultivo celular

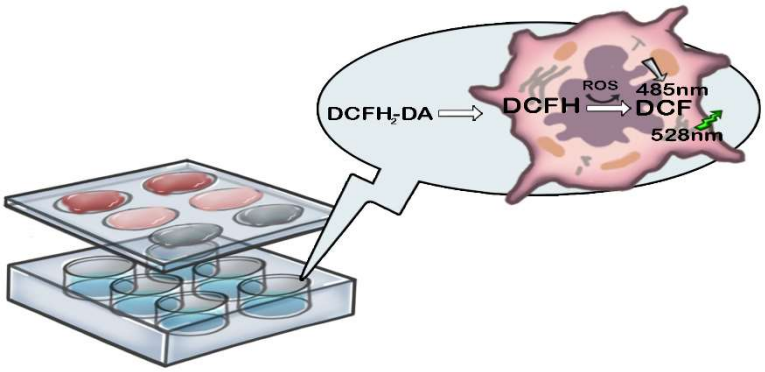
Para os experimentos de avaliação de formação de proteína carbonilada, avaliação do conteúdo de colágeno e ácido hialurônico e avaliação da enzima MMP-1, as células de fibroblastos humanos primários e queratinócitos humanos eternizados HaCaT, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com soro bovino fetal (SBF) 5%, penicilina G (100 UI/mL), estreptomicina (100 μg/mL) e incubadas em atmosfera umidificada com 5 % de CO_2 a 37°C. As células foram sub-cultivadas a cada 5-7 dias, usando salina 0,9 % para lavagem e tripsina 0,25 % para desagregação do frasco (Izidoro, 2001). Para a avaliação da fotoproteção, avaliação da atividade sequestradora das EROs, quantificação do nível de peróxidos lipídicos, avaliação quantitativa do GSH, e avaliação da atividade enzimática da SOD e CAT, as condições de cultivo para as células HaCaT (adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Cat# 0341) foram as mesmas, porém o meio utilizado foi RPMI 1600, suplementado com 10% SBF.

3.3.2 Avaliação da fotoproteção

Para a realização do experimento de fotoproteção em cultura de células, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de $1,6x10^6$ células/poço e foram incubadas por 24 horas. O extrato foi solubilizado em propilenoglicol (20, 40 e 80 mg/mL) e essa solução foi aplicada sobre a placa de quartzo na quantidade de 2 mg/cm^2, o que impede o contato da amostra com as células (Jaszewska *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2014). O parâmetro utilizado para avaliar o dano induzido pela radiação foi a formação de EROs, que foi analisada imediatamente após a irradiação, utilizando 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína ($DCFH_2$-DA), conforme esquematizado na Fig. 4.

Para a avaliação da formação de EROs, as células foram lavadas com tampão Hanks e incubadas por 30 minutos com uma solução 5μM de DCFH2-DA em tampão Hanks. Logo após, as células foram lavadas novamente e submetidas à radiação UVA ($4J/cm^2$) ou UVB ($0,02J/cm^2$) em tampão Hanks. Imediatamente após a irradiação a fluorescência foi medida em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 528 nm (Wang e Joseph, 1999).

Figura 4. Representação esquemática do experimento de fotoproteção em cultura de células, que avalia a formação de EROs.



Os resultados foram comparados com dois protetores solares comerciais: CP1, cujo valor de FPS declarado na embalagem era 15, e CP2, cujo valor de FPS declarado na embalagem era 30. Os protetores comerciais foram aplicados na placa de quartzo na quantidade de 2 mg/cm^2. Os resultados foram comparados com o controle positivo (PC: células que foram irradiadas mas não tratadas) e com o controle negativo (NC: células que não foram nem tratadas nem irradiadas).

3.3.3 Solubilização do extrato de *C. obtusa* e do Ácido clorogênico

O extrato foi solubilizado (1 mg/mL) em água deionizada contendo 0,5% (v/v) de DMSO e as seguintes diluições foram feitas em água (20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml). O ácido clorogênico foi solubilizado da mesma forma que o extrato. Como a identificação dos constituintes do extrato foi realizada em paralelo aos experimentos em cultura de células, o ácido clorogênico foi utilizado como padrão apenas para a avaliação de formação de proteína carbonilada, avaliação do conteúdo de colágeno e ácido hialurônico e avaliação da enzima MMP-1.

3.3.4 Citotoxicidade- ensaio de captura do corante vermelho neutro

As células HaCaT foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1x10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato. Após 24 horas de tratamento, a solução de vermelho neutro (40 µg/mL em salina) foi adicionada em cada poço e as placas foram incubadas por 3 horas a 37 ºC. Em

seguida, o vermelho neutro foi removido, as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e $CaCl_2$ 1% (w/v); e, em seguida, 200µL de etanol com ácido acético 1% (v/v) foi adicionado a cada poço. A leitura da absorvância foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas em 540nm. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle negativo (NC, células não tratadas) (Borenfreund e Puerner, 1985).

3.3.5 Protocolo de cultivo e tratamento

Para os experimentos de peroxidação lipídica, GSH, SOD e CAT, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de $1,6x10^6$ células/poço. Para o experimento de EROs, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de $1x10^5$ células/poço. Após 24 horas, a células foram tratadas por 24 horas com o extrato, seguindo-se irradiação com radiação UVA (4J /cm^2) em tampão Hanks adicionado, ou não de nova solução do extrato. As células receberam dois tratamentos diferentes com o extrato. O grupo TIP foi pré-tratado durante 24 horas e irradiado na presença do extrato, o grupo TIA foi pré-tratado durante 24 horas e irradiado na ausência do extrato. O grupo IP foi utilizado apenas no experimento de avaliação da formação de EROs e consistiu de células que não foram tratadas, mas foram irradiadas na presença do extrato. Após irradiação, as células foram lavadas com tampão Hanks e o meio foi trocado para RPMI 1600. Para os ensaios de avaliação da atividade da CAT e peroxidação lipídica, após o tempo de irradiação as células foram imediatamente incubadas a 37°C durante três horas sem trocar o meio.

Para os experimentos de avaliação de formação de proteína carbonilada, avaliação do conteúdo de colágeno e ácido hialurônico e avaliação da enzima MMP-1, os fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de $2x10^4$ células/poço. Após 24 horas de incubação o meio foi retirado e as células foram pré tratadas, ou não, com o extrato ou ácido clorogênico por 24 horas em DMEM 0,5% SBF. Posteriormente, a placa foi submetida, ou não, a radiação (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB) em DMEM sem fenol red e pós tratadas, ou não, em DMEM 0,5% SBF por 24 horas com o extrato ou ácido clorogênico. Posteriormente, os meios de cultura das placas de fibroblastos foram diluídos 59 vezes e congelados a -80°C apenas para os experimentos de determinação de colágeno e AH.

Para o experimento de metaloproteinase os queratinócitos foram semeados em placas individuais de 35 mm de diâmetro a uma densidade de $45x10^4$. Após 24 horas de

incubação, o meio foi retirado e as células foram pré tratadas, ou não, com o extrato ou ácido clorogênico por 24 horas em DMEM 0,5% SBF . Posteriormente, a placa foi submetida, ou não, a radiação (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ UVB/cm^2) em DMEM sem fenol red e pós tratadas, ou não, em DMEM sem fenol red 0,5% SBF por 24 horas com o extrato ou ácido clorogênico. No mesmo dia foram preparadas placas individuais de 35 mm de diâmetro de fibroblastos semeados a uma densidade de $4x10^5$. No dia seguinte os sobrenadantes das placas de queratinócitos foram centrifugado a 3000 rpm por 5 min e transferidos para as placas de fibroblastos, que foram incubadas por 24 horas. Posteriormente, os meios de cultura das placas de fibroblastos foram congelados a -80°C para a realização dos experimentos.

As placas foram irradiadas a 5,5 cm da fonte de radiação UV e colocadas em banho de gelo durante o período de irradiação para evitar efeito térmico devido ao longo tempo de exposição a UV. Todos os resultados foram comparados com o controle positivo (PC: células que foram irradiadas mas não tratadas) e com o controle negativo (NC: células que não foram nem tratadas nem irradiadas).

3.3.6 Preparo do lisado celular

Para a determinação das atividades das enzimas CAT e SOD, como também do antioxidante endógeno GSH e para quantificação de proteínas para esses experimentos, as células foram lavadas com solução salina e raspadas dos poços com 250 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 µg/mL de pepstatina, 1 µg/mL de leupeptina e 0,25% de Nonidet® P40. Recolheu-se a suspensão de células de cada poço em microtubos, as células foram lisadas em ultrassom contendo água gelada e gelo por 5 minutos, seguido por 1 minuto de agitação em vórtex. O procedimento foi repetido por 2 vezes. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante do homogeneizado celular foi coletado.

Para a avaliação da proteína no experimento de proteína carbonilada, as células foram lisadas com 50 µL de 0,1% Triton X-100 em PBS (-) a 37°C por 15 minutos.

3.3.7 Determinação do conteúdo de proteína

O teor de proteínas do lisado celular foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e foi construída uma curva de calibração com soroalbumina bovina (BSA) para a quantificação do nível de peróxidos lipídicos, avaliação quantitativa do GSH, e avaliação da atividade enzimática da SOD e CAT.

Para os experimentos de avaliação do conteúdo de colágeno e ácido hialurônico e avaliação da enzima MMP-1, a determinação do conteúdo de proteína foi realizada no sobrenadante, e para a avaliação de formação de proteína carbonilada. no lisado celular. A determinação foi seguida de acordo com as instruções do kit Pierce® BCA. A absorvância foi medida em 550nm e foi construída uma curva de calibração com BSA.

3.3.8 Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular

A avaliação da formação de EROs foi realizada imediatamente após a irradiação (UVA: 4J/cm^2) utilizando DCFH$_2$-DA, conforme detalhado no ítem 3.4.2.

3.3.9 Quantificação do nível de peróxidos lipídicos

A quantificação do nível de peróxidos lipídicos foi realizada pela metodologia das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram adicionados 20 µL de hidroxitolueno butilado (2 % p/p em etanol) ao sobrenadante celular e posteriormente foi adicionado a 900 µL da mistura, 1 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,375 % p/p) contento HCL (0,25 M) e 15 % de ácido tricloroacético. Os tubos foram incubados por 15 minutos a 90°C e posteriormente foram resfriados em gelo. O complexo MDA-TBA foi extraído com 1,5 mL de n-butanol e centrifugado a 3000 rpm. A fluorescência da fração orgânica foi determinada em 515 e 550 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência. Para expressar os resultados em função da quantidade de malondialdeído (MDA), foi construída uma curva de calibração empregando solução padrão de tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich®) (Morliere *et al.*, 1995).

3.3.10 Avaliação quantitativa da glutationa reduzida

Vinte e quatro horas após a irradiação, o lisado celular foi avaliado pelo método fluorimétrico descrito por Hissin e Hilf (1976). Adicionou-se a 100 µL do sobrenadante, 1 mL de NaH_2PO_4 100 mM M, pH 8,0, contendo EGTA 5 mM, seguindo-se a adição de 100 µL de o-ftalaldeído (1 mg/mL em metanol). A fluorescência foi determinada após 15 minutos em 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência. O padrão de GSH (Sigma-Aldrich®) foi utilizado para elaboração da curva padrão.

3.3.11 Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT

Para avaliação da atividade da enzima CAT, foi utilizado o protocolo de Greenwald (1986), no qual adiciona-se a 400µL do sobrenadante celular, 3 mL de tampão fosfato (50 mM,pH 7,5) contendo 22,5mM de H_2O_2. O consumo de H_2O_2 foi monitorado em 240 nm. O resultado foi expresso como U/mg de proteína, em que 1U representa 1 mmol de H_2O_2 consumido/min.

Para a avaliação da enzima SOD, foi utilizado o protocolo descrito por Beauchamp e Fridovich (1971). Foi preparado 2,9mL de uma solução composta por 0,76mg (5µmol) de xantina, 10mL de NaOH 1mM, 24,8mg de citocromo C (2µmol) e 100mL de tampão fosfato 50mM, pH 7,8, com 0,1mM de EDTA. A essa solução foram adicionados 50µL de tampão fosfato, SOD padrão (Sigma®) ou amostra e a reação foi iniciada pela adição de 2µL de xantina oxidase (50mg ptn/mL). Em seguida, a reação foi monitorada em espectrofotômetro a 550nm, por 10 minutos. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de SOD suficiente para inibir a taxa de redução do citocromo c em 50%, e a atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína.

3.3.12 Avaliação da formação de proteina carbonilada

Para a determinação de proteína carbonilada, 24 horas após a irradiação a placa foi lavada com PBS (-) e as células foram fixadas com metanol por 5 minutos a -20°C. Em seguida a placa foi lavada novamente e adicionou-se 100µL da solução de Fluoresceína-5-tiossemicarbazida (20µM em tampão MES 0.1M, pH5,5). A placa permaneceu no escuro e em temperatura ambiente por 1 hora e após esse tempo os poços foram lavados e a fluorescência foi lida em excitação de 492nm e emissão de 516nm. Posteriormente as células foram lisadas para a determinação do conteúdo de proteína.

3.3.13 Avaliação do conteúdo de ácido hialurônico

Vinte e quatro horas após a irradiação, as amostras foram congeladas para a determinação do conteúdo de AH por ELISA competitivo. Na primeira placa adicionou-se 100µL de uma solução 5µg/mL de AH a cada poço e a placa foi incubada overnight a 4 °C. A placa foi lavada com TBS e posteriormente foi bloqueada com 150 µL de BlockAce (10mg/mL- DS Pharma Biomedical, Japão) por 1 hora a temperatura ambiente. Ao mesmo tempo adicionou-se em uma segunda placa de 96 poços, 60 µL da amostra e 60 µL Biotin-

HABP (proteina ligante biotinilada hialuronan) em 0,3% BSA-PBS e seguiu-se incubação por 1 hora à temperatura ambiente.

Posteriormente a primeira placa foi lavada com TBS e 100µL do conteúdo da segunda placa foi adicionado na primeira placa, seguindo-se incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada novamente com TBS e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos com 100µL/poço de Streptavidina-HRP (diluída 500 vezes em 0,3% BSA-PBS). Seguiu-se nova lavagem com TBS e posteriormente, 150µL ml de ABTS (0.3 mg/ml em tampão fosfato-citrato 0.1M adicionado de 30% H_2O_2, pH 4.0) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos a absorbância foi medida em 405 nm e a concentração de AH foi determinada através da utilização de uma curva padrão.

3.3.14 Avaliação do conteúdo de Colágeno

Vinte e quatro horas após a irradiação, as amostras foram congeladas para a determinação do conteúdo de colágeno por ELISA. 50 µL do sobrenadante foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada overnight a 4 °C. A placa foi lavada com TBS e foi incubada com 200 µL de 1% BSA–PBS por 1 hora a 37°C. Posteriormente 100 µL da solução de anticorpo de colágeno tipo 1 (156ng/mL) em 0,3% BSA-PBS foi adicionada a cada poço, seguindo-se incubação a 37°C por 90 minutos. A placa foi lavada com TBS e foi incubada a 37°C por 30 minutos com 100µL/poço de Streptavidina-HRP (diluída 500 vezes em 0,3% BSA-PBS). Seguiu-se nova lavagem com TBS e posteriormente, 150µL ml de ABTS (0.3 mg/ml em tampão fosfato-citrato 0.1M adicionado de 30% H_2O_2, pH 4.0) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos a absorbância foi medida em 405 nm e a concentração de colágeno foi determinada através da utilização de uma curva padrão.

3.3.15 Avaliação da atividade da enzima MMP-1

Para avaliação da atividade da MMP-1, as amostras foram descongeladas e normalizadas em relação ao conteúdo proteico (10µg/poço) em DMEM sem fenol red e aquecidas a 100ºC por 5 minutos. A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida utilizou gel de empacotamento 4,5% e o de separação 12,5% em uma corrente de 20mA. Após separação, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose sob 144 mA por 1 hora. Posteriormente a membrana foi bloqueada com BlockAce (40mg/mL- DS Pharma Biomedical, Japão) à temperatura ambiente por 2 horas. Após lavagem com TBS,

a membrana foi incubada overnight com anticorpo primário (Anti MMP-1 humana– R&D Systems, Japão. 1:1000 em Can Get Signal- Toyobo Co, Japão). Em seguida a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG /HRP – R&D Systems, Japão. 1:1000 em Can Get Signal- Toyobo Co, Japão) por 2 horas. A membrana foi lavada novamente e revelada com o corante EZ West blue (Atto Corp., Japão), seguindo-se digitalização das bandas e analise pelo programa ImageJ (versão 1.50b).

3.4 Desenvolvimento da formulação contendo o extrato de *C. obtusa*, adicionada ou não, de promotores de absorção

Para a preparação das emulsões de silicone adicionadas ou não do extrato de *C. obtusa* (Tabela 2), o extrato foi solubilizado em propilenogligol 50%. A emulsão foi preparada através da adição do agente de espessante no volume restante de água, seguindo-se homogeneização vigorosa. Posteriormente incorporou-se a solução do extrato e o promotor de absorção (ou água). As formulações preparadas foram submetidas ao estudo de estabilidade preliminar

Tabela 2. Composição (% w/w) das formulações adicionadas ou não do extrato de *C. obtusa*.

Componentes (%)	F1	V1	F2	V2	F3	V3
Agente espessante	5	5	5	5	5	5
Propilenoglicol	5	5	5	5	5	5
Óleo de Macadâmia	-	-	5	5	-	-
Oleato de Isodecila	-	-	-	-	5	5
Phenova	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Água deionizada	85,5	84,5	80,5	84,5	80,5	84,5
Extrato de *C. obtusa*	4	-	4	-	4	-

F: formulação; V: veículo; Agente espessante: Sodium Polyacrylate (and) Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) Trideceth-6 (and) PEG/PPG 18/18 Dimethicone.

3.5 Avaliação da estabilidade física, físico-química e funcional das formulações

As formulações foram acondicionadas em recipientes de polipropileno impermeáveis e o estudo de estabilidade preliminar foi realizado em condições extremas de temperatura e umidade. O teste de estabilidade acelerado foi realizado conforme descrito por WHO (2009) por um período de 6 meses nas condições de 40 °C ± 2 °C/75% RH ± 5% RH. Os controles foram as formulações e seus respectivos veículos que foram

mantidos a 4°C por todo o período. As análises de pH, centrifugação, atividade antioxidante e comportamento reológico foram realizadas a cada 2 meses.

3.5.1 Estabilidade físicoquimica

As características organolépticas foram examinadas para avaliar variações na aparência, cor e odor. A avaliação de pH foi realizada pela determinação direta do pH em soluções aquosas das amostras a 10% (w/v), utilizando peagâmetro Digimed DM20, e o teste de centrifugação foi realizado utilizando 2 g de cada amostra e submetendo-as à centrifugação a 1660 x g por 30 minutos em centrifuga (Eppendorf 581OR).

3.5.2 Estabilidade funcional

A estabilidade funcional foi avaliada pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol, conforme descrito no ítem 3.2.4.

3.5.3 Estabilidade física por avaliação do comportamento reológico das formulações

O comportamento reológico foi analisado a 25ºC usando um reômetro cone/prato (R/S plus controlled stress rheometer middleboco, USA) com GAP de 3mm e com spindle P25. O tempo de análise foi de 120 segundos para as curvas ascendente e descendente (as leituras para obtenção dos dados foram feitas a cada 1 segundo num total de 120 leituras). Os gráficos obtidos relacionam os valores de taxa de cisalhamento (1/s) no eixo das abcissas, com os valores de tensão de cisalhamento (Pa) no eixo das ordenadas. Os reogramas obtidos foram ajustados à equação de Herschel–Bulkle: $\tau = \tau_0 + k\gamma^n$ onde: τ é a tensão de cisalhamento, $\tau 0$ é a tensão de cisalhamento inicial, γ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, e n é o índice de fluxo. A viscosidade aparente foi determinada na taxa de cisalhamento de 60^{s-1}. O software RHEOCALC versão V 1.01 foi usado para obter os valores de viscosidade aparente, índice de fluxo e tixotropia.

3.6 Estudo *in vitro* de Penetração/Retenção dos componentes do extrato na pele humana

3.6.1 Escolha do solvente extrator

As peles foram obtidas imediatamente após cirurgia plástica de abdômen de indivíduos entre 25 e 40 anos de idade, sendo que os fototipos de pele foram I e II (fototipo

I: pele muito clara, queima com facilidade, nunca bronzeia; II: pele clara, queima com facilidade, bronzeia muito pouco) (Bardini *et al.*, 2012). Secções de 1,77 cm^2 de pele limpas tiveram o estrato córneo retirado pelo método de tape stripping utilizando 15 fitas adesivas tipo "durex". As amostras de pele foram enriquecidas com 50 µg do extrato, que foi solubilizado em metanol 80% e ficou em contato com a pele por aproximadamente 10 minutos até evaporação do solvente. Em seguida as peles foram picotadas com o auxílio de tesoura e transferidas para tubo falcon. Água, metanol 50% e 80% foram testados como solventes extratores a fim de se escolher o mais adequado para a avaliação da penetração/retenção dos compostos por CLAE. O processo de extração consistiu em adicionar 1 mL de água no tubo contendo as peles picotadas e deixar em banho de ultra-som por 30 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado. O procedimento foi repetido três vezes, e o volume total foi transferido para um tubo falcon, no qual as amostras foram secas sob fluxo de ar comprimido, ressuspendidas em 500µL de etanol 50%, filtradas em membranas com poros de 0,45 µm e então analisadas por CLAE.

3.6.2 Avaliação da recuperação

Em secções de 1,77 cm^2 de pele humana limpas e sem o estrato córneo, adicionou-se 200, 50 e 20 µg de extrato. Para cada concentração foram utilizadas três secções de pele. Um branco foi feito adicionando-se o solvente extrator também em três secções de pele, e a extração foi avaliada por CLAE.

3.6.3 Estudos *in vitro* de penetração/retenção

As formulações tópicas preparadas foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração/retenção dos componentes do extrato na epiderme viável através da quantificação dos compostos por CLAE. Esses estudos foram realizados utilizando-se células de Franz (1,77 cm^2 de área), com solução receptora tampão fosfato 0,15M, pH 7,2 contendo 0,5% de Tween 20. A solução receptora permaneceu sob agitação (400 rpm) por uma barra magnética e foi mantida a 37ºC por um banho circulante que envolve as células, conforme descrito por Vicentini (2009). Ao final de 12 ou 6 horas, a camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirada por tape stripping, pressionando-se uniformemente 10 fitas do tipo "durex". A pele remanescente (epiderme

viável + derme) foi submetida ao processo de extração, conforme descrito no ítem 3.8.1, e analisada por CLAE.

3.7 Avaliação da fotoproteção da formulação contendo oleato de isodecila

O experimento de fotoproteção em cultura de células foi conduzido conforme descrito no ítem 3.5.2. F3/V3 na quantidade de 2 mg/cm^2 foram aplicados sobre a placa de quartzo para avaliar a capacidade dessa formulação em absorver a radiação. Os resultados foram comparados com o controle positivo (PC: células que foram irradiadas mas não tratadas) e com o controle negativo (NC: células que não foram nem tratadas nem irradiadas), e com dois protetores solares comerciais: CP1, cujo valor de FPS declarado na embalagem era 15, e CP2, cujo valor de FPS declarado na embalagem era 30.

3.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística GraphPad Prism® (versão 5.0). Os resultados foram expressos pela média (n=3) ± erro padrão. Os grupos foram considerados diferentes para $p<0,05$ após análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do extrato de *C. obtusa*

4.1.1 Determinação de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante

O extrato foi caracterizado pela determinação dos polifenóis e flavonoides totais e pela atividade antioxidante por diferentes métodos *in vitro* (Tabela 3).

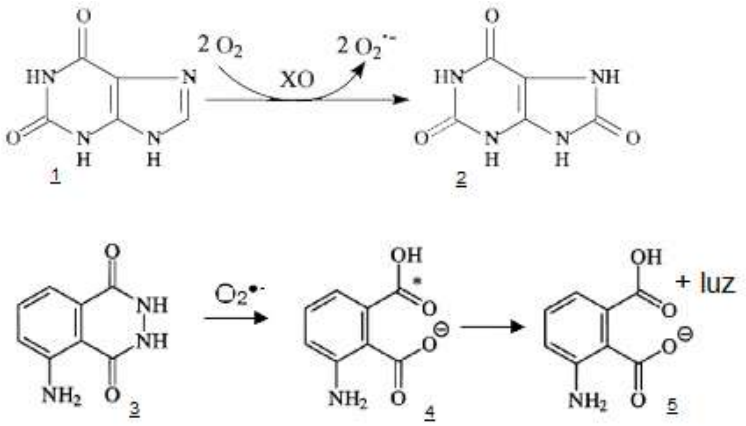
Tabela 3. Polifenóis (PT) e flavonóides totais (FT) e atividade antioxidante (apresentada como IC_{50}) em resposta ao $DPPH^{\bullet}$, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e oxigênio singleto ($^1O_2$)

Amostra	TPC (mg EGA/g)	TFC (mg EQ/g)	$DPPH^{\bullet}$ (µg/mL)	$O_2^{\bullet-}$ (µg/mL)	$^1O_2$ (µg/mL)
Extrato de *C. obtusa*	371,5 ± 3,7	66,68 ± 1,45	1,83 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,55 ± 0,02

média ± erro padrão (n=3). IC_{50}: µg de extrato por mL de meio reacional. EGA/g: equivalente de ácido gálico por grama de extrato. mg EQ/g: equivalente de quercetina por grama de extrato

A reação de formação do $O_2^{\bullet-}$ no sistema xantina/XOD/luminol ocorre conforme apresentado na Fig. 5. A xantina (1) é oxidada a ácido úrico (2) pela xantina oxidase (XO) e neste processo o oxigênio molecular age como aceptor de elétrons, produzindo $O_2^{\bullet-}$, que por sua vez oxida o luminol (3). O luminol oxidado (4) tende a voltar ao estado basal (5) emitindo luz, que é detectada pelo equipamento. Assim, o sequestro de $O_2^{\bullet-}$ no meio reacional leva à diminuição da quimioluminescência e, portanto, a quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de $O_2^{\bullet-}$ produzida pela enzima xantina oxidase que não foram sequestrados pela amostra.

Figura 5. Representação esquemática da reação xantina/XOD/luminol



Fonte: Modificado de Ferreira e Rossi, 2002.

Por outro lado, a inibição da quimioluminescência também pode ocorrer por inibição da enzima xantina oxidase. (Girotti *et al.*, 2000; Pietta, 2000). Em função disso, as diluições do extrato também foram pré-incubadas com a enzima por 15 minutos antes da reação para avaliar se a enzima mantinha sua atividade inalterada no sistema xantina/XOD/luminol. Não foi observada diferença no IC_{50}, consequentemente não houve inibição enzimática direta pelo extrato.

Comparando os valores de IC_{50} encontrados no presente estudo com os da literatura, foi possível perceber que o extrato apresentou pronunciada atividade antioxidante para os métodos avaliados, o que é evidenciado quando compara-se o extrato, por exemplo, com a quercetina, que é um flavonóide que se destaca pelo seu alto poder antioxidante, principalmente devido à sua capacidade em eliminar radicais livres como $^{\bullet}OH$, peroxil e $O_2^{\bullet-}$. O valore de IC_{50} do extrato para o potencial de doação de hidrogênio ao radical $DPPH^{\bullet}$ é 1,6 vezes superior ao valor relatado para a quercetina (1,17 µg/mL), enquanto que para o sequestro do radical $O_2^{\bullet-}$, o extrato exibiu melhor atividade do que a quercetina (11,3 µg/mL), apresentando um valor de IC_{50} 30 vezes inferior (Casagrande *et al.*, 2006; Vicentini, 2007).

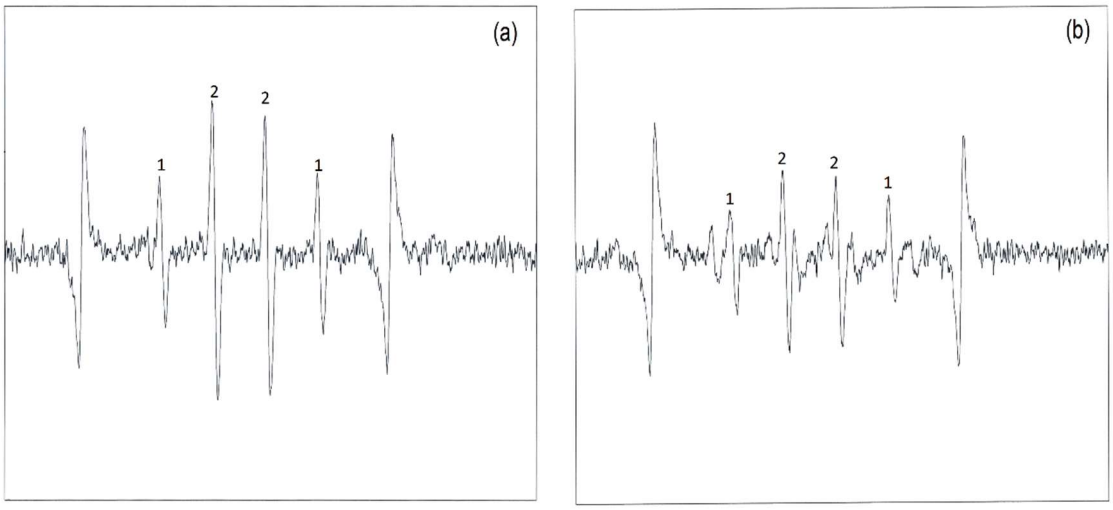
Além disso, o TPC, TFC do extrato são maiores e o IC_{50} ($DPPH^{\bullet}$) é menor do que os valores obtidos para vários outros extratos naturais (Balboa *et al.*, 2014; Kenny *et al.*, 2014) o que deve-se, provavelmente, ao processo de purificação parcial utilizado para o extrato, que concentra os metabolitos secundários.

As proteínas na pele podem ser oxidadas pelo $^1O_2$ gerado pela excitação de fotossensibilizadores induzidos pela radiação UVA. Ressonância de eletro spin ou ressonância paramagnetica eletrônica, é uma técnica utilizada para estudar espécies químicas que possuem um ou mais eletrons desemparelhados. O spin trap (captador de spin) é um composto que após reagir com o radical livre forma um composto mais estável, chamado de aduto de spin, podendo então ser medido por ressonância de eletro spin. Para avaliar a atividade antioxidante frente à produção de $^1O_2$, riboflavina foi utilizada como fotossensibilizador para gerar $^1O_2$ (Knak *et al.*, 2014) e TMPD foi usado como um reagente de captura do $^1O_2$. O TMPD reage com $^1O_2$ e gera o radical nitróxido, que é estável e detectado por ESR. O valor de IC_{50} encontrado para quercetina (0,83 µg/mL) foi 1,5 vezes maior do que o valor encontrado para o extrato (0,55µg/mL). A azida sódica, que é um forte inibidor do $^1O_2$, (Sedoud *et al.*, 2014) foi utilizada como padrão e apresentou IC_{50} de 3,05 µg/mL. Quando comparado com a azida sódica e com a quercetina, o valor

determinado para o extrato foi menor, o que indica um elevado potencial antioxidante do extrato de *C. obtusa*.

O ˙OH é um dos radicais livres mais reativos e um forte oxidante. Sua toxicidade *in vivo* depende fortemente do seu local de formação, já que sua elevada reatividade pode promover a reação com alvos biológicos críticos (López-Alarcón e Denicola, 2013). O DMPO é amplamente utilizado para sequestrar ˙OH em sistemas biológicos nos quais o complexo DMPO-OH tem um tempo relativamente longo de meia vida. DMPO-OH é representado no espectro de ESR como um grupo de 4 picos com a razão de 1: 2: 2: 1 (Fig. 6) e a intensidade do pico 2 foi utilizada para a quantificação da produção de ˙OH (Qi *et al.*, 2016).

Figura 6. Espectro ESR da produção de ˙OH após irradiação UVA (a) e na presença de 125 µg/mL do extrato de *C.obtusa* (b)



Vários solventes foram testados a fim de solubilizar o extrato sem interferir com a metodologia e o solvente com o melhor desempenho foi DMSO 0,3% (v/v). Para expressar a atividade antioxidante como IC_{50} a concentração das amostras precisaria ser aumentada e seria necessário usar uma concentração de DMSO maior, o que não foi possível devido à interferência no sinal. Assim, não foi possível determinar o IC_{50}, mas foi possível estimar a atividade antioxidante do extrato em relação a formação de ˙OH. A vitamina C foi utilizada como padrão e foi solubilizada da mesma forma que o extrato.

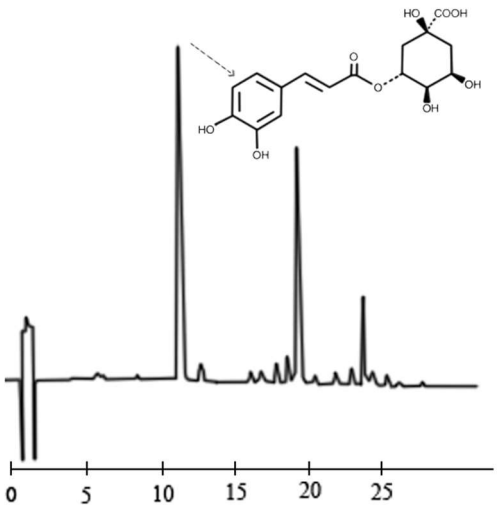
Como mostrado na Fig. 6, na presença de 125 µg/mL de extrato, a intensidade do pico 2 foi diminuída e a formação de ˙OH foi inibida em 35,48%, enquanto a vitamina C na mesma concentração foi capaz de inibir 100%. Mesmo em uma concentração 5 vezes menor, a vitamina C ainda inibiu a formação de ˙OH em 70,16%. Assim, o extrato foi

menos eficaz no sequestro do radical $^{\bullet}OH$ se comparado com o $^{1}O_2$, No entanto, quando comparado com outros extratos, o extrato de *C. obtusa* apresentou boa atividade antioxidante frente à formação de $^{\bullet}OH$ (Kim, Y.-S. *et al.*, 2014; Stamenic *et al.*, 2014; Cvetanovic *et al.*, 2015).

4.1.2 Identificação e quantificação dos componentes do extrato de *C. obtusa* por CLAE/UV e UFLC-DAD-MS/MS.

Até o momento não há descrito na literatura método analítico cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência para separação e quantificação dos componentes do extrato de *C. obtusa.* Costa et al. (2011) descreveram um método analítico por CLAE/DAD de separação e quantificação simultânea dos compostos majoritário (ácido clorogênico, isoorientina, orientina e isovitexina) presentes nas folhas de *Cecropia graziovié* e *Cecropia pachystachya.* Tomando por base as condições cromatográficas descritas por Costa et al. (2011), uma metodologia analítica foi desenvolvida para separação dos componentes do extrato de *C.obtusa,* cujo o perfil cromatográfico está apresentado na Fig. 7. Para o extrato de *C. obtusa*, três picos majoritários foram separados, enquanto Brango-Vanegas et al. (2014) encontram nove compostos majoritários para o extrato de *C. pachystachya.* A diferença em número de componentes majoritários pode ser devido a diferença entre as espécies ou entre os métodos de extração utilizados.

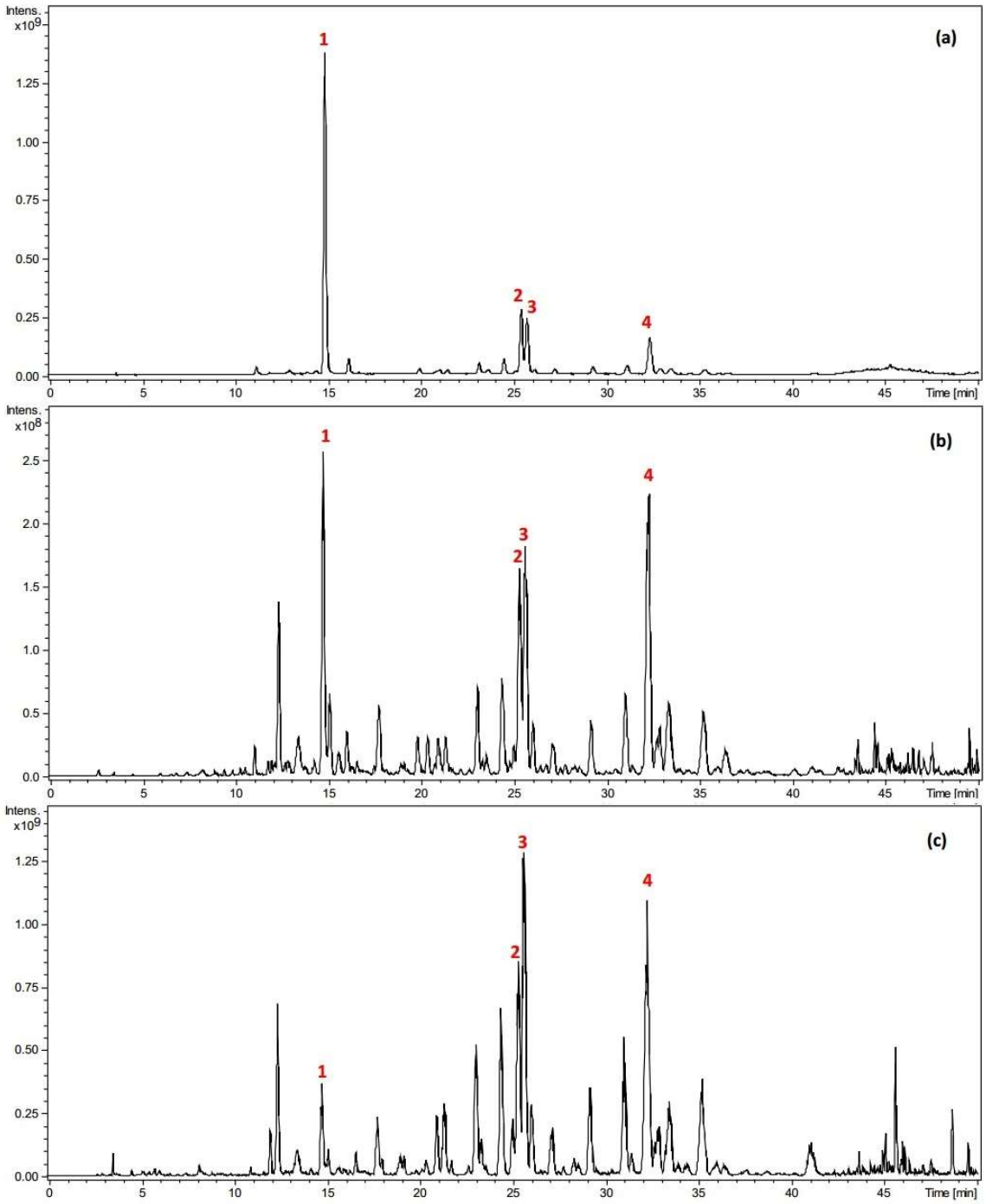
Figura 7. Perfil cromatográfico do extrato de *C. obtusa* por CLAE em 320 nm.



4.1.2.1 Identificação dos componentes por UFLC-DAD-MS/MS

A identificação dos constituintes foi sugerida por espectrometria de massas. A Fig. 8 apresenta os cromatogramas obtidos na análise do extrato de *C. obtusa*, com detecções em UV-320 nm (a), ESI-MS (modo negativo) (b). ESI-MS (modo positivo) (c).

Figura 8. Cromatogramas da análise do extrato de *C. obtusa*, com detecção em 320 nm (a), ESIMS (modo negativo) (b), ESIMS (modo positivo) (c).



A Tabela 4 apresenta a relação das substâncias identificadas, juntamente com os dados de absorção na região do ultravioleta e fragmentações.

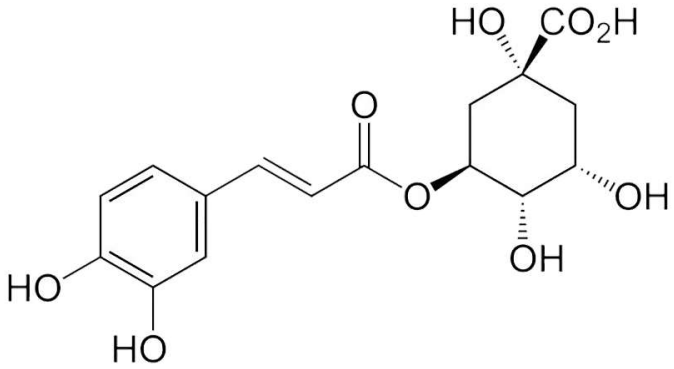
Tabela 4. Substâncias propostas no extrato de *C. obtusa* por LC-DAD-MS/MS

Pico	TR (min)	Substância/classe	UV (nm)	MN	MS/MS	MS	MS/MS
				Modo Negativo		Modo Positivo	
1	14.9	Ácido 3-O-cafeoilquínico	296.325	353 $[M-H]^-$	353→ 191	355$[M+H]^+$	355→ 163
2	25.4	Luteolina-C-hexosídeo	269.348	447$[M-H]^-$	447→ 429, 357, 327	449$[M+H]^+$	449→ 431, 383, 353, 329
3	25.7	Luteolina-C-hexose-O-desoxi-hexose	269.349	593$[M-H]^-$	593→ 473, 429, 357, 309	595$[M+H]^+$	595→ 449, 431, 383, 329
4	32.3	Apigenina-C-hexose-O-desoxi-hexose	269.337	577 $[M-H]^-$	577→ 457, 413, 340, 293	579$[M+H]^+$	579→ 433, 415, 367, 313

A análise cromatográfica do extrato por UFLC-DAD-MS/MS apresentou 4 picos majoritários, com tempos de retenção 14.9; 25.4; 25.7 e 32.3 minutos, contra três picos separados por CLAE/UV.

O pico (1) apresentou absorção na região do ultravioleta característicos de derivados cafeoilquínicos, com máximos em 296 e 325 nm. Além disso, apresentou *m/z* $[M-H]^-$ 353 e *m/z* $[M+H]^+$ 355, compatíveis com derivados monocafeoilquínicos. Estes derivados possuem o perfil de fragmentação bem definidos na literatura (Clifford *et al.*, 2003). O pico (1) foi identificado como ácido 3-O-cafeorilquínico (ácido clorogênico, Fig. 9), baseado no seu perfil de fragmentação aliado à co-injeção de padrão autêntico. Esta substância já foi descrita no gênero (Andrade-Cetto e Wiedenfeld, 2001; Mora Izquierdo *et al.*, 2011; Nicasio-Torres *et al.*, 2012; Brango-Vanegas *et al.*, 2014; Gazal *et al.*, 2015). A quantidade de ácido clorogênico no extrato de *C. obtusa* foi de aproximadamente 54 mg/g, enquanto que para *C. pachystachya* foi de 27,2 mg/g (Gazal *et al.*, 2015).

Figura 9. Estrutura do ácido 3-O-cafeorilquínico (ácido clorogênico).



O pico (2) apresentou absorção na região do ultravioleta característica de flavonas com duas hidroxilas no anel B, com máximos em 269 e 348 nm. O espectro de massas apresentou o íon *m/z* $[M-H]^-$ 447 e o perfil de fragmentação, no espectro de MS/MS foi similar ao de mono-C-hexosilflavona, com perdas de 90 u. e 120 u. (*m/z* 357 e 327, respectivamente). Estes dados tornam possível inferir tratar-se de luteolina-C-heterosídeo. Já foram identificados no gênero Cecropia os flavonoides luteolina-8-C-glicosídeo (orientina) e lutelina-6-C-glicosídeo (isorientina) (Oliveira *et al.*, 2003; Chanmahasathien *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013). É importante notar que a presença do íon fragmento *m/z* 429 ocorre apenas em luteolina-6-C-glicosídeo (Breiter *et al.*, 2011).

O pico (3) apresentou absorção na região do ultravioleta similar ao pico (2), com máximos em 269 e 349nm, indicando tratar-se de flavona. O espectro de massa apresentou o íon *m/z* $[M+H]^+$ 595, indicando a presença de uma unidade adicional de desoxi-hexose na estrutura (146u.) em relação à substância descrita anteriormente. O espectro de MS/MS (modo positivo) apresentou o íon *m/z* 449 (perda de desoxi-hexose), indicando estar ligada através de uma ligação O-heterosídica. Os outros íons (*m/z* 431, 383 e 329) foram similares àqueles apresentados no espectro de MS/MS da substância referente ao pico (2). Portanto, trata-se de luteolina-C-hexose-O-desoxi-hexose.

O pico (4) apresentou absorção na região do ultravioleta com máximos em 269 e 337 nm, compatível com espectro de flavona mono-hidroxilada no anel B. O espectro de massas apresentou o íon *m/z* $[M+H]^+$ 579. O espectro de MS/MS (modo positivo) apresentou o íon fragmento *m/z* 433 $[M+H.146]^+$ (referente à perda de desóxi-hexose). Além disso, os íons 415, 367, 313 indicam apigenina-C-hexosídeo. Portanto, trata-se de apigenina-C-hexose-O-desoxi-hexose. Já foram relatados no gênero a presença de apigenina-C-heterosídeos, tais como apigenina-8-C-glucopiranosídeo (vitexina) e apigenina-6-C-glucopiranosídeo (isovitexina). Apigenina-6-C-galacttosil-6”-o-b-galactopiranosídeo, um outro heterosídeo da apigenina, foi isolada de *C. lyratiloba* (Oliveira *et al.*, 2003).

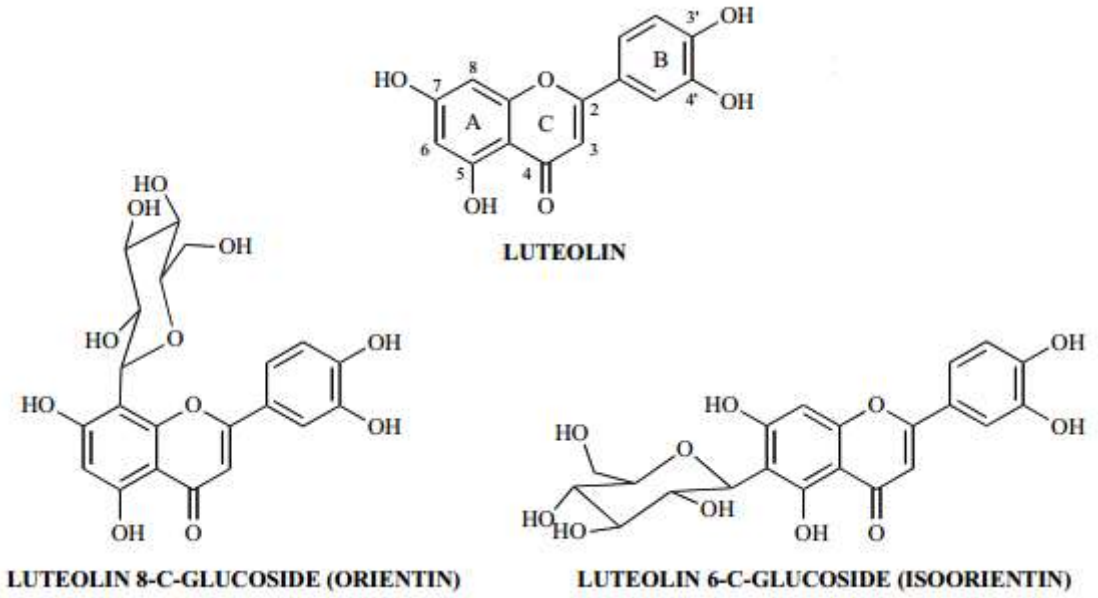
Os 4 picos majoritários identificados, possuem tempos de retenção de 14.9; 25.4; 25.7 e 32.3 minutos. Os tempos de retenção variaram ligeiramente dos tempos de retenção da metodologia por CLAE. Essa variação não inviabiliza a detecção por CLAE, e para confirmar o pico do ácido clorogênico, realizou-se a co-eluição com padrão autêntico, na qual observou-se aumento da área do pico 1, sem nenhuma alteração nos outros picos. Essa diferença de tempos de retenção pode ser devida à diferença entre os equipamentos utilizados.

Conforme observado na Fig. 9, ocorre a co-eluição dos picos 2 e 3, referentes à luteolina-C-hexosídeo e à luteolina-C-hexose-O-desóxi-hexose, respectivamente. Essas substâncias diferenciam-se entre si apenas por uma desóxi-hexose e mesmo com modificações no método por CLAE, não foi possível separar os picos para as fases móvel e estacionária utilizadas.

Certas especificidades fazem com que alguns flavonoides sejam mais antioxidantes do que outros. Como exemplo pode-se citar a presença de um grupo catecol no anel B, que atua doando um hidrogênio/elétron para estabilizar radicais livres. Além disso, a presença de uma dupla ligação em C2-C3 juntamente com um grupo carbonil em C4 favorece à ligação de metais de transição, como ferro e cobre (Fig.10). Esses mecanismos, dentre outros, explicam a atividade antioxidante da luteolina e vários de seus glicosídeos (Lopez-Lazaro, 2009).

A luteolina e seus glicosídeos possuem ampla atividade e podem atuar em diferentes vias antioxidantes. Dentre elas pode-se citar o sequestro de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio; a inibição de enzimas pro-oxidantes e a indução de enzimas antioxidantes, além da quelação de metais de transição, que são potenciais indutores da reação de Fenton.

Figura 10. Estrutura dos Flavonóides Luteolina, Orientina e Isoorientina.



Fonte: Modificado de Lopez-Lazaro, 2009.

A luteolina e seus glicosídeos possuem atividade antioxidante bem descrita na literatura. Deepha et al. (2014) recentemente demonstraram que o flavonóide isoorientina possui pronunciada atividade antioxidante, sendo esta superior à demonstrada pela aglicona luteolina. Através da teoria funcional da densidade os autores conseguiram avaliar o comportamento eletrofílico e nucleofílico da luteolina e da isoorientina, demonstrando a maior

atividade antioxidante da segunda substância. Isso deve-se ao fato de a energia de dissociação da ligação e o potencial de ionização no anel B serem baixos, o que facilita a retirada do átomo de hidrogênio do grupamento hidroxil, resultando em um maior potencial antioxidante.

Chen et al. (2013) demonstraram a atividade de uma pomada contendo 1% de ácido clorogênico. Constatou-se a diminuição da ferida, aumento da proliferação celular, aumento do TNF-α, e elevação da síntese de colágeno tipo IV. Além disso, houve também o aumento de atividade das enzimas SOD, CAT e GPx e diminuição da peroxidação lipídica. Apesar de a aplicação tópica ter ocorrido em uma pele machucada, que consequentemente não possui sua constituição original, é possível que esse efeito seja observado quando a aplicação tópica seja realizada em uma pele intacta, e veiculado em uma formulação que propicie uma adequada penetração do ácido clorogênico.

Kim et al. (2005) isolaram vitexina do extrato de *Acer palmatum* e demonstraram que na concentração de 100μg/mL, a substância foi capaz de inibir a formação dos radicais DPPH e superóxido em 60% e 70%, respectivamente. Além disso a substância também foi capaz de inibir a oxidação do diacetato de 5-(6-)clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceina em cultura de células de fibroblasto humano após irradiação UVB. Esses resultados, apesar de preliminares, indicam que a substância pode ter satisfatória ação antioxidante *in vivo*. Os dados apresentados na Tabela 3 indicam que o extrato de *C. obtusa* possui atividade superior ao composto vitexina isolado.

Outros estudos avaliaram por diferentes metodologias o potencial antioxidante das substâncias isoorientina, orientina e vitexina e todos demonstraram que essas substâncias possuem relevante atividade antioxidante (Lin *et al.*, 2002; An *et al.*, 2012), assim como foi apresentado para o extrato de *C. obtusa*.

4.1.2.2 Validação do método analítico e quantificação dos componentes do extrato por CLAE/UV

O método analítico cromatográfico usado para obtenção do perfil cromatográfico do extrato (Fig. 7) foi validado quanto a sua linearidade usando diferentes concentrações do extrato e do padrão ácido clorogênico. A separação dos picos apresentou boa resolução e separação, sendo o tempo retenção em minutos ± erro padrão: 10,17 ± 0,60, 19,72 ± 0,34 e 24,07 ± 0,38, respectivamente para os picos 1, 2 e 3. A precisão inter-dia foi determinada através da avaliação das áreas dos picos e seus respectivos coeficientes de variação nas concentrações de 5, 25 e 125 μg/mL foram avaliados em triplicata.

A) Linearidade

A linearidade é a habilidade de obter resultados, neste caso expressos pela área do pico, que são diretamente proporcionais a concentração da amostra (Ich-Q2(R1), 2005). Curvas de calibração foram construídas plotando-se, no eixo das abscissas, as concentrações das soluções de cada padrão e no eixo das ordenadas as áreas dos picos. O método analítico foi linear para o intervalo de concentração de 1 a 50 µg/mL para o ácido clorogênico e de 5 a 125 µg/mL para os picos do extrato. As equações da regressão linear foram calculadas na forma de y = ax + b, onde y e x são a área do pico e a concentração (µg/mL), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Equação da regressão linear, valores do coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (%) da metodologia analítica desenvolvida por Cromatografia Líquida.

Compostos	Equação da regressão linear	Coeficiente de determinação (R^2)	Coeficiente de variação dos fatores de respostas (%)
Pico 1	y = 2200,5x + 6359,2	0,9935	6,06
Pico 2	y = 1046,5x + 10,136	0,9998	6,02
Pico 3	y = 442,4x – 243,94	0,9993	5,30
Ácido clorogênico	y= 35308x – 3759,8	0,9997	6,28

B) Precisão

Para a avaliação da precisão foram utilizadas as concentrações de 5µg/mL 25µg/mL e 125 µg/mL em triplicata para avaliar o coeficiente de variação CV das áreas dos picos (Tabela 6). Para o pico 1 (Fig. 7), identificado como ácido clorogênico, empregou-se a equação da reta obtida para a curva de calibração do ácido clorogênico, possibilitando a determinação da concentração do mesmo.

Os coeficientes de variação calculados a partir dos dados das áreas dos picos para o método analítico variaram de 3,12% a 4,51%. Estes valores estão de acordo com estabelecido pela ANVISA para a precisão de métodos analíticos cromatográficos para misturas complexas, que aceita CV igual ou inferior a 5% (BRASIL. ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

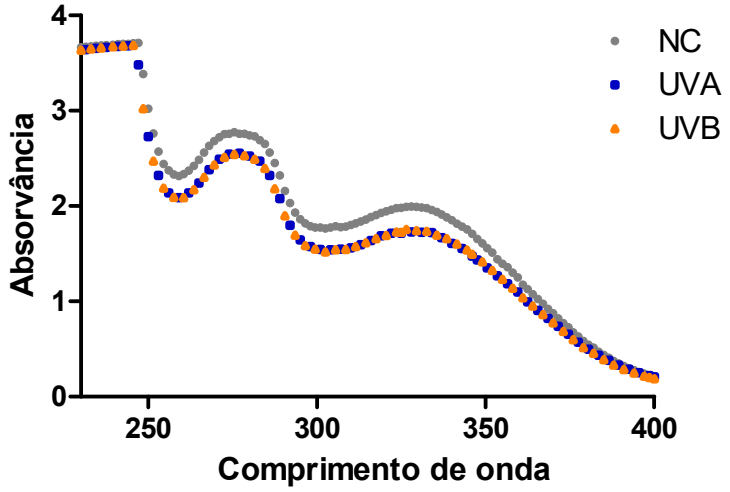
Tabela 6: Precisão do método analítico cromatográfico por CLAE expresso em função da área do pico ± erro padrão e Coeficiente de Variação (CV)

[Extrato]	Parâmetro	Pico 1	Pico 2	Pico 3
5 µg/mL	Área do Pico	12907 ± 1796	4569 ± 771	2059 ± 381
	CV (%)	4,15	3,42	3,12
25 µg/mL	Área do Pico	56289 ± 7998	25685 ± 3735	9803 ± 1253
	CV (%)	4,06	3,97	4,51
125 µg/mL	Área do Pico	287911 ± 41990	131122 ± 19368	13185 ± 7612
	CV (%)	4,19	3,90	4,13

4.1.3 Avaliação da fotoestabilidade e determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

O teste foi realizado para avaliar a fotoestabilidade do extrato para os ensaios em cultura de célula. As soluções de extrato não irradiadas ou expostas à radiação UVA ou UVB foram analisadas por espectrofotometria. Na Fig. 11 estão ilustrados os perfis de absorção do extrato não irradiado (NC), irradiado no UVA (4J /cm^2) e irradiado no UVB (0,02J /cm^2).

Figura 11. Espectro de absorção na região do UV da solução do extrato de *C. obtusa* na concentração de 0,2 mg/mL antes (NC) e após sua exposição às radiações UVA e UVB.



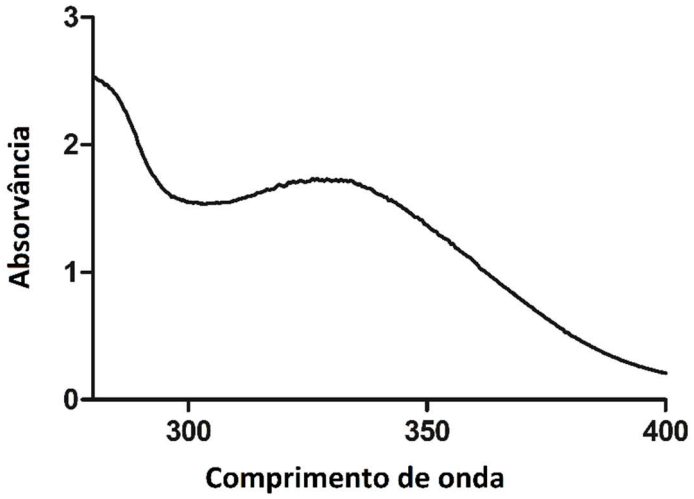
NC: solução do extrato não irradiada; UVA: solução exposta à radiação UVA (4J/cm2); UVB: solução exposta à radiação UVB (0,02 J/cm2).

Considera-se um protetor solar fotoestável quando a razão da área sob a curva da solução irradiada pela área sob a curva da solução não irradiada é ≥ 0,8 (Gonzalez *et al.*, 2007). Portanto, podemos considerar que o extrato estudado é fotoestável frente as quantidades das radiações

UVA e UVB que foram utilizadas nos testes em cultura de célula, uma vez que a razão encontrada foi 0,93 quando irradiado no UVA e 0,92 quando irradiado no UVB (Fig.6).

O espectro de absorção (Fig. 12) mostrou a capacidade do extrato de absorver a radiação, especialmente UVB (280-320 nm) e UVA-II (320-340 nm). Assim, determinação do FPS e a metodologia de fotoproteção foram empregadas para avaliar se o extrato teria realmente a capacidade de absorver a radiação UV, além de ser capaz de reduzir o estresse oxidativo. Esta era uma característica desejada, uma vez que o extrato seria um bom candidato para ser incorporado em formulações contendo filtros para exibir duas funções: melhorar o espectro de absorção da formulação e proteger contra o dano oxidativo, causado principalmente pelo UVA-I (340 -400).

Figura 12. Espectro de absorção na faixa de 280 a 400 nm da solução metanolica do extrato de *C. obtusa* de 0,2 mg/mL.



O FPS estimado por espectrofotometria avalia o fator de proteção de acordo com a altura, largura e localização da curva de absorção da substância dentro do espectro ultravioleta (MANSUR et al., 1986). O FPS avaliado para o extrato de *C. obtusa* foi de 16 e foi considerado um valor alto quando comparado a outros extratos naturais (Gupta, 2013; Malsawmtluangi *et al.*, 2013), e além disso, pode ser correlacionado com o alto conteúdo de polifenóis totais (Stevanato *et al.*, 2014).

4.2 Avaliação da fotoquimioproteção em cultura de células

4.2.1. Avaliação da Fotoproteção

O ensaio de fotoproteção é uma alternativa às metodologias espectrofotométricas para fazer um screening de substâncias fotoprotetoras. Neste tipo de experimento é possível

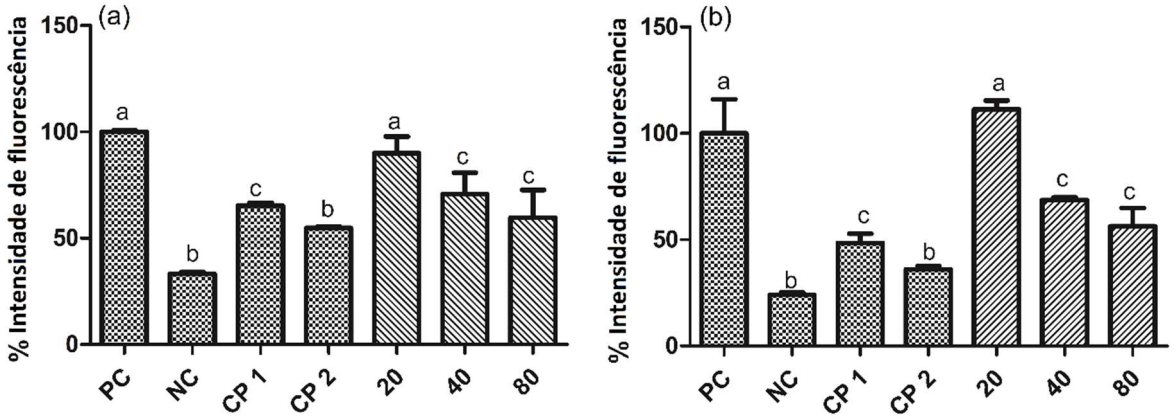
avaliar a absorvância/transmitância de uma substância considerando o efeito biológico causado pela radiação UV. A formação de EROs em cultura de células foi a metodologia escolhida para avaliar o dano induzido pela radiação por ser uma metodologia fácil e reprodutível, e porque tanto UVA como UVB são capazes de estimular a produção de EROs.

O $DCFH_2$-DA é um composto não fluorescente com capacidade de atravessar a membrana celular devido ao seu caráter apolar. No interior das células viáveis, por ação das estearases, ocorre a desacetilação da molécula, resultando no composto polar 2′,7′-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que é não fluorescente e estável dentro da célula por algumas horas. A DCFH reage quantitativamente com espécies reativas geradas pela radiação (espécies oxidantes que possuam um elétron desemparelhado, como os radicais $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$, e aqueles gerados durante a lipoperoxidação), como também pode reagir com o peróxido de hidrogênio H_2O_2 que não é um radical, mas é altamente oxidante. A reação da sonda com espécies reativas radicalares e não radicalares leva a geração de um composto fluorescente (DCF) (Jiménez, 2004; Kalyanaraman *et al.*, 2012). Assim, a diminuição da fluorescência ocorre devido à capacidade de absorção da radiação pelo extrato, levando à uma menor formação de radicais.

Propilenoglicol, o solvente utilizado para solubilizar o extrato, foi testado e não demonstrou capacidade de absorção na região de 290 a 400 nm. A capacidade de absorção das soluções do extrato foi comparada a dois protetores solares comerciais diferentes. O produto comercial CP 1 constava como FPS 15 e CP 2 como FPS 30. Foram testadas três concentrações diferentes do extrato para a radiação UVA e UVB (Fig. 13).

Para as radiações UVA e UVB, não houve aumento significativo na fotoproteção para a concentração maior que 40 mg/mL, o que indica que o extrato atingiu seu efeito fotoprotetor máximo. Além disso, para ambas as radiações, o extrato mostrou a mesma proteção do que o CP 1, o que corrobora o FPS obtido na metodologia de FPS *in vitro* discutida anteriormente.

Figura 13. Fotoproteção oferecida pelo extrato de *C. obtusa* e por protetores solares representada pela intensidade de fluorescência gerada pelo DCF em células HaCaT frente às radiações UVA - 4J/cm^2 (a) e UVB - 0,02J/cm^2 (b)



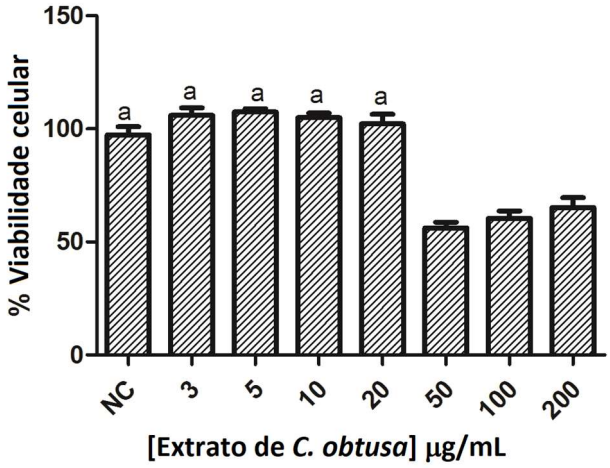
PC: Controle positivo, NC: controle negativo, CP: produto comercial. Concentrações do extrato expressas em mg/mL. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). Mesmas letras significam que a média não foi diferente estatisticamente após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

4.2.2 Citotoxicidade- ensaio de captura do corante vermelho neutro

A citotoxicidade pode ser avaliada pela medida da viabilidade celular. O ensaio de citotoxicidade pelo método do vermelho neutro é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis não danificadas (Borenfreund *et al.*, 1988). O corante vermelho neutro passa através da membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares resultando no decréscimo da captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre as células viáveis e as danificadas através da medida da intensidade da coloração do meio (Rogero *et al.*, 2003). Na Fig. 14 está demonstrada a viabilidade das células HaCaT frente a diferentes concentrações do extrato.

A concentração de 20 μg/mL foi escolhida como concentração máxima a ser utilizada nos testes em cultura de células, visto que essa foi a máxima concentração a proporcionar 100% de viabilidade celular.

Figura 14. Viabilidade das células HaCaT após tratamento com diferentes concentrações do extrato de *C. obtusa*.



NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). ª Média não foi diferente estatisticamente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Após 24 horas de exposição a concentrações de extrato superiores a 20 µg/mL, a viabilidade celular não diminuiu abaixo de 50%, e mesmo após o tratamento com concentrações superiores a 50 µg/mL não houve perda adicional de viabilidade, que se manteve em 50%. Pode-se perceber também que os IC_{50} dos métodos antioxidantes abordados no ítem 4.1 estão abaixo da concentração de 20 µg/mL, o que viabiliza a potencial aplicabilidade do extrato como fotoquimioprotetor.

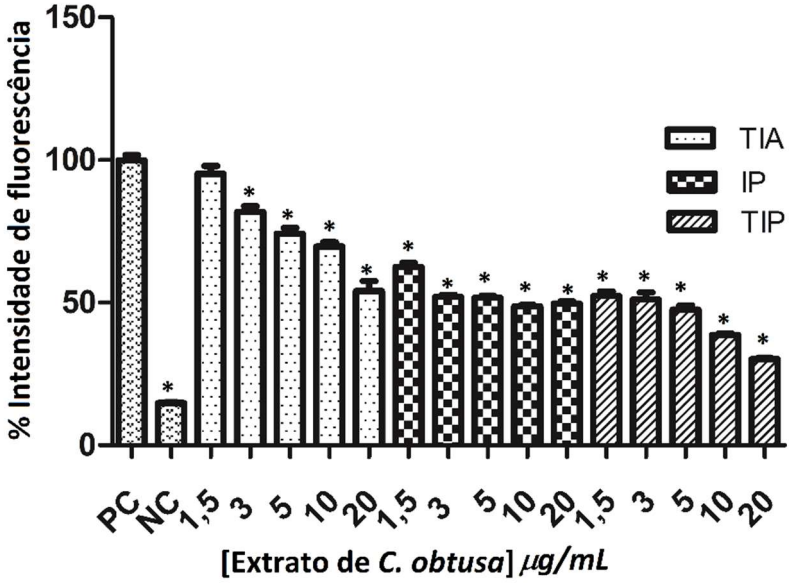
4.2.3 Avaliação da atividade sequestradora de EROs intracelular

Neste experimento, a diminuição da fluorescência ocorre devido à capacidade dos componentes do extrato em sequestrar os radicais formados. Assim, a intensidade de fluorescência relativa ao sequestro das EROs intracelular formadas após irradiação UVA estão representados na Fig. 15. O grupo TIA não obteve relevante diminuição da formação de EROs, enquanto que as células irradiadas na presença do extrato foram capazes de inibir aproximadamente 50% da formação das EROs, independente da concentração e independentemente de terem sido ou não tratadas por 24 horas.

TIA foi o único grupo a exibir um padrão dose-resposta. Para este grupo, 20 µg/mL inibiu cerca de 50% da intensidade de fluorescência quando comparado com o PC, enquanto que a concentração mais baixa não foi capaz de proteger da formação de EROs. O grupo TIP em 20 µg/mL inibiu 70% da intensidade de fluorescência quando comparada com PC e mesmo a menor concentração testada foi capaz de proteger em 50% da formação

de EROs. Tanto para o TIA como para o TIP, o efeito protetor poderia ter sido devido às substâncias presentes no extrato, que poderiam ter penetrado nas células durante o período de tratamento de 24 horas. Quando dentro da célula, estas substâncias seriam capazes de eliminar os radicais livres, evitando a oxidação do DCFH. É também possível que o tratamento com o extrato tenha diminuído a formação de EROs devido a um aumento na atividade das enzimas CAT, SOD e GPx (Van Reyk *et al.*, 2001).

Figura 15. Intensidade de fluorescência gerada pelo DCF em células HaCaT expostas à radiação UVA (4J/cm^2) e tratadas com soluções do extrato *C. obtusa*



Células foram irradiadas na presença do extrato (IP), ou pré tratadas com o extrato e irradiadas na presença (TIP) ou na ausência (TIA) do extrato. PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). * Média foi estatisticamente diferente do PC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Como para o grupo TIP as células foram irradiadas na presença do extrato, o efeito observado também poderia ter sido devido à capacidade do extrato em absorver a radiação UV, mesmo em concentrações baixas. Para confirmar essa hipótese, foi testado um grupo que não foi tratado e foi somente irradiado na presença do extrato (IP).

Para IP todas as concentrações apresentaram cerca de 50% de inibição quando comparadas ao PC, o que confirmou que o extrato é capaz de absorver radiação UVA mesmo em pequenas concentrações, apresentando, portanto, efeito fotoprotetor. Conforme observado na Fig. 14, um aumento na concentração não resulta necessariamente no

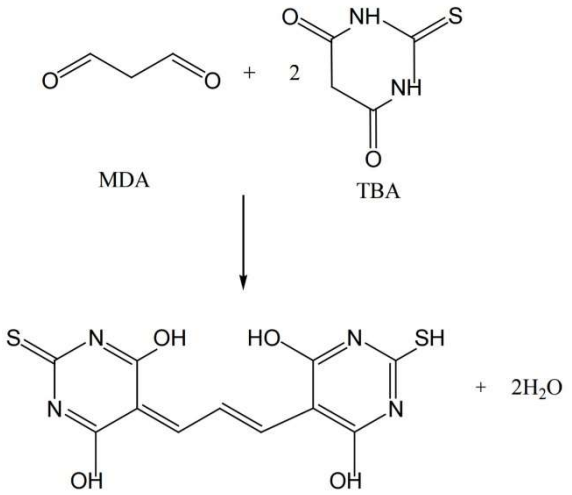
aumento da absorção da radiação, o que se correlaciona com o padrão exibido pelo grupo IP, o que demonstra que o extrato possui um máximo de absorção da radiação.

Todos os três tratamentos reduziram a formação de EROs, porém nenhum deles foi capaz de retornar a formação de EROs ao nível do NC. Uma vez que o grupo IP confirmou o efeito fotoprotetor do grupo TIP, para avaliar o efeito protetor contra o estresse oxidativo e este efeito juntamente com o efeito fotoprotetor, as análises dos marcadores do estresse oxidativo em cultura de células realizadas posteriormente foram feitas com grupos TIA e TIP em 20, 10 e 5 µg/mL, que foram as concentrações que apresentaram a maior proteção.

4.2.4 Quantificação do nível de peróxidos lipídicos

Tanto $^1O_2$ quanto $HO^{\bullet}$ podem iniciar o processo de peroxidação lipídica de membranas celulares. Este processo gera subprodutos mutagênicos e carcinogênicos e não pode ser reparado (Akazawa-Ogawa *et al.*, 2015). Os peróxidos lipídicos tendem a acumular-se nas membranas celulares proporcionalmente à dose de radiação recebida, o que pode perturbar a integridade das membranas e, portanto, das células envolvidas. Os peróxidos lipídicos podem ainda ser decompostos em várias espécies reativas de aldeídos, como o MDA (Kammeyer e Luiten, 2015). O ensaio TBARS envolve a reação de produtos secundários da peroxidação lipídica com o TBA sob forte condição acídica e sob aquecimento, o que conduz à formação do complexo cor-de-rosa MDA-TBA (Fig. 16), que pode ser medido por métodos fluorométricos (Niki, 2014). O tetraetoxipropano foi utilizado para elaboração da curva padrão, visto que este sofre hidrólise devido ao meio ácido e libera MDA.

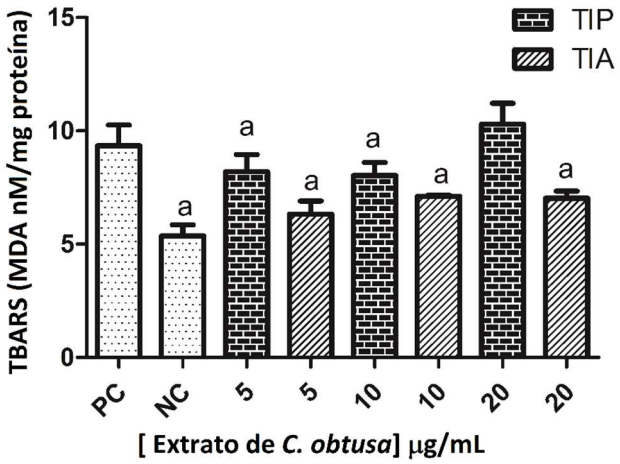
Figura 16. **Esquema da reação de formação do complexo malondialdeído (MDA)- ácido tiobarbitúrico (TBA)**



Fonte: Yahyavi, Kaykhaii et al. 2016.

O aumento da peroxidação lipídica e a consequente formação de MDA devido à radiação UVA, e o efeito protetor do extrato de *C.obtusa* são mostrados na Fig. 17. A radiação UVA aumentou a formação de MDA e o tratamento com o extrato protegeu contra os danos causados pelo processo de irradiação. Todas as concentrações foram capazes de proteger contra a peroxidação lipídica, exceto TIP em 20 µg/mL. Para esta concentração, os tratamentos tiveram desempenhos diferentes, uma vez que o grupo TIA protegeu e o TIP não protegeu contra a formação de MDA.

Figura 17. Aumento da quantidade de MDA formada em células HaCaT devido à radiação UVA (4J/cm^2) e proteção oferecida pelo extrato de *C.obtusa*



Células foram pré tratadas com o extrato de *C. obtusa* e irradiadas na presença (TIP) ou na ausência (TIA) do extrato. PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). ª Média não foi estatisticamente diferente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

É amplamente discutido que o estresse oxidativo induzido pelas EROs está relacionado com o aumento da peroxidação lipídica, portanto, era esperado que o grupo que exibiu melhor proteção contra a formação de EROs também exibisse melhor proteção contra o estabelecimento da peroxidação lipídica. Para o experimento de EROs, TIP foi o grupo mais eficaz na diminuição da formação de EROs, e a proteção melhorou com o aumento da concentração, sendo 20 µg/mL a concentração que apresentou maior proteção. Contrariamente, no ensaio de TBARS, a maior concentração testada não foi capaz de diminuir a formação de MDA e houve uma tendência de TIA em apresentar melhor proteção.

O fato do tratamento TIP ter sido menos efetivo que o TIA, principalmente na concentração de 20 µg/mL poderia ser explicado por uma possível fotoinstabilidade de um componente ou mais componentes do extrato frente à radiação UVA. Os dados da Fig. 11

mostram que a exposição do extrato às radiações UVA e UVB levou ao decréscimo da absorção do extrato na faixa de 280 nm a 400 nm, e a razão entre as áreas sob as curvas das soluções irradiadas e não irradiadas foi maior que 0,8. Portanto, o extrato foi considerado fotoestável segundo o critério estabelecido por Gonzalez, Tarras-Wahlber et al. (2007). Porém, houve um decréscimo da absorção do extrato, principalmente na faixa do UVA, o que pode sugerir a fotodegradação de algum componente. O produto da fotodegradação pode ter conduzido a um efeito pró-oxidante observado para o extrato na concentração de 20 µg/mL, mas só no tratamento TIP, pois nesse tratamento as células foram irradiadas na presença do extrato. Possivelmente este efeito foi observado para a concentração 20 µg/mL, já que nessa concentração a quantidade de fotoproduto gerada pode ter sido maior. Os resultados obtidos nos estudos de fotoestabilidade por medida da absorção e pela avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica do extrato em cultura de célula HaCaT, mostraram que avaliação da fotoestabilidade e da eficácia de extratos devem ser realizadas sempre por diferentes ensaios.

4.2.5 Avaliação quantitativa da glutationa reduzida

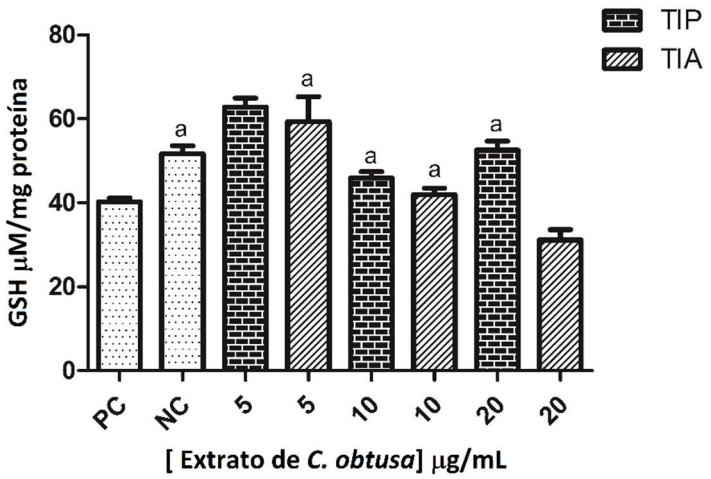
O GSH, forma reduzida da glutationa, reduz o peróxido de hidrogénio e outras formas de EROs e com o auxílio de enzimas como a GPx, é oxidado e forma a glutationa dissulfeto (GSSG) (Kim, S. *et al.*, 2014).

Além de atuar como substrato para a GPx e catalisar a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, o GSH também participa em reações redox por oxidação reversível de seu grupo tiol ativo. O resíduo cistenilglicina pode reagir com um elétron não pareado de um radical livre formando o radical $GS^{\bullet}$, que por dimerização produz o GSSG (Huber *et al.*, 2008).

Na presença do estresse oxidativo, a concentração do GSH decresce rapidamente enquanto o GSSG, altamente citotóxico, aumenta. Desta forma, o status redox da célula muda e ativa elementos transcricionais de resposta oxidante. O GSSG pode ser reduzido de volta ao GSH, pela ação da glutationa redutase, que é uma enzima NADPH dependente. O GSSG também pode ser secretado da célula e degradado extracelularmente, o que resulta em uma diminuição no teor de glutationa celular, e aumenta o requerimento celular para síntese de novo GSH (Kim, S. *et al.*, 2014).

A depleção do GSH contribui para o envelhecimento celular da pele e o teor de GSH indica não apenas a capacidade antioxidante das células, mas também o grau de estresse oxidativo exercido nas células. A depleção do GSH induzido pela radiação UVA e o efeito do extrato de *C. obtusa* sobre essa depleção são mostrados na Fig. 18.

Figura 18. Quantidade de GSH gerada em células HaCaT expostas à radiação UVA (4J/cm²) e tratadas com extrato de *C.obtusa*



Células foram pré tratadas com o extrato de *C. obtusa* e irradiadas na presença (TIP) ou na ausência (TIA) do extrato. PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). ª média não foi diferente estatisticamente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Sabe-se que o GSH auxilia na remoção de EROs, portanto, desempenha um papel crítico na manutenção do balanço redox intracelular e mantem, consequentemente a homeostase na pele. Em nosso experimento, o extrato de *C. obtusa* foi capaz de proteger a célula da depleção do GSH induzida pela radiação UVA, quando utilizado nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL no tratamento TIP. No tratamento TIA, o extrato nas concentrações 5 µg/mL e 10 µg/mL teve eficiência similar à obtida no tratamento TIP, no entanto, o extrato na concentração 20 µg/mL não protegeu a célula contra a depleção do GSH induzida pela radiação UVA. Em adição, o extrato na concentração 5µg/mL foi mais eficiente na proteção da célula contra a depleção do GSH do que quando utilizado nas concentrações 10 µg/mL e 20 µg/mL.

Como observado na Fig. 15, o extrato, além de ser capaz de sequestrar EROs, também absorve a radiação UVA. Assim, o extrato pode proteger a célula da depleção do GSH induzida pela radiação UVA por dois mecanismos, impedindo a formação das EROs pelo sequestro direto das mesmas por componentes do extrato no interior da célula, ou pela diminuição da formação das EROs devido à absorção da radiação pelo extrato. No tratamento TIP, a célula é tratada com o extrato por 24 horas e exposta à radiação na presença do extrato, portanto, nesse tratamento podem ocorrer os dois mecanismos. Enquanto que no tratamento TIA, onde as células são tratadas por 24 horas com o extrato e irradiadas na ausência deste, o efeito protetor só ocorre pelo sequestro das EROs. A

proteção máxima proporcionada pelo extrato contra a depleção do GSH ocorreu na concentração 5µg/mL nos dois tratamentos. A pequena diferença de proteção entre os dois tratamentos sugere que nessa concentração o extrato não foi eficiente em absorve a radiação UVA, portanto, nos dois tratamentos o mecanismo foi principalmente por sequestro de EROs. A eficiência do extrato na concentração 10 µg/mL foi igual para os dois tratamentos, mas foi menor do que aquela obtida para 5 µg/mL. Assim, a concentração de 10 µg/mL ainda não foi suficiente para absorver a radiação UVA de modo a auxiliar o extrato no seu efeito contra a depleção do GSH.

Quando o extrato foi empregado na concentração de 20 µg/mL, assim como observado na peroxidação lipídica, houve diferença entre os tratamentos TIP e TIA na proteção da célula contra a depleção do GSH. O extrato no tratamento TIA não protegeu a célula contra a depleção do GSH, e a quantidade de GSH foi menor do que o PC, enquanto que no tratamento TIP o conteúdo de GSH foi igual ao conteúdo NC. Isto é o tratamento TIP foi capaz de retornar o conteúdo de GSH, que havia sido diminuído pela radiação, ao nível basal. O extrato na concentração de 20 µg/mL pode ter sido capaz de absorver em parte a radiação UVA, o que não aconteceu quando as concentrações 5 µg/mL e 10 µg/mL foram empregadas. Desta forma, no tratamento TIP com o extrato a 20 µg/mL os dois mecanismos podem estar envolvidos, absorção e sequestro de radicais intracelular. Isto explicaria a maior quantidade de GSH quantificada nas células tratadas com 20 µg/mL do que com 10 µg/mL. Por outro lado, no tratamento TIA com 20 µg/mL a quantidade de GSH determinada na célula foi menor do que a quantidade basal deste antioxidante endógeno. Isto ocorreu, provavelmente, porque a célula foi irradiada na ausência de extrato, portanto, o mecanismo de proteção por absorção da radiação pelo extrato não ocorreu, e a quantidade de componentes do extrato vegetal no interior da célula pode ter sido maior que aquelas obtidas nas concentrações do extrato de 5 µg/mL e 10 µg/mL, o que poderia ter gerado maior quantidade de produtos da fotodegradação dos componentes do extrato no interior da célula exposta à radiação na ausência de extrato. Os produtos da fotodegradação podem exercer um efeito oxidante ou inibidor de enzimas importantes para recuperação do GSH. No caso da inibição da glutationa redutase, teria havido o impedimento da redução do GSSG para GSH. Caso a GPx tenha sido inibida, pode ter havido uma diminuição da redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos, aumentando o estresse oxidativo e, consequentemente, o aumento do consumo do GSH.

Os resultados obtidos mostraram que o extrato na concentração de 5µ/mL seria seguro para células HaCaT quando expostas à radiação UVA, tanto na presença do extrato

quanto na sua ausência, após ter sido tratada por 24 horas com o extrato. Esses resultados não contradizem aqueles obtidos com os estudos de citotoxicidade, que mostraram ausência da perda da viabilidade quando a célula HaCaT foi tratada com o extrato nas concentrações de 3 µg/mL a 20 µg/mL. Isto porque nos estudos de citotoxicidade o extrato não foi exposto à radiação.

Mais do que evitar o estabelecimento do dano oxidativo, TIP em 5 µg/mL aumentou o conteúdo de GSH acima do nível basal. Houve uma tendência em aumentar a proteção à medida que a concentração diminuiu, o que demonstra que o extrato é altamente ativo e as suas concentrações eficazes são muito baixas, cerca de 10 µg/mL e 5 µg/mL. Estes resultados sugerem que o extrato de *C. obtusa* é capaz de diminuir o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA.

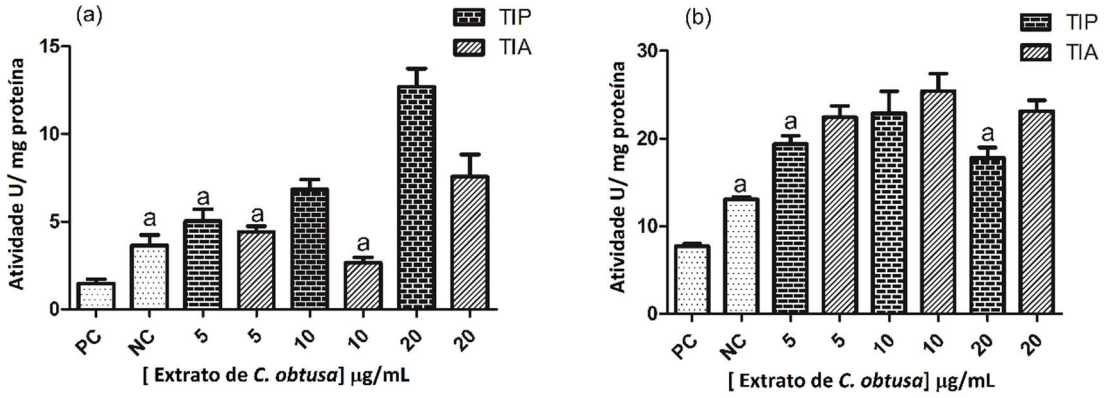
4.2.6 Avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT

Para avaliar se a atividade antioxidante do extrato de *C. obtusa* seria mediada por um aumento na atividade de enzimas antioxidantes, foi realizada a avaliação da atividade das enzimas SOD e CAT. Enzimas antioxidantes, como a GPx, CAT e SOD, fornecem proteção contra o estresse oxidativo e contra a lesão tecidual. Essas enzimas são críticas para a defesa contra os efeitos nocivos das EROs e dos radicais livres em sistemas biológicos (Huang *et al.*, 2013).

A CAT, formalmente denominada hidroperoxidase, é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. É parte fundamental do mecanismo de defesa celular contra as EROs, e é um componente chave do sistema de defesa antioxidante. A decomposição do H_2O_2 protege os tecidos contra o ácido hipocloroso e o $^{\bullet}OH$, que é o mais deletério do organismo e é formado pela reação do H_2O_2 com metais de transição (Barreiros *et al.*, 2006). A CAT influencia a taxa de decomposição do H_2O_2 e, portanto, é capaz de regular o estado de equilíbrio intracelular de H_2O_2, o que impacta na sinalização intracelular. A diminuição da atividade da CAT pode resultar em vários efeitos deletérios induzidos pela acumulação de radicais $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Huang *et al.*, 2013).

A fração sobrenadante do homogeneizado das células de HaCaT, tratadas com soluções de diferentes concentrações de extrato de *C.obtusa* por 24 horas e depois expostas a 4J/cm^2 de radiação UVA na presença (TIP) e na ausência (TIA) das soluções de extrato, foi utilizada para a quantificação da atividade da enzima CAT intracelular. O efeito de *C. obtusa* sobre a diminuição da atividade da CAT desencadeada pela exposição à radiação UVA é apresentado na Fig. 19a.

Figura 19. Atividade das enzimas Catalase (a) e Superóxido Dismutase (b) de células HaCaT tratadas com extrato de *C.obtusa* e expostas à radiação UVA (4J/cm^2).



Células foram pré tratadas com o extrato de *C. obtusa* e irradiadas na presença (TIP) ou na ausência (TIA) do extrato. PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). Mesmas letras significam que a média não foi diferente estatisticamente após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Os resultados mostram que a radiação UVA diminui em 60% a atividade da CAT nas células HaCaT irradiadas e não tratadas (PC). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Shindo & Hashimoto (1997), onde os fibroblastos de pele humana foram irradiados com 6J/cm^2 de UVA, e observou-se o decréscimo da atividade da CAT em 66%.

O decréscimo da atividade da CAT pela radiação UVA pode estar associado com alterações estruturais, as quais influenciam a funcionalidade de seu centro ativo. EROs geradas pela radiação UV podem reagir com resíduos de aminoácidos, particularmente triptofano, tirosina, histidina, metionina e cisteína, presentes na molécula da CAT, contribuindo para mudança da carga superficial da proteína, levando consequentemente a perda de atividade enzimática (Maresca *et al.*, 2006). Dessa forma, a diminuição da atividade da CAT pela radiação UVA pode ser devido à depleção da enzima ou à perda de atividade enzimática.

As células tratadas com o extrato, nas diferentes concentrações, de acordo com o protocolo TIA foi capaz de prevenir a perda da atividade da CAT induzida pela radiação UVA. Enquanto que no tratamento TIP o extrato não só foi capaz de prevenir a perda da atividade, mas aumentou a atividade enzimática acima do nível do NC. Caso o experimento tivesse sido realizado em amostras do meio de cultura, o aumento da atividade da CAT, principalmente no tratamento TIP poderia ser atribuído a uma interferência do extrato no ensaio de atividade, pois o extrato é capaz de absorver em 240 nm, comprimento de onda

de leitura do ensaio enzimático. Porém a medida de atividade enzimática foi feita na fração sobrenadante do homogeneizado celular, após as células terem sido lavadas com solução salina, o que indica que o extrato não apresentou interferência no protocolo experimental.

O extrato apresentou maior efeito protetor quando as células foram submetidas ao tratamento TIP (Fig. 19a). As células expostas ao extrato na concentração de 20 µg/mL neste tratamento exibiram maior proteção contra o decréscimo da atividade enzimática proporcionada pela radiação UVA. A atividade enzimática foi aumentada em 248% em comparação ao NC, que expressa a atividade da enzima sob condições basais. Para esta concentração, TIA também aumentou a atividade enzimática acima NC, mas o resultado foi 40% inferior ao observado para TIP, o que pode ser devido à falta do efeito de absorção da radiação para o tratamento TIA. Assim, no caso do tratamento TIP, o extrato pode ter exercido seu efeito protetor por absorção da radiação UVA durante a radiação e pelo sequestro das EROs, geradas por esta radiação, pelos componentes do extrato presentes no interior da célula. Já para o tratamento TIA, a proteção foi apenas pelo sequestro das EROs no interior das células. O efeito protetor do extrato nas concentrações 5 µg/mL e 10 µg/mL, nos dois tratamentos foi menor do que aquele obtido na concentração de 20 µg/mL. Isto pode ser explicado pela menor capacidade de absorção da radiação pelo extrato nessas concentrações e pela menor quantidade de componentes do extrato que penetraram na célula. Também é possível que componentes do extrato tenham estimulado diretamente a expressão da catalase, sendo possível observar um aumento da sua atividade.

O aumento da atividade enzimática acima da atividade basal celular pode ser devido ao efeito do extrato sobre a citocina TGF-β, que inibe a expressão da catalase. Também é possível que o extrato tenha exibido efeito sobre o fator de transcrição Nrf-2, que controla a transcrição de enzimas antioxidantes, como a catalase. (Zhu *et al.*, 2005; Michaeloudes *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que o ácido clorogênico é um potente indutor da resposta antioxidante mediada pelo Nrf2, que é capaz de estimular a atividade do sistema enzimático antioxidante sob condições de estresse oxidativo (Boettler *et al.*, 2011).

Para a concentração 10 µg/mL, TIP protegeu mais do que TIA, embora a proteção tenha sido menor do que para 20 µg/mL, uma vez que havia uma menor quantidade de extrato para exibir os efeitos biológico e fotoprotetor. Ambos os grupos TIP e TIA a 5 µg/mL retornaram a atividade enzimática para ao nível do NC, o que sugere que a quantidade de extrato que penetrou nas células foi suficiente para exibir o efeito biológico, sendo pela remoção de EROs ou pela ativação direta da enzima. No entanto, esta

concentração não foi suficiente para absorver a radiação UVA e atuar de forma sinérgica para a proteção contra a diminuição da atividade da CAT induzida pela radiação UVA.

O $O_2^{\bullet-}$ está constitutivamente presente nas células, pois escapam da cadeia respiratória nas mitocôndrias, o que contribui para a indução e manutenção da inflamação cutânea. A SOD fornece um mecanismo de proteção em compartimentos celulares contra o potencial citotóxico do $O_2^{\bullet-}$. A SOD é uma família de enzimas que eficientemente catalisa a redução do $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 e O_2. Três formas de SOD são conhecidas e classificadas de acordo com seu metal cofator: a SOD1 ou Cu/ZnSOD é um homodímero contendo cobre ou zinco, encontrada quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular, SOD2 ou MnSOD, existe como tetrâmero contendo manganês, está no espaço mitocondrial, e SOD3 ou EC-SOD, existe como tetrâmero contendo cobre e zinco, e quando sintetizada contém um peptídeo sinal que a direciona para o espaço extracelular (Zelko *et al.*, 2002) . A SOD3 é uma glicoproteina que está prodominantemente expressa na matriz extracelular de tecidos e na superfície das células, onde está ancorada à proteoglicana de heparan sulfato (Kwon, Kim*, et al.*, 2012).

Neste estudo, o efeito da radiação UVA sobre as células HaCaT foi avaliado por media da atividade enzimática da SOD total. Para avaliação da atividade da SOD total, foi utilizada uma abordagem clássica, que emprega o sistema xantina-XOD como fonte do $O_2^{\bullet-}$, que reduz a sonda ferricitocromo c à ferrocitocromo c. A redução da sonda é quantificada pela medida da absorvância na faixa do visível (López-Alarcón e Denicola, 2013). O extrato por ser colorido poderia interferir na leitura da absorvância e consequentemente com a medida da atividade enzimática. Porém, como já mencionado para a enzima CAT, a atividade da SOD foi determinada na fração sobrenadante das células que foram lavadas para retirada de excesso de meio de cultura e extrato. Diminuindo, dessa forma, a interferência do extrato na medida da atividade enzimática. (López-Alarcón e Denicola, 2013).

A medida da atividade da SOD total nas frações sobrenadantes do homogeneizado das células HaCaT expostas à radiação UVA e não tratadas com o extrato (PC) diminuiu em 40% em comparação às células não expostas à radiação e não tratadas (NC). Quando as células HaCaT foram expostas à radiação UVA, mas submetidas ao tratamento TIP com o extrato nas concentrações 5 µg/mL e 20 µg/mL houve proteção das células quanto a perda da atividade da SOD que permaneceu ao nível do NC (atividade basal). Já as células em tratamento TIP com o extrato na concentração de 10 µg/mL e aquelas em tratamento TIA

em todas as concentrações de extrato apresentaram atividade enzimática superior àquela do NC (Fig. 19b).

A eficiência do tratamento TIA observado para SOD poderia ser explicada pelo fato de a capacidade do extrato em absorver a radiação UVA não ser o mecanismo mais importante para o seu efeito protetor. Assim, o mecanismo principal seria a alta atividade do extrato no sequestro do $O_2^{\bullet-}$, o que impediria a depleção da enzima. Além disso, é possível que o tratamento TIP na concentração 20 µg/mL tenha exibido um efeito pró-oxidante devido ao fato de o extrato estar presente no meio no momento da radiação.

O aumento da atividade da SOD acima do nível basal poderia ser explicado por um aumento da atividade desta enzima proporcionado por uma ação combinada com CAT. A SOD é uma enzima oxido-redutase que converte o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 que é então detoxificado à água pela CAT ou GPx. A SOD e CAT/GPx catalisam reações sequenciais e a eficiência catalítica pode ser máxima quando exercem suas funções de modo combinado. Assim, o aumento da síntese do fator de transcrição Nrf-2 por componentes do extrato poderia conduzir ao aumento indireto da atividade da SOD por uma ação combinada entre as enzimas, já que é demonstrado que é possível ter um aumento indireto da SOD pelo aumento da atividade da CAT (Luangwattananun *et al.*, 2017).

O extrato mostrou uma boa eficiência na inibição da peroxidação lipídica, principalmente quando utilizado na concentração 5µg/mL e no tratamento TIA. Essa alta eficiência do extrato pode ser atribuída não só pela sua capacidade de sequestrar EROs, mas também por sua propriedade de aumentar a atividade das enzimas CAT e SOD. A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados pelo $^{\bullet}OH$ pode conduzir a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares. O $^{\bullet}OH$ pode ser formado pela reação de Fenton, na qual o H_2O_2 reage com íons ferro (Fe^{+2}) e cobre (Cu^{+}) recebendo mais um elétron e formando o radical; pela reação de Haber-Weiss, onde o H_2O_2 reage com $O_2^{\bullet-}$ sob catalise de metais; e pela reação do $O_2^{\bullet-}$ e ácido nítrico gerando peroxinitrito, que também pode levar à formação do $^{\bullet}OH$ (Nogueira *et al.*, 2007). Pelos três mecanismos apresentados, a formação do $^{\bullet}OH$ pode ser interrompida pela ação enzimática combinada da CAT e SOD. Desta forma, o extrato, além de ter um efeito sequestrador de radicais, pode oferecer proteção antioxidante adicional por aumentar o conteúdo de moléculas antioxidantes endógenas e por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes.

4.2.7 Avaliação da formação de proteina carbonilada

A modificação oxidativa de enzimas e proteínas estruturais desempenham papel significativo no fotoenvelhimento induzido pela radiação solar. A carbonilação de proteínas é um tipo de oxidação que pode ser promovida pela reação direta das EROs, na presença de metais, com as cadeias laterais de aminoácidos como lisina, arginina, prolina, treonina, dentre outros (Maisonneuve *et al.*, 2009). A carbonilação de proteínas pode ocorrer também pela reação de aldeídos, tais como aqueles gerados do processo de peroxidação lipídicas, α,β aldeídos insaturados, di-aldeídos e ceto-aldeídos, com sítios nucleofílicos de proteínas, formando produtos finais da lipooxidação avançados (ALE) (Aldini *et al.*, 2007).

A quantificação de proteína carbonilada foi realizada com o auxílio da Fluoresceína-5- tiossemicarbazida (FTC). O grupamento hidrazina presente no FTC reage com a carbonila para formar uma base de Schiff, formando uma ligação covalentemente entre a porção fluoresceina e a proteína. A fluorescência associada com as proteínas ácido-precipitáveis foi utilizada para medir o nível de proteína carbonilada fluorometricamente (Chaudhuri *et al.*, 2006).

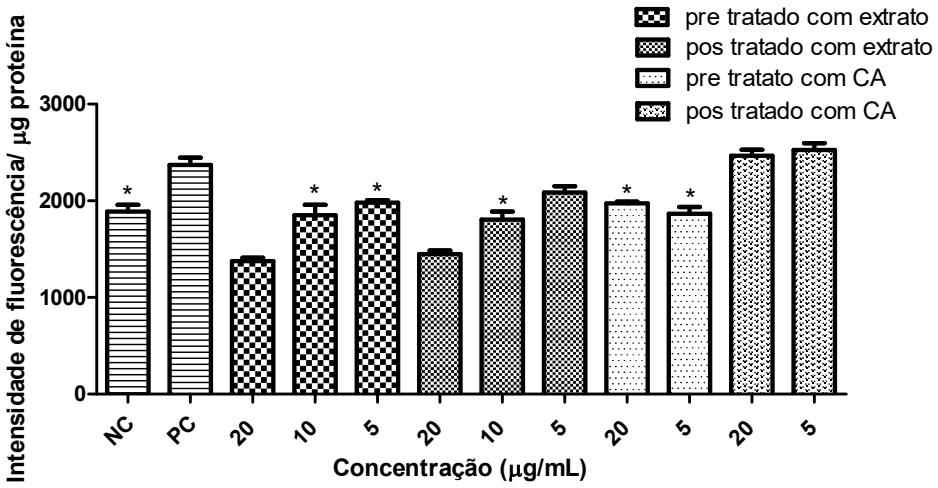
O emprego de grupos de proteína carbonilada como biomarcadores de estresse oxidativo possui algumas vantagens em comparação com a avaliação de outros produtos de oxidação devido à estabilidade relativa das proteínas carboniladas e devido à sua formação inicial no processo oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Os fibroblastos submetidos a radiação UVA/UVB sem qualquer tipo de tratamento (PC), mostram um aumento de 25% da fluorescência/mg de proteína em relação às células não irradiadas (NC) (Fig. 20). Isto sugere que as EROs geradas pela radiação, ou os produtos secundários da peroxidação lipídica induzidos pelas EROs, reagiram com as cadeias laterais de aminoácidos de proteínas mais susceptíveis, promovendo carbonilação das mesmas.

Quando as células foram pré tratadas com 20µg/mL do extrato, a quantidade de fluorescência gerada foi menor que aquela das células não irradiadas (quantidade basal). No entanto, para as concentrações de extrato de 10 µg/mL e 5 µg/mL, e para 20 µg/mL e 5µg/mL de ácido clorogênico, a quantidade de fluorescência foi igual à quantidade basal. Isto sugere que tanto o extrato quanto o ácido clorogênico protegeram as proteínas do processo de carbonilação. Porém, o pós tratamento das células com as diferentes concentrações de extrato proporcionou uma redução da fluorescência igual ou inferior ao nível basal somente quando o tratamento foi realizado nas concentrações de 20 µg/mL e

10 µg/mL. O pós tratamento das células com o ácido clorogênico não foi efetivo. Os dados apresentados mostram que o pré tratamento foi mais efetivo do que o pós tratamento e o extrato foi mais eficaz do que o ácido clorogênico. Isto sugere que o extrato, por ser uma mistura de compostos antioxidante, tem maior atividade sequestradora de radical do que o ácido clorogênico. Além disso, possivelmente o pré tratamento foi mais eficaz do que o pós tratamento, devido às EROs terem sido sequestradas por componentes do extrato presentes no interior da célula concomitantemente com sua formação.

Figura 20. Intensidade de fluorescência gerada pela fluoresceína-5- tiossemicarbazida em fibroblastos humanos submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB) e tratados com soluções do extrato de *C. obtusa* ou com ácido clorogênico.



PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). * média não foi diferente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

A avaliação de proteína carbonilada utilizando o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) foi realizada em diferentes espécies e em diferentes tecidos *in vivo*. Os resultados variaram de acordo com a espécie, amostra tecidual e protocolo experimental de indução do dano oxidativo. Para *Cecropia pachystachya* os resultados variaram de acordo com a parte do cérebro avaliada e com o protocolo. Para o teste de nado forçado, foi possível observar um aumento de proteína carbonilada no córtex pré frontal, hipocampo e no nucleo accumbens, porém o extrato exibiu efeito apenas no nucleo accumbens (Ortmann *et al.*, 2016). Por outro lado, para o teste do campo aberto, o extrato foi capaz de diminuir a formação de proteína carbonilada no homogeneizado do no córtex pré frontal e hipocampo (Gazal *et al.*, 2015). Já para *C. glaziovii*, o extrato foi capaz de diminuir a formação de proteína carbonilada em tecido pulmonar no estudo de indução de pleurisia (Müller *et al.*, 2016). Assim, a proteção oferecida pelo extrato de *C.*

obtusa frente à carbonilação de proteínas induzidas pela radiação UV está consonante com os resultados de proteção da formação de proteína carbonilada de outas espécies de Cecropia.

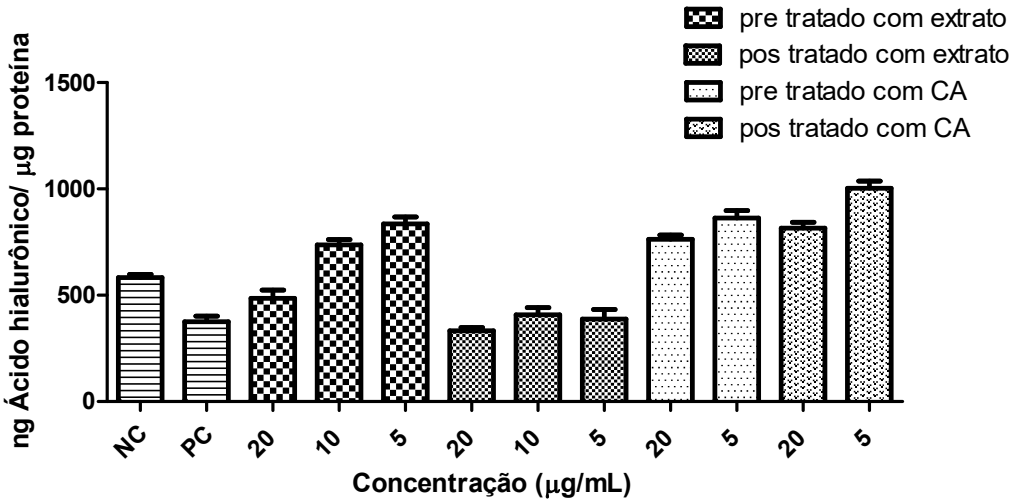
4.2.8 Avaliação do conteúdo de Ácido Hialurônico

O AH é um polissacarídeo de alta massa molecular, carregado negativamente, constituído de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina, e é o mais simples dentre as glicosaminoglicanas (Necas *et al.*, 2008). O AH é encontrado no pulmão, articulações, fluído vítreo dos olhos, cordão umbilical, fluído sinovial e na pele. Na pele normal este polissacarídeo tem como função primordial participar do processo de re-epitelização, e é mantido no espaço extracelular e na superfície celular na camada basal da epiderme e na derme (Necas *et al.*, 2008; Komorowicz *et al.*, 2016). Sob condições fisiológicas, o AH existe como polímero de alta massa molecular de 10^6 Da, que não induz inflamação. Entretanto, estudos têm proposto que fragmentos de AH de baixa massa molecular são acumulados nos tecidos em reposta a lesões. Estes fragmentos de AH são capazes de ativar macrófagos e induzir a expressão de genes cujas funções são relevantes para a inflamação crônica (Gao *et al.*, 2008)

A exposição da pele à radiação UV, principalmente à UVA, que é a que penetra mais profundamente na pele, leva ao acumulo de AH na epiderme e acelera sua fragmentação. Em nossos experimentos quando as células de fibroblastos foram expostas à radiação UVA/UVB sem a proteção do extrato de *C.obtusa* (PC), houve uma redução da quantidade de AH em 35% em relação as células não irradiadas e não tratadas com o extrato (NC) (Fig. 21). A menor quantidade de AH não foi devido à perda da viabilidade das células, pois experimentos de viabilidade mostraram que nas quantidades de radiação utilizadas não houve perda da viabilidade.

Embora o mecanismo de *turnover* do AH e sua degradação devido à radiação não sejam detalhadamente descritos, é geralmente aceito que radicais livres, especialmente o $^{\bullet}OH$, desempenham papel importante no processo de degradação desse polissacarídeo. A reação de despolimerização oxido redutiva do AH ocorre pela destruição ao acaso das unidades monossacarídicas, devido aos radicais livres derivados do oxigênio, seguindo-se a clivagem hidrolítica secundária dos substituintes glicosídicos instáveis resultantes (Uchiyama *et al.*, 1990; Stern, Robert e Maibach, Howard I., 2008).

Figura 21. Quantificação do ácido hialurônico em cultura de fibroblastos humanos tratados com extrato de *C.obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB).



PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). Todas as amostras foram diferentes do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

A cultura de fibroblastos foi pré-tratada com o extrato ou ácido clorogênico em diferentes concentrações por 24 horas e depois submetidas à radiação. O extrato na concentração de 20 µg/mL foi capaz de aumentar a quantidade de AH que foi reduzida pela radiação. O extrato nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL e o ácido clorogênico nas concentrações de 20 µg/mL e 5 µg/mL foram capazes de aumentar a quantidade de AH acima do nível basal (NC) (Fig. 21). Estes resultados sugerem que o extrato e o ácido clorogênico, pela eficiência em sequestrar EROs, podem ter protegido o AH da sua despolimerização oxido redutiva. A capacidade do extrato de sequestrar EROs foi avaliada por diferentes testes *in vitro* cujos resultados estão apresentados na Tabela 3. Além disso o potencial antioxidante e sequestrador de EROs, $O_2^{\bullet -}$ e $^{\bullet}OH$ do ácido clorogênico foi demostrado por outros autores. Adicionalmente, o ácido clorogênico também é capaz de sequestrar espécies reativas de nitrogênio, como peroxinitrito, o que possibilita a inibição da iniciação da cadeia de peroxidação lipídica (Laranjinha *et al.*, 1994; Kono *et al.*, 1997).

Tosovic et al. (2017) estabeleceram que em meio ácido ou neutro a atividade antioxidante do ácido clorogênico pode ser por transferência de elétrons ou por formação de aduto com os radicais. Em meio básico a transferência de elétron acoplado à transferência de próton (SET-PT) é o mecanismo antioxidante provável do ácido clorogênico com alta taxa de reatividade.

Em adição, Kwon et al., (2012) demonstraram que a SOD3 previne a fragmentação de AH induzida pela radiação. Esta enzima antioxidante catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$, o sugere que a SOD3 pode desempenhar papel importante na proteção do AH contra a sua degradação. Esses mesmo autores mostraram que a SOD3 inibe o processo inflamatório por prevenir a fragmentação do AH. Anteriormente demonstramos que o extrato aumentou a atividade da SOD total, acima do seu nível basal. Isto sugere que o efeito protetor proporcionado pelo extrato contra a depleção do AH induzida pela radiação UV também pode ser devido à capacidade deste extrato em aumentar a atividade da SOD.

Outro mecanismo pelo qual o extrato e o ácido clorogênico podem ter atuado para aumentar a quantidade de AH seria por inibição da enzima hialuronidase ou pelo aumento da atividade da AH sintetase, já que tanto o processo de degradação pela enzima hialuronidase quanto a diminuição da atividade da AH sintetase induzida pela radiação UV, são bem descritos na literatura (Dai *et al.*, 2007; Kurdykowski *et al.*, 2011).

Adicionalmente, sabe-se que derivados de flavonas reduzem a atividade da hialuronidase, impedindo que o AH se decomponha. Apesar de estudos *in vitro* terem sugerido que as formas agliconas possuem maior atividade inibidora do que os glicosídeos, estudos *in vivo* não confirmaram essa hipótese. O efeito de extratos vegetais ricos em substâncias biologicamente ativas sobre a inibição da hialuronidase é bem conhecido, e em geral o efeito dos flavonóides isolados é mais fraco do que o extrato (Arct e Pytkowska, 2008; Cesar *et al.*, 2015). Desta forma, o efeito protetor do extrato de *C. obtusa* sobre a diminuição do conteúdo de AH induzido pela radiação também pode ser explicado por uma possível inibição da enzima hialuronidase, visto que 3 flavonas foram identificadas no extrato (Picos 2, 3 e 4 da Tabela 4).

Quando as células foram irradiadas e depois tratadas com o extrato por 24 horas, não foi observado efeito protetor contra a degradação do AH por nenhuma das concentrações do extrato e para todas as concentrações a quantidade de AH foi igual aos das células irradiadas e não tratadas (Fig. 21). Esse resultado sugere que o mecanismo pelo qual os componentes do extrato protegem o AH da degradação é provavelmente pelo sequestro dos radicais gerados pela radiação UV, já que uma vez que os radicais tenham reagido com o AH não teria como o processo ser revertido. Por outro lado, o tratamento das células com o ácido clorogênico por 24 horas após a radiação proporcionou a proteção do AH semelhante ao do pré-tratramento (Fig. 21). Isto sugere que, além do sequestro de EROs, o ácido clorogênico pode ter outro mecanismo de proteção contra a degradação do AH induzida pela radiação, como pela inibição da atividade da hialuronidase, aumento da atividade da AH sintetase, ou por proteção indireta, através do aumento da atividade da SOD3.

4.2.9 Avaliação do conteúdo de Colágeno

Na pele humana, o fibroblasto é o responsável pela síntese, organização e manutenção da matriz extracelular, que é rica em colágeno. O colágeno confere firmeza à pele e atua protegendo contra trauma externo. O colágeno é um dos principais componentes da pele e do tecido conectivo, correspondendo de 85% a 90% do peso seco desses tecidos. Ele consiste de três α-cadeias de polipeptídeos unidas em estrutura helicoidal na forma de haste (Uitto, 2008). A estrutura molecular do colágeno é estabilizada por uma rede de ligações de hidrogênio intra e intercadeias entre o grupo NH da glicina e o grupo carbonila (C = O) de resíduos de aminoácidos de outras cadeias polipeptídicas, ou por pontes de hidrogênio com moléculas de água (Brodsky e Persikov, 2005). O colágeno é o alvo primário de fatores externos, como radiação UV, que promove alterações físicas, químicas e físico-químicas na molécula.

Alguns estudos têm demonstrado que durante a exposição da pele à radiação UV ocorre alteração do balaço entre a síntese do colágeno e sua degradação. Os fibroblastos humanos podem aumentar a expressão da MMP-1 pela geração de EROs, tais como $O_2^{\bullet -}$ ou H_2O_2, e através da peroxidação lipídica por reação de Fenton íon dirigida quando irradiados por radiação UVA e UVB. Assim, o aumento da produção das EROs pela radiação solar leva à ativação dos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1) e NFκB, como também aumenta a expressão de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A MAPK é um importante transmissor de sinais extracelular para o núcleo da célula, e é um dos passos mais importantes de transdução ativados pela radiação UVB (Barchowsky *et al.*, 2000)

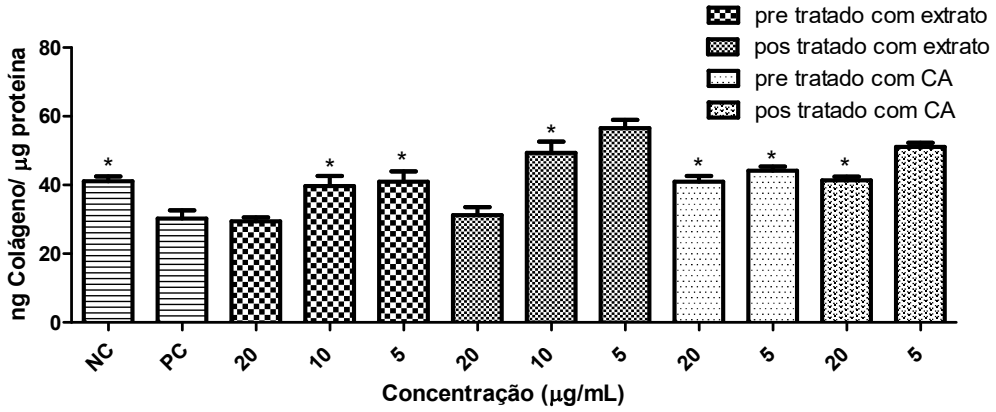
Embora os mecanismos responsáveis pela indução das MMPs não estão completamente elucidados, é aceito que as EROs primeiro ativam as MAPKinases, tais como ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38 ou JNK (c-jun N-terminal kinases) que são essenciais para a expressão do c-Fos e c-Jun, que associados formam o fator de transcrição AP-1. A ativação das MAPKs ocorre pela fosforilação do ERK, p38 e JNK e ativação do fator de transcrição AP-1, os quais juntos promovem a expressão das MMPs. O AP-1 desempenha papel critico na regulação da transcrição da MMP-1, MMP-3 e MMP-9, desencadeando a expressão aumentada destes genes, o que promove a fragmentação do colágeno. As MMPs degradam o colágeno resultando na perda de contanto entre célula-matriz, o que promove a diminuição da síntese do colágeno.

Além disso, o AP-1 inibe a via de sinalização do fator de crescimento e transformação (TGF-β), que uma vez prejudicado leva à diminuição da produção do

procolágeno tipo-I em fibroblasto humano. Assim, o TGF-β também desempenha papel importante no controle da homeostasia do colágeno por regular a síntese e a degradação do mesmo (Bosch *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016).

Conforme apresentado na Fig. 22, quando as células de fibroblastos foram expostas à radiação UV sem qualquer tratamento (PC), a quantidade de colágeno determinada, depois de 24 horas da radiação, foi 26% menor do que aquela encontrada nas células não irradiadas (NC). Esse resultado está de acordo com aqueles obtidos por Fisher et al., (2000), que demonstraram que a diminuição da síntese do colágeno pela radiação UVB persistiu por 24 horas, seguida pela recuperação 48-72 horas depois. A menor quantidade de colágeno encontrada nas células irradiadas poderia ser explicada pela geração de radicais livres pela radiação UV, que alteraria a via de sinalização ativado pelo TGF-β, promovendo a não transcrição do gene do colágeno, como também, poderia ativar passos de transcrição que levam à síntese das MMPs, principalmente a MMP 1.

Figura 22. Quantificação de colágeno em cultura de fibroblastos humanos tratados com extrato de *C.obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidos à radiação UV (0,5J/cm^2 UVA+ 25mJ/cm^2 UVB).



PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). * média não foi diferente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

As células pré-tratadas por 24 horas com o extrato e com o ácido clorogênico em diferentes concentrações, exibiram quantidades de colágeno iguais ao das células não irradiadas, exceto àquelas tratadas com 20 µg/mL de extrato, cuja quantidade de colágeno foi igual ao das células irradiadas. Estes resultados sugerem que o extrato e o ácido clorogênico podem ter sequestrado as EROs geradas pela radiação, impedindo a ativação de vias de sinalização que levam à síntese da MMP-1 ou à diminuição da síntese do colágeno. Também deve ser considerado que o sequestro das EROs pelo extrato ou ácido clorogênico pode impedir

que essas espécies reativas reajam com as moléculas de colágeno da matriz extracelular, uma vez que 86% da matriz extracelular é fibra de colágeno.

Em adição, foi observada a proteção do colágeno para as células irradiadas e posteriormente tratadas com o extrato ou o ácido clorogênico por 24 horas. Somente para as células tratadas com 20 µg/mL de extrato a quantidade de colágeno foi igual ao do controle irradiado, indicando ausência de proteção (Fig. 22). Para o pós tratamento, quando as células foram irradiadas, não havia substância ativa no interior das células para exibir efeito protetor. Dessa forma, as EROs geradas pela radiação podem ter reagido com qualquer componente da célula ou da matriz extracelular. Assim, neste caso o efeito protetor proporcionado pelo extrato ou pelo ácido clorogênico não poderia ser explicado pela capacidade de sequestro das EROs, desta forma, outros mecanismos podem estar envolvidos. Feng et al., (2005) demonstraram que o tratamento de células JB6 com ácido clorogênico bloqueou a transativação da AP-1 e NF-κB. Em baixas concentrações, esta substância diminuiu a fosforilação do JNK, ERK e p38 induzidas pela radiação UVB. Os dados obtidos por estes autores poderiam explicar o efeito protetor do colágeno observado em células de fibroblastos irradiadas e tratadas com o ácido clorogênico e com extrato que contém esse polifenol.

Assim como observado para o ácido hialurônico, quando as células foram irradiadas em ambos os tratamentos com 20µg/mL de extrato, este não foi capaz de promover o aumento da produção de colágeno, possivelmente devido a um efeito pró-oxidante. As outras concentrações retornaram a produção ao nível do controle não irradiado, sendo que o pós tratamento exibiu melhor proteção do que o pré, e o pós tratamento com 5µg/mL aumentou a quantidade de colágeno acima do nível basal. Os tratamentos com ácido clorogênico igualaram a produção de colágeno ao controle não irradiado, com exceção do pós tratamento com 5 µg/mL, que aumentou a produção acima dele.

O efeito protetor de *Cecropia* spp. frente aos danos causados pela radiação ainda não foi amplamente estudado. Desta forma torna-se difícil relacionar os resultados encontrados com dados da literatura. Porém, sabe-se que outras espécies de Cecropia possuem atividade cicatrizante, e são capazes de aumentar a produção de colágeno, favorecendo o processo de cicatrização (Nayak, 2006).

4.3.4.4 Avaliação da atividade da enzima MMP-1

A matriz extracelular é uma estrutura dinâmica constituída de proteínas fibrosas (fibra de colágeno e de elastina), glicoproteínas (fibronectinas e lamininas) e proteoglicanas. O colágeno é uma das principais famílias de proteínas da matriz

extracelular e desempenha papel crítico na manutenção da estrutura da maioria dos tecidos (Naylor *et al.*, 2011). A degradação do colágeno é normalmente regulada por MMPs e seus inibidores naturais, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Quan *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2015).

A exposição aguda da pele à radiação UV induz a expressão somente de três metaloproteinases (MMP-1, MMP-3 e MMP-9), e a produção de muitos membros da família das MMPs é constitutivamente aumentada na pele com fotodano. Estas proteinases podem ser secretadas por queratinócitos e fibroblastos em resposta a vários fatores (Fisher *et al.*, 1996).

Conforme descrito no ítem 4.3.4.3, três passos distintos de MAPkinases, ERK, JNK e p-38 podem conduzir à síntese da MMP-1, e essa sinalização é ativada por citocinas inflamatórias. Dessa forma, a MMP-1 também pode ser induzida por citocinas inflamatatórias, como a IL-1, que são up-reguladas em fibroblastos e queratinócitos pela radiação solar (Barchowsky *et al.*, 2000).

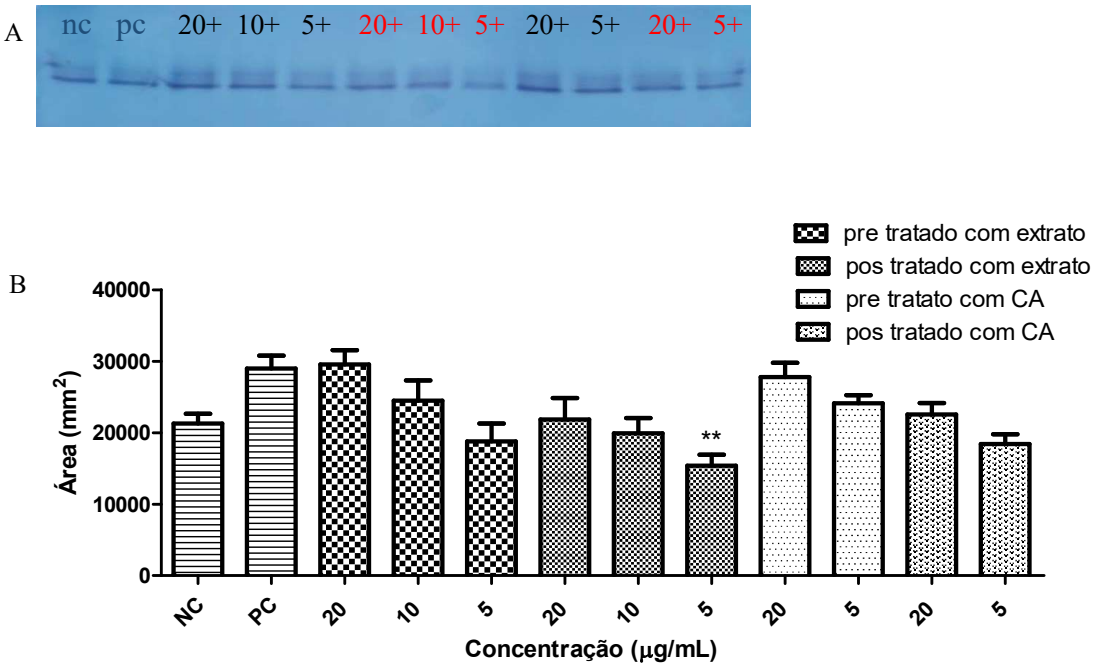
Fagot et al. (2004) conseguiram induzir um aumento de atividade da MMP-1 em fibroblastos humanos submetidos à radiação UVA/UVB, mas não conseguiram ver aumento da atividade enzimática em cultura de queratinócitos humanos. Por outro lado, quando os queratinócitos foram irradiados e o meio de cultura foi transferido para placas contendo fibroblastos por 24 horas, eles observaram um aumento de atividade 2,25 vezes maior do que o inicialmente observado na cultura de fibroblastos irradiada. Eles também observaram um aumento dose-dependente de IL-6 e IL-1α no meio de cultura dos queratinócitos e demonstraram que apesar de os queratinócitos não estarem diretamente ligados à produção da MMP-1, existe uma significativa participação dos queratinócitos através da liberação de substâncias mediadoras.

Assim, a análise da MMP-1 foi realizada em cultura de fibroblasto como os demais experimentos, no entanto, para mimetizar o processo que ocorre na pele, utilizou-se o sistema de sinalização celular, no qual os queratinócitos sofrem irradiação e posteriormente o meio de cultura é transferido para os fibroblastos.

Conforme apresentado na Fig. 23, os fibroblastos que receberam a fração sobrenadanate dos queratinócitos irradiados (UVA/UVB), e foram incubados por 24 horas, apresentaram quantidade de MMP-1 cerca de 31% maior que àquela determinada na fração sobrenadante de fibroblastos que receberam a fração sobrenadante de cultura de queratinócitos não irradiados, porém estatisticamente não houve diferença entre o NC e o PC, como também não houve diferença entre as amostras do pré e pós tratamentos com o extrato e

com o ácido clorogênico e os controles NC e PC. Apenas o pós tratamento com o extrato em 5 µg/mL diminui significativamente a atividade da enzima em comparação ao PC. A ausência de diferença estatística poderia explicada pelo método Western blotting utilizado para quantificação da MMP-1, que envolve a separação de proteínas das amostras por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência das proteínas separadas para papel de nitrocelulose, reação com anti-MMP1 humano e digitalização das bandas, seguido pela análise quantitativa pelo programa ImageJ. Todo esse procedimento proporcionou grande variação de experimento para experimento.

Figura 23. Atividade da enzima metaloproteinase-1 de células de fibroblastos humanos tratados com meio de culta de células HaCaT, que foram tratadas com o extrato de *C. obtusa* ou com ácido clorogênico antes ou depois de submetidas à radiação UV (0,5J/cm2 UVA+ 25mJ/cm2 UVB).



Resultados exibidos como membrana revelada com corante (A) e gráfico gerado por software (B). PC: Controle positivo, NC: controle negativo. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). Nenhuma amostra foi diferente do NC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$. ** média foi diferente do PC após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Para as células submetidas à radiação observa-se que o pós tratamento com o extrato tende a exibir maior proteção em relação ao pré, o que coincide com os resultados apresentados na Fig. 22, que mostram que o pós tratamento tende a aumentar o conteúdo de colágeno. A expressão da MMP-1 diminuiu conforme a concentração foi diminuída e o pós tratamento com 5 µg/mL promoveu a maior proteção, sendo responsável pelo máximo de diminuição da

atividade da enzima em relação ao PC. Estes resultados também são concordantes com o apresentado na Fig. 22 para o conteúdo de colágeno, visto que a MMP-1 tem ação direta sobre a degradação do colágeno, assim quanto maior é a atividade enzimática, menor é a quantidade de colágeno presente na matriz extracelular.

Apesar de ter sido demonstrado que o ácido clorogênico é um potente inibidor da MMP-1, MMP-2 e MMP-9 em diferentes amostras teciduais de modelos *in vivo* (Chen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012), neste trabalho o ácido clorogênico não apresentou atividade inibidora da MMP-1. Apesar disso, houve uma tendência de o extrato proteger mais do que o ácido clorogênico, sendo que este foi utilizado em concentrações 5 e 20 vezes mais altas do que a quantidade de ácido clorogênico encontrada no extrato em relação à maior concentração de extrato utilizada no experimento. O extrato é uma mistura de compostos que podem ter ação sinérgica que superaria o efeito biológico do ácido clorogênico. Além disso, sabe-se que as agliconas apigenina e luteolina são inibidoras da MMP-1 (Hwang *et al.*, 2011), o que pode sugerir a atividade das formas glicosídicas encontradas no extrato, mesmo não tendo havido diferença estatística entre os controles e a proteção oferecida pelo extrato.

Outro fato que pode ser observado na Fig. 23, é que os tratamentos com o extrato nas concentrações de 20 µg⁄mL e 10 µg⁄mL foram menos eficientes do que na concentração 5 µg⁄mL. Este resultado foi observado para os outros parâmetros avaliados em cultura de células anteriormente e para outros compostos naturais puros como para o ácido protocatecuico (Nakamura *et al.*, 2001), o resveratrol, o canferol e a quercetina (Oh *et al.*, 2006; Calabrese *et al.*, 2010; Vargas e Burd, 2010; Kim, H.-S. *et al.*, 2014). A menor eficiência do extrato a 20 µg⁄mL e 10 µg⁄mL, principalmente no pré-tratamento, pode ser devido à possível fotodegradação de alguns componentes do extrato que conduziria ao acumulo de fotoprodutos que poderiam ser os responsáveis pelo comportamento observado. Na concentração de 5 µg⁄ml, os fotoprodutos estariam em concentração pequena e, portanto o efeito oxidante não seria desencadeado.

O extrato apresentou elevada atividade antioxidante *in vitro* e foi capaz de proteger dos danos causados pela radiação UV em células da pele. Os diferentes tratamentos do extrato protegeram de forma diferente frente aos parâmetros analisados, não sendo possível distinguir o melhor tratamento para evitar o dano causado pela radiação UV. Tratar as células tanto antes quanto depois da irradiação com o extrato de *C. obtusa* ajudou a proteger do dano causado, e os resultados obtidos para a quantificação de proteína carbonilada, colágeno tipo 1, AH e MMP-1 sugerem que o extrato é um possível candidato a ser utilizado para atenuar os efeitos do fotoenvelhecimento da pele. Assim, os resultados apresentados

serviram de embasamento teórico para a posterior elaboração de formulações tópicas a partir do extrato, visando o efeito protetor da pele. Porém todos os efeitos biológicos demonstrados anteriormente dependem da penetração das substâncias do extrato na pele.

4.3 Desenvolvimento da formulação contendo o extrato de *C. obtusa*, adicionada ou não, de promotores de absorção

As formulações passaram por um processo de triagem, no qual foram submetidas ao estudo de estabilidade preliminar como descrito no Guia de estabilidade de produtos cosméticos (ANVISA) (resultados não mostrados). Devido à dificuldade em incorporar-se 4% de extratos naturais em formulações e mantê-las estáveis, decidiu-se por uma formulação contendo um agente espessante capaz de formar uma emulsão de silicone sem a necessidade de submeter nenhum dos componentes da formulação ao aquecimento.

As emulsões de silicone foram preparadas com o auxílio do agente espessante Sodium Polyacrylate (and) Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) Trideceth-6 (and) PEG/PPG 18/18 Dimethicone. O agente espessante é uma emulsão invertida (A/O) de poliacrilato de sódio em dimeticona. Essa emulsão também contém dois surfactantes e um emulsificante de silicone (PEG/PPG-18/18 Dimeticone). Quando o agente espessante é adicionado à água ocorre a formação de uma emulsão óleo-em-água, o polímero expande-se instantaneamente na fase aquosa para espessar e dar estabilidade à formulação. Na medida em que a formulação espessa, os ingredientes da fase oleosa são emulsificados e estabilizados.

Emulsões de silicone são mais resistentes a flutuações de temperatura, tensão de cisalhamento, oxidação, e à adição de produtos químicos (Purohit e Somasundaran, 2014). Assim, utilizou-se um agente espessante à base de silicone ajudasse com o objetivo de auxiliar na estabilização da formulação com 4% de extrato. Para avaliar de forma clara o efeito e a penetração dos componentes do extrato, as formulações foram desenvolvidas com uma composição simples, apenas variando o promotor de absorção (oleato de isodecila ou óleo de macadâmia).

4.4 Avaliação da estabilidade física, físico-química e funcional das formulações

Os parâmetros mais importantes para as emulsões farmacêuticas e cosméticas são a estabilidade física e química do produto acabado, o que está relacionado com a manutenção das características do produto por um período de tempo definido. A estabilidade de uma emulsão é caracterizada pela ausência de coalescência da fase interna, pela ausência de "creaming" e pela

manutenção da uniformidade e das características físicas, manutenção do aspecto, odor, cor e outras propriedades físicas. O estudo de estabilidade avaliou a variação das características do produto com o tempo em elevada temperatura e umidade. Nenhuma das formulações apresentou separação de fase no teste de centrifugação durante o tempo de estudo de 6 meses. Em relação às características organolépticas, observou-se que a adição do extrato levou a uma formulação mais fluida com coloração castanha escura e odor adocicado. As formulações tenderam a escurecer com o tempo e, após 6 meses, todas as formulações estavam consideravelmente mais escuras do que no início do estudo, apesar de não apresentarem sinais visíveis de instabilidade.

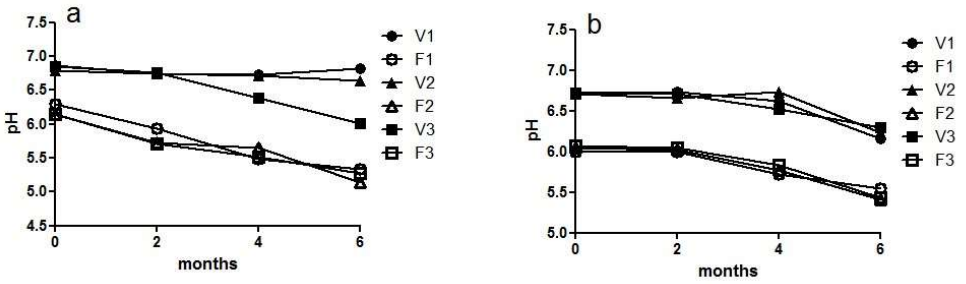
4.4.1 Estabilidade físico-química

O pH das formulações foi avaliado para detectar alterações de pH durante o armazenamento e para assegurar que o pH era compatível com os componentes da formulação e com o local de aplicação, a fim de evitar irritação. A adição do extrato ao veículo diminuiu o pH de aproximadamente 6,8 para 6,1. O valor inicial encontrado (pH = 6) para as formulações apresentou-se próximo do pH da pele (entre 4,6 e 5,8) e portanto não foi ajustado, visando evitar a desestabilização das emulsões, visto que o agente de viscosidade permanece estável na faixa de 5,5 a 11.

A Fig. 24 mostra a variação de pH das formulações e veículos submetidos à estocagem em 40°C e 4°C. Durante o tempo de armazenamento, o pH variou nas formulações armazenadas a 40 °C (Fig. 24a) e 4 °C (Fig. 24b), e F1, F2 e F3 exibiram semelhantes variações de pH. Da primeira até a última medição, as formulações armazenadas a 4°C e 40°C tiveram diminuições de pH de 0,53 e 0,94, respectivamente. Os veículos também tiveram o pH diminuído em aproximadamente 0,53. No mês 4, o pH das formulações armazenadas a 40 °C atingiu o valor mais baixo no qual o agente espessante é estável (5,5-11).

As variações de pH indicaram que o próprio veículo não foi capaz de manter o valor de pH constante durante os 6 meses, o que indica que pode ter ocorrido, por exemplo um processo de peroxidação lipídica, especialmente em resposta à incubação a 40°C. A peroxidação lipídica é um processo natural que poderia ser facilmente contornado com a adição de um antioxidante sintético e o pH poderia ter sido mantido com a utilização de um tampão ao invés de água deionizada. Entretanto, como o objetivo foi avaliar o comportamento do extrato sem interferentes, não houve incorporação de aditivos. A incubação a 40°C das formulações contendo o extrato foi responsável pela maior variação no pH, e não foram observadas diferenças relevantes entre F1, F2 e F3.

Figura 24. pH das diferentes formulações acondicionadas a 40°C (a) e 4°C (b) em 0, 2, 4 e 6 meses.



F1/V1: formulação e veículo sem promotor de absorção; F2/V2: formulação e veículo com oleato de isodecila; F3/V3 formulação e veículo com óleo de macadâmia. Resultados são representados como média de 3 determinações.

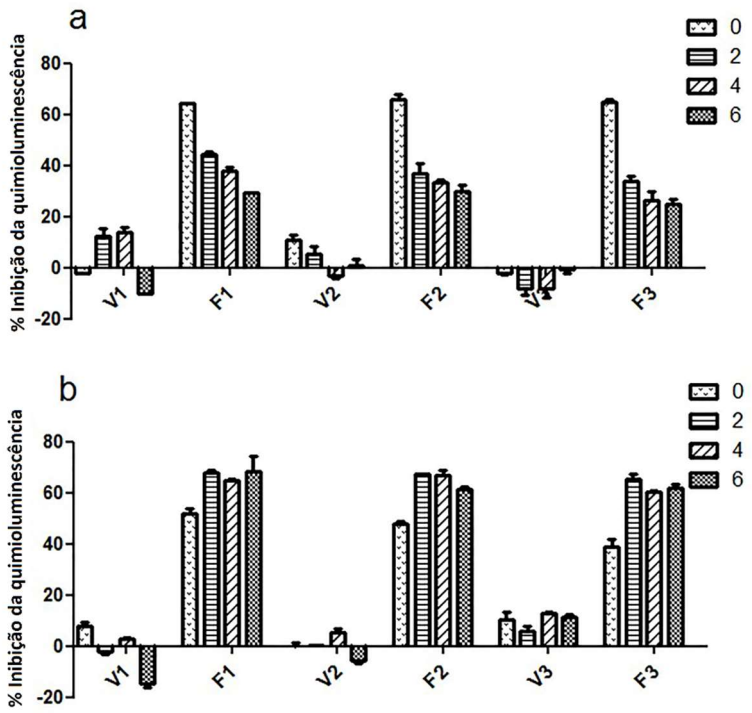
4.4.2 Estabilidade funcional

A atividade antioxidante foi analisada para verificar se se houve interação entre os componentes da formulação e os componentes do extrato durante o período de armazenamento. A atividade antioxidante do extrato na formulação foi comparada à atividade antioxidante do extrato como matéria prima. Os resultados mostraram que o extrato na formulação e na matéria prima apresentaram a mesma atividade antioxidante. Isto sugere que não houve interação entre os componentes do extrato e da formulação, ou se houve a interação não levou à perda da atividade.

Conforme apresentado na Fig. 25, F1, F2 e F3 foram estáveis a 4°C e as análises de 0 para 2 meses revelaram que a inibição da quimioluminescência foi maior para a segunda medição, o que demonstrou que em baixa temperatura, foi necessário tempo para o extrato ser adequadamente incorporado na formulação.

Para F1, F2 e F3 incubadas a 40°C, a inibição da quimioluminescência diminuiu em aproximadamente 40% entre 0 e 2 meses, e após este período não foi observada qualquer diminuição significativa na atividade. A diminuição da inibição da quimioluminescência não foi observada para as formulações armazenadas a 4°C entre 0 e 2 meses, assim, esta perda de atividade não poderia ser explicada devido a interações entre os componentes da formulação e do extrato. É possível que alguns dos componentes do extrato (possivelmente o ácido clorogênico) tenham sido degradados devido à temperatura, já que sabe-se que o ácido clorogênico é mais sensível do que flavonoides C-glicosídeos em relação à variações ambientais (Ortmann, 2013).

Figura 25. Estabilidade funcional pela medida da atividade antioxidante das formulações acondicionadas a 40°C (a) e a 4°C (b) em 0, 2, 4 e 6 meses.



F1/V1: formulação e veículo sem promotor de absorção; F2/V2: formulação e veículo com oleato de isodecila; F3/V3 formulação e veículo com óleo de macadâmia. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3).

Também é possível que tenha ocorrido um processo de peroxidação lipídica na formulação. Dessa forma, o extrato pode ter atuado como antioxidante e protegido a formulação da degradação, o que diminuiria a atividade antioxidante final da formulação ou os produtos de degradação devido à temperatura podem ter favorecido alterações oxidativas. A peroxidação lipídica constitui a principal causa da deterioração dos lipídios e substâncias graxas. Afastados do seu contexto de proteção natural, tais substâncias sofrem, no decurso de processos de transformação e armazenamento, alterações do tipo oxidativas, as quais têm consequências como a modificação da cor original e o aparecimento de odores característicos de ranço. Além disso, mudanças extremas de pH também podem ser um sinal de peroxidação lipídica. (Wagemaker, 2013).

4.4.3 Estabilidade física por avaliação do comportamento reológico das formulações

A análise reológica é de fundamental importância no desenvolvimento, na caracterização físico-química e no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e cosméticos. Formulações estáveis não devem apresentar alterações em seus reogramas sob

condições semelhantes de temperatura e tensão de cisalhamento. Os principais sinais de instabilidade aparecem na forma de cristais e inflexões, valores mais baixos de tensão de cisalhamento máxima e alteração na área de histerese (Martin *et al.*, 1993). Estas mudanças ocorrem como um processo de desestabilização e refletem a destruição da resistência da malha ao cisalhamento e formação de uma malha menos resistente. O comportamento do reograma é consistente com as mudanças físicas na formulação (Pena *et al.*, 1993).

A caracterização reológica avaliou o índice de fluxo, a tixotropia e a viscosidade aparente. O índice de fluxo de todas as formulações foi menor que 1, indicando comportamento pseudoplástico, que possui como característica a formação de um filme na superfície da pele. Este comportamento é o mais comum em formulações cosméticas, e é caracterizado por uma diminuição gradual da viscosidade aparente com um aumento na tensão de cisalhamento (Leonardi e Maia Campos, 2001).

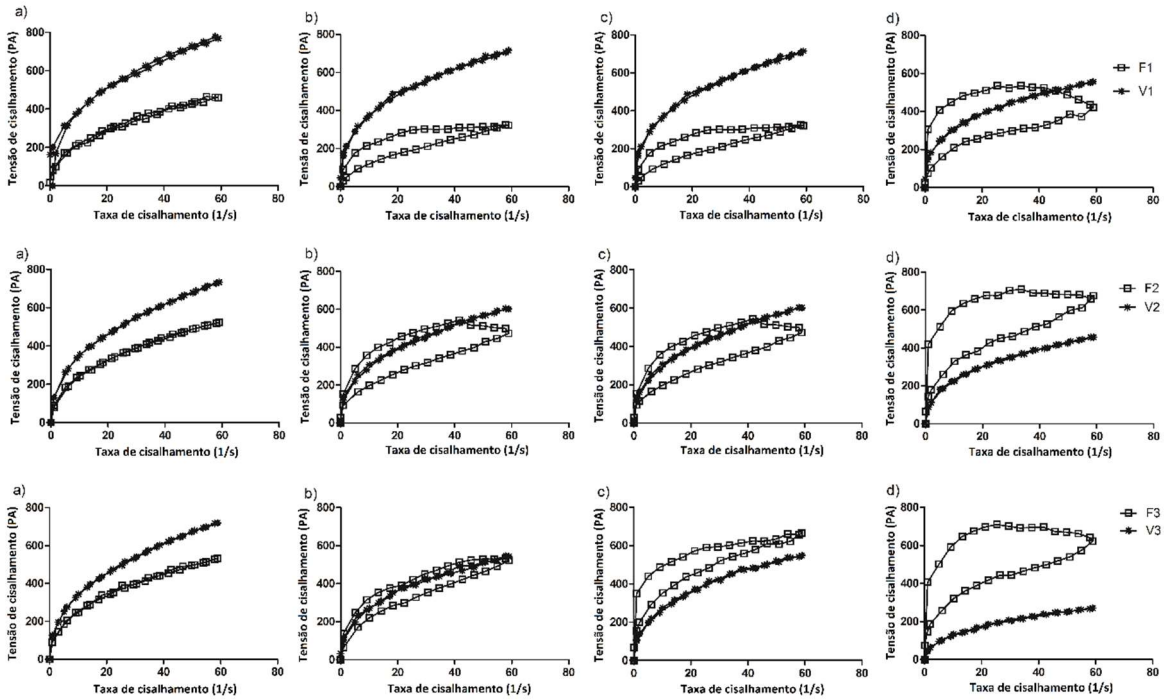
A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (Leonardi e Maia Campos, 2001). Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (Almeida e Bahia, 2003; Corrêa *et al.*, 2005). Para todas as formulações a viscosidade aparente diminuiu com a adição do extrato. Para F2 e F3, esta diferença foi de aproximadamente 3,1 Pa.s, enquanto que para F1, a diferença foi de 4,6 Pa.s. V1, V2 e V3 armazenados a 40° C apresentaram uma viscosidade aparente mais elevada no mês 0 do que no mês 6, enquanto que as mesmas amostras armazenadas a 4° C apresentaram viscosidade aparente no mês 0 inferior do que no mês 6. F1, F2 e F3 apresentaram viscosidade aparente no mês 0 inferior do que no mês 6, tanto para 40° C como para 4° C. Embora este parâmetro tenha variado para todas as 6 formulações, os valores absolutos das diferenças entre 0 e 6 meses variaram apenas entre 0,47 a 1,95 Pa.s, portanto, a viscosidade aparente não foi um parâmetro indicativo de mudanças significativas na estabilidade.

A tixotropia é definida como a redução da viscosidade aparente sob pressão, seguido de uma recuperação gradual quando a pressão é removida. As formulações tópicas com caráter tixotrópico são bastante almejadas, pois elas se deformam durante a aplicação, tornando-se mais fluídas e facilitando o espalhamento e recuperam a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Entretanto, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação e também um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (Gaspar e Maia Campos, 2003). Além disso, os produtos com caráter tixotrópico tendem a aumentar a

vida de prateleira ("shelf-life"), pois durante o armazenamento, apresentam viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (Martin *et al.*, 1993).

A Fig. 26 apresenta os reogramas das formulações armazenadas a 40° C durante 6 meses. As amostras armazenadas a 4° C não apresentaram alterações significativas (reogramas não mostrados). Os veículos não apresentaram comportamento tixotrópico no tempo 0 e as formulações adicionadas do extrato apresentaram comportamento tixotrópico, evidenciado pela formação da área de histerese, mesmo que pequena. As formulações adicionadas do extrato apresentaram valores mais baixos de tensão de cisalhamento máxima, o que foi considerado apenas como alteração na característica física da formulação e não instabilidade, já que o reograma não sofreu mudanças a 4°C durante o tempo de estudo.

Figura 26. Reogramas das formulações armazenadas a 40° C em 0 (a), 2 (b), 4 (c) e 6 (d) meses.



F1/V1: formulação e veículo sem promotor de absorção; F2/V2: formulação e veículo com oleato de isodecila; F3/V3 formulação e veículo com óleo de macadâmia. Resultados são representados como média de 3 determinações.

Observou-se tixotropia para F1, F2 e F3 e a presença do extrato aumentou significativamente a área de histerese em relação aos veículos. V1, V2 e V3 apresentaram pequenas áreas de histerese, que demonstraram pequena variação a 40° C e a 4° C. No entanto, opostamente a F1, F2 e F3, os veículos apresentaram comportamento reopético. Para F1, F2 e

F3 armazenados a 4° C, as áreas de histerese foram menores do que para as formulações armazenadas a 40° C. Para F1, F2 e F3, as áreas de histerese aumentaram entre os meses 0 e 2, o que indica uma reorganização molecular da formulação, uma vez que as mesmas amostras a 4° C também apresentaram este comportamento, porém em menor proporção. Entre 2 e 4 meses, não houve alteração nas áreas de histerese para as formulações armazenadas a 40° C e a 4° C.

No entanto, entre 4 e 6 meses, as áreas de histerese aumentam três vezes para F1 e F3, e duas vezes para F2. Além disso, no mês 4 o pH atingiu o valor mínimo aceitável para o agente espessante. A tixotropia é uma característica desejável numa formulação tópica porque impede que a formulação escorra sobre a pele e ajuda a manter a estabilidade. Neste estudo, a maior tixotropia provavelmente ajudou a manter a estabilidade das formulações armazenadas a 40° C até o mês 4. O pH e a tixotropia sofreram alteração acentuada do mês 4 para o mês 6, portanto provavelmente as formulações se tornaram instáveis, embora não tenha ocorrido separação de fases.

Apesar de F2 apresentar maior área de histerese nas medidas intermediárias (Fig. 26), todas as formulações contendo o extrato acondicionadas a 40°C apresentaram aproximadamente o mesmo valor no tempo 6 meses. Este valor (12130 Pas/s) é aproximadamente 40 vezes maior do que o apresentado pelas mesmas formulações acondicionadas a 4°C (331 Pas/s). A medida da tixotropia foi o parâmetro que sofreu maior alteração com o processo de acondicionamento e indica que ocorreram mudanças físicas na formulação.

Enquanto para a medida da atividade antioxidante foi possível observar uma grande diferença do tempo 0 para 2 meses, a área de histerese apresentou mudança significativa no comportamento reológico do tempo 4 para 6 meses, demonstrando que o extrato perdeu atividade antes da formulação sofrer uma grande desestruturação, possivelmente devido à degradação pela elevada temperatura.

Estes resultados reafirmam a necessidade de realizar-se estudos de estabilidade durante 6 meses. Enquanto o ICH padroniza o estudo acelerado de estabilidade por 6 meses, vários outros pesquisadores têm realizado estudos acelerados por períodos mais curtos, e esses estudos subestimam as mudanças reais e reorganizações que ocorrem nas formulações. Embora o pH tenha alterado entre 4 e 6 meses, todas as formulações armazenadas a 4° C foram funcionais ao longo de todo o tempo de armazenamento e mantiveram as suas características reológicas.

A 40° C, V1, V2 e V3 foram estáveis, enquanto F1, F2 e F3 apresentaram estabilidade funcional reduzida no mês 2 e apresentaram alterações reológicas no mês 6. O extrato foi incorporado com sucesso no veículo e não resultou em mudanças substanciais na estabilidade

até o mês 4. Apesar das alterações sofridas pela formulação, é possível que o agente espessante tenha contribuído de forma positiva para a manutenção da estabilidade, devido ao aumento da viscosidade aparente após o tempo de estocagem. As alterações na estabilidade possivelmente poderiam ser corrigidas através de pequenas alterações na formulação, como a adição de um antioxidante sintético. No entanto, as formulações não foram ajustadas para este estudo, uma vez que era importante avaliar o efeito do extrato sem interferentes.

4.5 Estudo *in vitro* de Penetração/Retenção dos componentes do extrato na pele humana

4.5.1 Escolha do solvente extrator e avaliação da recuperação

As emulsões podem ser desenvolvidas para facilitar a penetração do ativo na pele. O último passo da administração tópica de ativos é a difusão destes através do estrato córneo, o que significa que as moléculas do ativo devem passar através do estrato córneo e penetrar nas camadas mais profundas da pele. A administração tópica de antioxidantes naturais proporciona uma eficiente maneira de enriquecer o sistema endógeno antioxidante de proteção cutânea, e portanto, pode ser uma estratégia eficaz para diminuir o dano oxidativo na pele. Assim, o sucesso desse tipo de produto depende da sua capacidade de penetrar até as camadas mais profundas da pele, onde ocorre a geração de EROs (Saija *et al.*, 1998; Avila Acevedo *et al.*, 2014; Angelo *et al.*, 2016).

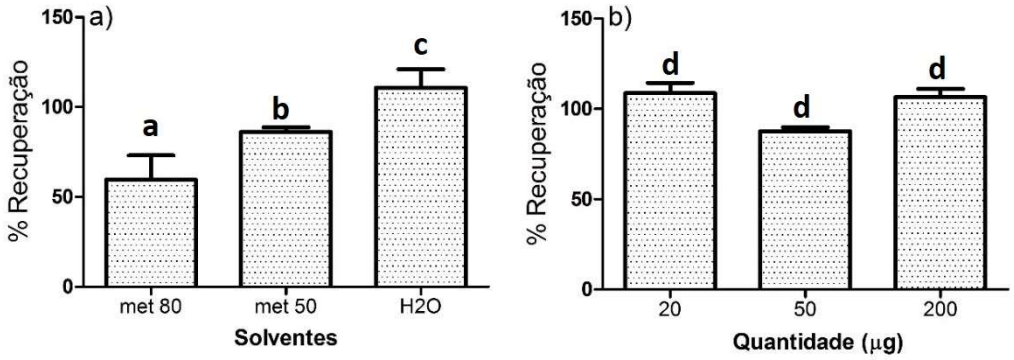
A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada ao material teste, que é extraída, e indica se o método fornece uma resposta adequada para a quantidade de analito que está presente na amostra (Causon, 1997). A escolha adequada do solvente extrator é um importante fator na padronização do procedimento de extração, pois o solvente deve ser capaz de extrair todos os componentes do extrato que ficam retidos na pele sem extrair as substâncias antioxidantes endógenas da pele. Cinquenta microgramas de extrato foram adicionados à pele e água, metanol 50% e 80% foram testados no processo de recuperação. A análise da recuperação foi realizada por CLAE e verificou-se que não houve interferência dos compostos antioxidantes endógenos da pele para nenhum dos solventes testados. Todos os compostos da pele foram eluídos até 3 minutos, o que evitou a co-eluição com as substâncias presentes no extrato, demonstrando a seletividade do método.

Conforme apresentado na Fig. 27a, a extração com metanol 50% e 80% resultou em 86% e 60% de recuperação da quantidade de extrato adicionado à pele, respectivamente. A extração com água resultou em maior porcentagem de recuperação (110%), e, portanto, este foi o solvente escolhido para proceder com os testes de recuperação. O processo proposto mostrou

ser eficiente para extração dos componentes do extrato da pele, que deve ser superior a 80% (Bronaugh *et al.*, 1999).

A fim de verificar-se a sensibilidade do método para o processo de extração tanto para baixas quanto para altas concentrações, a pele foi enriquecida com diferentes quantidades de extrato (Fig. 27b) e verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras, sendo que a recuperação variou de 89% a 108%.

Figura 27. **Recuperação dos diferentes solventes testados (a) e das diferentes quantidades de extrato quando extraído em água (b).**



met: metanol. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). Mesmas letras significam que média não foi diferente após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

4.5.2 Estudos *in vitro* de penetração

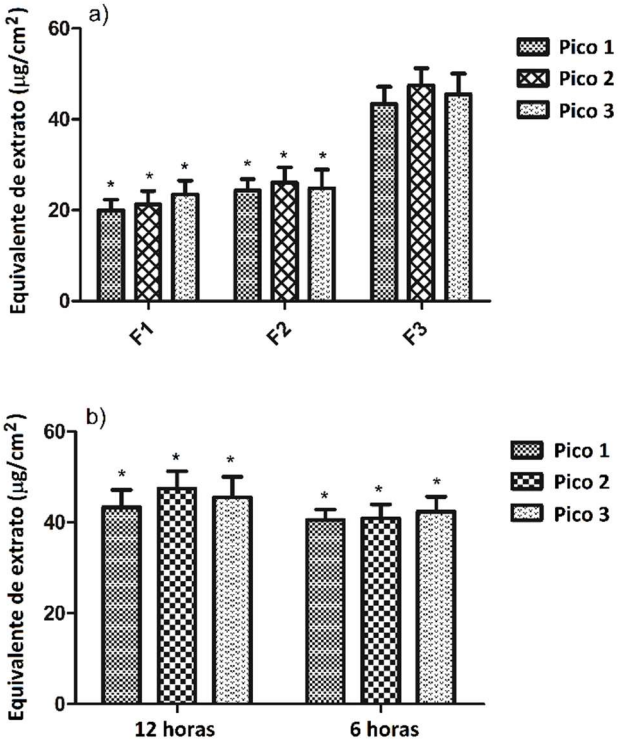
Para que as formulações tópicas apresentem efeito fotoquimioprotetor é necessário que os compostos antioxidantes ultrapassem o estrato córneo e que fiquem retidos nas camadas mais inferiores da pele, onde ocorre a geração de EROs induzida pela radiação ultravioleta. No entanto, a penetração dos compostos antioxidantes encontrados nos extratos vegetais através da pele é limitada, e o sucesso no uso desses agentes por aplicação tópica depende do uso de formulações que possam aumentar sua penetração (Nichols e Katiyar, 2010). Promotores de penetração são frequentemente utilizados para este fim. O promotor de absorção ideal deve ser não alergenico e ter ação reversível sobre a pele (Lane, 2013).

Os ésteres, tais como oleato de isodecila são um, dentro de muitos grupos de promotores de penetração. Os ácidos graxos são também conhecidos por facilitarem a penetração de fármacos através da pele (Lane, 2013). A composição química do óleo de macadâmia é superior a 60% de ácido oleico (Poudyal *et al.*, 2013), que conhecidamente melhora a penetração cutânea, aumentando a taxa de difusão através de um efeito de desorganização dos lipídios cutâneos, o que aumenta a fluidez lipídica da membrana (Mostafa *et al.*, 2015). Nenhum

promotor de absorção foi adicionado a F1/V1. Óleo de macadâmia foi adicionado à F2/V2 e oleato de isodecila foi adicionado à F3/V3. A penetração dos componentes do extrato na pele foi avaliada por HPLC e a quantidade das substâncias referentes aos picos 1, 2 e 3 que penetraram na pele foi expressa como equivalentes de extrato.

A Fig. 28a mostra as quantidades de extrato que penetraram na pele para F1, F2 e F3 em 12 horas, expressas em função de cada pico majoritário. Os equivalentes de extrato que penetraram na pele foram, respectivamente, 21, 25 e 45 μg/cm^2 para F1, F2 e F3, e as quantidades correspondentes de ácido clorogênico foram, respectivamente, 1,12, 1,34 e 2,41 μg/cm^2, o que corrobora o resultado apresentado anteriormente, que mostrou que a porcentagem de ácido clorogênico no extrato é 5,4%.

Figura 28. Penetração das diferentes formulações em função da concentração de extrato em 12 horas (a) e comparação da penetração de F3 em 12 e 6 horas (b).



F1/V1: formulação e veículo sem promotor de absorção; F2/V2: formulação e veículo com oleato de isodecila; F3/V3 formulação e veículo com óleo de macadâmia. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). * média não foi diferente entre as amostras após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

A penetração de F1 não foi significativamente diferente de F2, portanto, a adição de óleo de macadâmia não aumentou a penetração dos componentes do extrato da formulação desenvolvida contendo o extrato de *C. obtusa*. Todas as formulações continham propilenoglicol e tridecet-6 (agente espessante), que é um éter de polietilenoglicol do álcool tridecílico. Ambas

substâncias podem ter aumentado a penetração das formulações, sendo possível que estes ingredientes tenham melhorado a penetração de todas as formulações.

Além disso, a partir da Fig. 28a pode-se concluir que para todas as formulações a penetração dos 3 picos foi associada com a mesma quantidade de extrato, o que mostra que não ocorreu o favorecimento da penetração de um pico específico para nenhuma das formulações. Sabe-se que promotor de absorção precisa ser combinado com o ativo (Lane, 2013). Para o extrato de *C. obtusa*, a formulação contendo oleato de isodecila (F3) dobrou a quantidade de compostos do extrato que penetraram na pele em comparação com F1 e F2. Como não houve favorecimento da penetração de nenhuma substância específica, o mecanismo pelo qual o oleato de isodecila foi capaz de aumentar a penetração provavelmente está relacionado com uma ação reversível sobre pele, tal como um aumento na fluidização lipídica ou hidratação da pele, e não à capacidade do promotor em ligar-se a uma substância específica e alterar as suas características físico-químicas para aumentar a sua solubilidade.

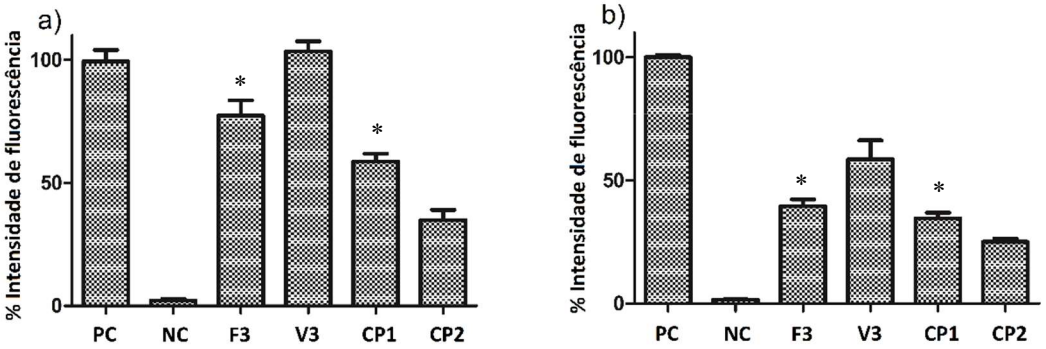
Uma vez que F3 foi responsável por promover a penetração do dobro de componentes na pele, esta formulação foi escolhida para a realização dos próximos estudos. Para avaliar se o extrato manteria a penetração em menor tempo experimental, o ensaio foi conduzido durante 6 horas (Fig. 28b). A penetração foi mantida em 6 horas, e quantidade de extrato penetrada variou de 41 µg/mL em 6 horas para 45 µg/mL em 12 horas.

4.6 Avaliação da fotoproteção da formulação contendo oleato de isodecila

As plantas medicinais e seus extratos são ricos em compostos com variadas estruturas químicas e diferente grau de atividade. Estes constituintes podem apresentar propriedades protetoras contra o dano celular e complementar a fotoproteção UV (Skotarczak *et al.*, 2015). Visando obter-se um efeito fotoprotetor semelhante ao efeito previamente demonstrado para o extrato, 4% do extrato de *C. obtusa* foi adicionado à formulação. A Fig. 29 mostra o efeito fotoprotetor de F3 para as radiações UVA (Fig. 29a) e UVB (Fig. 29b).

Para UVB, F3 foi equivalente a CP 1. Ambos V3 e F3 absorveram a radiação e diminuíram a formação de EROs. No entanto F3 conferiu proteção adicional e diminuiu a formação de EROs em 19% em comparação a V3, o que demonstrou a capacidade do extrato em absorver a radiação. Para UVA, V3 não absorveu a radiação, e F3 diminuiu a formação de EROs em 23% em comparação com o PC. Para UVA, F3 também foi equivalente a CP 1. Foi observada diferença entre a proteção UVA e UVB, contudo é possível que a proteção UVB tenha sido superestimada devido ao veículo também ter absorvido a radiação.

Figura 29. Fotoproteção oferecida pela formulação (F3) e veículo (V3) contendo oleato de isodecila para as radiações UVA (a) e UVB (b).



PC: Controle positivo, NC: controle negativo, CP: produto comercial. Resultados são representados como média ± erro padrão (n=3). * média não foi estatisticamente diferente entre as amostras após análise de variância seguida pelo teste de Tukey para $p < 0,05$.

Além disso, uma apigenina glicosilada e duas luteolinas glicosiladas foram identificadas no extrato, e sabe-se que a apigenina e a luteolina são fortes antioxidantes que retardam o processo de envelhecimento e os danos moleculares induzidos pelas EROs induzidas pela radiação UVA e UVB. Alguns trabalhos também mostraram que essas substâncias podem ser empregadas como filtros UV adicionais, capazes de absorver a radiação e reduzir a transmissão UV. Assim, a resultante redução de fótons que atingem a epiderme também é uma linha de defesa relevante oferecida pela apigenina e luteolina (Hwang *et al.*, 2011; Wölfle *et al.*, 2011). Portanto, é possível que o efeito do extrato sobre o equilíbrio do estado redox celular em resposta à radiação UVA e a capacidade do extrato de absorver radiação estejam relacionados à atividade dessas substâncias. F3 absorveu com sucesso as radiações UVA e UVB e a promoveu a penetração de extrato em pele humana. Assim, estes resultados sugerem que esta formulação pode absorver radiação e possuir atividade antioxidante na pele, o que demonstra o efeito fotoquimioprotetor da formulação.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos biológicos e composição química da espécie *Cecropia obtusa*, e apresentou resultados que não haviam sido previamente relatados ou explorados na literatura. Foi possível identificar, através da utilização de espectrometria de massas, os componentes majoritários do extrato: ácido clorogênico, Luteolina-C-hexosídeo, Luteolina-C-hexose-O-desoxi-hexose e Apigenina-C-hexose-O-desoxi-hexose. Estes compostos, que haviam sido relatados em outros gêneros de Cecropia, foram relatados pela primeira vez em *C. obtusa*. Além disso, a identificação desses compostos foi relevante para o desenvolvimento de um método cromatográfico que demonstrou-se válido para análise dos constituintes do extrato e para a análise dos mesmos nas peles, viabilizando a avaliação da penetração dos compostos do extrato em pele humana.

O extrato exibiu elevada atividade antioxidante *in vitro*, que foi mantida em cultura de células. Além disso, o extrato também apresentou promissora atividade fotoquimioprotetora em cultura de células e foi capaz de proteger contra a formação de espécies reativas do oxigênio, diminuir a formação de peróxidos lipídicos, aumentar o conteúdo de glutationa reduzida, aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, diminuir a formação de proteína carbonilada, aumentar os conteúdos de colágeno e ácido hialurônico, e diminuir a atividade da metaloproteinase-1.

Foi possível incorporar, com sucesso, 4% do extrato em uma formulação do tipo emulsão de silicone em água, que foi capaz de manter a estabilidade até 4 meses. Os experimentos de penetração demonstraram que a formulação com oleato de isodecila dobrou a quantidade de extrato penetrado na pele em comparação com as outras duas formulações. Porém todas as formulações foram capazes de promover a penetração do extrato sem promover o favorecimento de uma substância sobre as outras. Isso é importante pois se houvesse favorecimento da penetração de alguma substância, provavelmente a atividade fotoquimioprotetora observada em cultura de células não seria reprodutível na pele. Além disso, a formulação também foi capaz de manter a atividade do extrato de absorção da radiação, o que sugere a incorporação do extrato de *C. obtusa* em formulações contendo filtros, visando aumentar o espectro de absorção e promover um efeito atenuador do estresse oxidativo na pele. Testes em pele humana ainda são necessários para confirmar o efeito fotoquimioprotetor da formulação desenvolvida, e para avaliar a segurança da formulação para aplicação tópica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat Res,** v. 571, n. 1-2, p. 153-73, 2005. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107 (Linking).

AKAZAWA-OGAWA, Y. et al. Singlet-oxygen-derived products from linoleate activate Nrf2 signaling in skin cells. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 79, p. 164-175, 2// 2015. ISSN 0891-5849. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914014002 >.

ALDINI, G. et al. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. **Med Res Rev,** v. 27, n. 6, p. 817-68, Nov 2007. ISSN 0198-6325 (Print)
0198-6325.

ALMEIDA, I.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries,** v. 15, n. 3, p. 96-100, 2003.

AN, F. et al. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in Trollius chinensis Bunge in D-galactose-aged mice. **Neural Regeneration Research**, India**,** v. 7, n. 33, p. 2565-2575, 2012. ISSN 1673-5374
1876-7958. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4200723/ >.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia on streptozotocin diabetic rats. **J Ethnopharmacol,** v. 78, n. 2-3, p. 145-9, 2001. ISSN 0378-8741 (Print)
0378-8741 (Linking).

ANGELO, T. et al. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. **Journal of Chromatography B,** v. 1022, p. 81-86, 6/1/ 2016. ISSN 1570-0232. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023216302306 >.

ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology,** v. 26, n. 4, p. 347-357, 7// 2008. ISSN 0738-081X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X08000059 >. Acesso em: 2008/8//.

AVILA ACEVEDO, J. G. et al. Photoprotection of Buddleja cordata extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014. ISSN 1472-6882. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-281 >.

BALBOA, E. M. et al. Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics. **Industrial Crops and Products,** v. 58, p. 104-110, 7// 2014. ISSN 0926-6690. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014001897 >.

BARCHOWSKY, A.; FRLETA, D.; VINCENTI, M. P. Integration of the NF-κB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and

TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. **Cytokine,** v. 12, n. 10, p. 1469-1479, 2000. ISSN 1043-4666.

BARDINI, G.; LOURENÇO, D.; FISSMER, M. C. Avaliação do conhecimento e hábitos de pacientes dermatológicos em relação ao câncer da pele. **ACM Arq Catarin Med,** v. 41, p. 56-63, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova,** v. 29, p. 113-123, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&nrm=iso >.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem,** v. 44, n. 1, p. 276-87, Nov 1971. ISSN 0003-2697 (Print)
0003-2697.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature,** v. 181, n. 4617, p. 1199-200, 1958.

BOETTLER, U. et al. Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. **Mol Nutr Food Res,** v. 55, n. 5, p. 798-802, May 2011. ISSN 1613-4125.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol In Vitro,** v. 2, n. 1, p. 1-6, 1988. ISSN 0887-2333 (Print)
0887-2333.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue culture methods,** v. 9, n. 1, p. 7-9, 1985/03/01 1985. ISSN 0271-8057. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/BF01666038 >.

BOSCH, R. et al. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. **Antioxidants,** v. 4, n. 2, p. 248-268, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)
0003-2697.

BRANGO-VANEGAS, J. et al. Glycosylflavonoids from Cecropia pachystachya Trecul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine,** v. 21, n. 5, p. 670-5, 2014. ISSN 1618-095X (Electronic)
0944-7113 (Linking).

BRASIL. ANVISA. Ministério da Saúde. Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Resolução nº899. 29 de maio de 2003.

BREITER, T. et al. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. **Food Chem,** v. 128, n. 2, p. 338-47, 2011. ISSN 0308-8146 (Print)
0308-8146 (Linking).

BRODSKY, B.; PERSIKOV, A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. **Advances in protein chemistry,** v. 70, p. 301-339, 2005. ISSN 0065-3233.

BRONAUGH, R. L. et al. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. **Drugs and the pharmaceutical sciences,** v. 97, p. 229-234, 1999. ISSN 0360-2583.

CABRAL, L. D. S. P., S.O.; PARTATA, A.K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no brasil. **Revista Científica do ITPAC,** v. 4, n. 3, p. Pub. 4, 2011.

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P.; CALABRESE, V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. **Human & experimental toxicology,** v. 29, n. 12, p. 980-1015, 2010. ISSN 0960-3271.

CAMARGO JUNIOR, F. B. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo pantenol e avaliação dos seus efeitos hidratantes na pele humana por bioengenharia cutânea**. 2006. (Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J Photochem Photobiol B,** v. 84, n. 1, p. 21-7, 2006. ISSN 1011-1344 (Print)
1011-1344 (Linking).

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,** v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997. ISSN 0378-4347.

CERUTTI, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science,** v. 227, n. 4685, p. 375-81, 1985. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking).

CESAR, P. H. S.; DE MOURA OLIVEIRA, C. H.; MARCUSSI, S. Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from Pereskia grandifolia leaves. **Journal of Medicinal Plants Research,** v. 9, n. 7, p. 216-222, 2015. ISSN 1996-0875.

CHANMAHASATHIEN, W. et al. Flavonoid glycosides from Cecropia adenopus. **Natural medicines,** v. 58, n. 1, 2004.

CHAUDHURI, A. R. et al. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. **Mechanisms of Ageing and Development,** v. 127, n. 11, p. 849-861, 11// 2006. ISSN 0047-6374. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637406001953 >.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cell Mol Life Sci,** v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking).

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **J Am Acad Dermatol,** v. 67, n. 5, p. 1013-24, 2012. ISSN 1097-6787 (Electronic) 0190-9622 (Linking).

CHEN, W.-C. et al. Effect of Topical Application of Chlorogenic Acid on Excision Wound Healing in Rats. **Planta Med,** v. 79, n. 08, p. 616-621, 23.05.2013 2013. ISSN 0032-0943.

CHEN, W.-P. et al. Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1β-induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. **International Immunopharmacology,** v. 11, n. 1, p. 23-28, 1// 2011. ISSN 1567-5769. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576910003139 >.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova,** v. 31, p. 623-636, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000300030&nrm=iso >.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **J Agric Food Chem,** v. 51, n. 10, p. 2900-11, 2003. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking).

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 41, n. 1, 2005.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of Cecropia Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 22, p. 1096-1102, 2011. ISSN 0103-5053. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532011000600014&nrm=iso >.

COURANT, F. et al. Basics of mass spectrometry based metabolomics. **PROTEOMICS,** v. 14, n. 21-22, p. 2369-2388, 2014. ISSN 1615-9861. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400255 >.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova,** v. 29, p. 287-292, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200020&nrm=iso >.

CRUZ, E. D. M. et al. Leishmanicidal activity of Cecropia pachystachya flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry,** v. 89, n. 0, p. 71-77, 2013. ISSN 0031-9422. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942213000368 >.

CVETANOVIC, A. et al. Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts. **Planta,** v. 242, n. 3, p. 721-32, Sep 2015. ISSN 0032-0935.

DAI, G. et al. Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases. **The American Journal of Pathology,** v. 171, n. 5, p. 1451-1461, 2007/11/01/ 2007. ISSN 0002-9440. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010624078 >.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta,** v. 329, n. 1-2, p. 23-38, Mar 2003. ISSN 0009-8981 (Print)
0009-8981.

DEEPHA, V. et al. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from Crotalaria globosa. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v. 121, p. 737-745, 2014. ISSN 1386-1425. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138614251301456X >.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews,** v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007. ISSN 1098-2787. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/mas.20108 >.

EPSTEIN, J. H. Biological effect of sunlight. In: (Ed.). **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect**. New York: Marcel Dekker, 1990.

FAGOT, D.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes. **Photochem Photobiol,** v. 79, n. 6, p. 499-505, Jun 2004. ISSN 0031-8655 (Print)
0031-8655.

FENG, R. et al. Inhibition of activator protein-1, NF-κB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **Journal of Biological Chemistry,** v. 280, n. 30, p. 27888-27895, 2005. ISSN 0021-9258.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova,** v. 25, p. 1003-1011, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000600018&nrm=iso >.

FIGUEIREDO, S. A. et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of Garcinia brasiliensis epicarp extract. **J Photochem Photobiol B,** v. 131, p. 65-73, Feb 05 2014. ISSN 1011-1344.

FISHER, G. J. et al. c-Jun–dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. **Journal of Clinical Investigation,** v. 106, n. 5, p. 663, 2000.

FISHER, G. J. et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature,** v. 379, n. 6563, p. 335-9, Jan 25 1996. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836.

GAGLIOTI, A. L. et al. **Conhecendo Espécies de Plantas da Amazônia: Embaúba (Cecropia obtusa Trécul – Urticaceae). Comunicado Técnico**. EMBRAPA. Belém, PA 2014.

GAO, F. et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan. **Journal of Biological Chemistry,** v. 283, n. 10, p. 6058-6066, 2008. ISSN 0021-9258.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int J Pharm,** v. 250, n. 1, p. 35-44, Jan 02 2003. ISSN 0378-5173 (Print)
0378-5173.

GAZAL, M. et al. Preventive Effect of Cecropia pachystachya Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochem Res,** v. 40, n. 7, p. 1421-30, Jul 2015. ISSN 0364-3190.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition),** v. 101, n. 8, p. 659-672, 2010/01/01/ 2010. ISSN 1578-2190. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157821901070696X >.

GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta,** v. 51, n. 4, p. 685-92, Apr 03 2000. ISSN 0039-9140.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. In: MEGADIVERSIDADE1 (Ed.), 2005.

GONZALEZ, H. et al. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. **BMC Dermatology,** v. 7, n. 1, p. 1, 2007. ISSN 1471-5945. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/1471-5945-7-1 >.

GREENWALD, R. A. **In: (Ed.). Handbook of methods for oxygen radical research.** Boca Raton, Flórida.: CBC press. cap. Catalase activity 283-284, 1986. 2.

GRONE, A. Keratinocytes and cytokines. **Vet Immunol Immunopathol,** v. 88, n. 1-2, p. 1-12, Sep 06 2002. ISSN 0165-2427 (Print)
0165-2427.

GUPTA, D. UV Absorbing Properties of Some Plant Derived Extracts. **RES J CHEM ENVIRON,** v. 1, n. 2, p. 34-36, 2013.

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. ISSN 0891-5849.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem,** v. 74, n. 1, p. 214-26, Jul 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

HUANG, B. et al. In vitro and in vivo evaluation of inhibition activity of lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) leaves against ultraviolet B-induced phototoxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 121, p. 1-5, 4/5/ 2013. ISSN 1011-1344. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413000328 >.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova,** v. 31, n. 5, 2008. ISSN 0100-4042.

HWANG, Y. P. et al. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. **Journal of Dermatological Science,** v. 61, n. 1, p. 23-31, 1// 2011. ISSN 0923-1811. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181110003324 >.

ICH-Q2(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

IZIDORO, T. C. **Influência da vitamina C sobre o dano cromossômico induzido pela radiação UV-A em fibroblastos humanos (linhagens XP 12RO-A e MRC-5)**. 2001. (Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto). Universidade de São Paulo.

JASZEWSKA, E. et al. UVA-induced ROS generation inhibition by Oenothera paradoxa defatted seeds extract and subsequent cell death in human dermal fibroblasts. **J Photochem Photobiol B,** v. 126, p. 42-6, Sep 5 2013. ISSN 1011-1344.

JIMÉNEZ, M. F. M. **Efecto protector de fraxetol y miricetina frente a la neurotoxicidad inducida por rotenona en células de neuroblastoma**. 2004. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 52, n. 1, p. 1-6, 1/1/ 2012. ISSN 0891-5849. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584911006058 >.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews,** v. 21, p. 16-29, 5// 2015. ISSN 1568-1637. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163715000033 >.

KAMOUR, R. et al. Development of fused-core silica HPLC columns and their recent pharmaceutical and biological applications: A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,** v. 5, n. Suppl 3, p. 926-930, 2013.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol,** v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, Jul-Aug 2002. ISSN 1167-1122 (Print) 1167-1122.

KENNY, O. et al. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry,** v. 161, p. 79-86, 10/15/ 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614005299 >.

KIM, H.-S.; QUON, M. J.; KIM, J.-A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox biology,** v. 2, p. 187-195, 2014. ISSN 2213-2317.

KIM, J. et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from Acer palmatum. **Archives of Pharmacal Research,** v. 28, n. 2, p. 8, 2005.

KIM, S. et al. Modulation of viability and apoptosis of UVB-exposed human keratinocyte HaCaT cells by aqueous methanol extract of laver (Porphyra yezoensis). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 141, p. 301-307, 12// 2014. ISSN 1011-1344. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414003200 >.

KIM, Y.-S. et al. Antioxidant activity and protective effects of Trapa japonica pericarp extracts against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage in Chang cells. **Food and Chemical Toxicology,** v. 64, p. 49-56, 2// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513007801 >.

KNAK, A. et al. Exposure of vitamins to UVB and UVA radiation generates singlet oxygen. **Photochem Photobiol Sci,** v. 13, n. 5, p. 820-9, May 2014. ISSN 1474-905x.

KOBAYASHI, Y. et al. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 30, n. 1, p. 35-40, 2008. ISSN 1468-2494. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00422.x >.

KOMOROWICZ, E. et al. Hyaluronic acid decreases the mechanical stability, but increases the lytic resistance of fibrin matrices. **Matrix Biology**, 2016. ISSN 0945-053X.

KONO, Y. et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,** v. 1335, n. 3, p. 335-342, 1997. ISSN 0304-4165.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry,** v. 84, n. 3, p. 329-339, 2// 2004. ISSN 0308-8146. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002164 >.

KURDYKOWSKI, S. et al. Ultraviolet-B irradiation induces differential regulations of hyaluronidase expression and activity in normal human keratinocytes. **Photochem Photobiol,** v. 87, n. 5, p. 1105-12, Sep-Oct 2011. ISSN 0031-8655.

KWON, M.-J. et al. Superoxide dismutase 3 suppresses hyaluronic acid fragments mediated skin inflammation by inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway: superoxide dismutase 3 inhibits reactive oxygen species-induced trafficking of toll-like receptor 4 to lipid rafts. **Antioxidants & redox signaling,** v. 16, n. 4, p. 297-313, 2012. ISSN 1523-0864.

KWON, M.-J. et al. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. **Journal of dermatological science,** v. 67, n. 2, p. 81-87, 2012. ISSN 0923-1811.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 447, n. 1–2, p. 12-21, 4/15/ 2013. ISSN 0378-5173. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313001841 >.

LARANJINHA, J. A.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical pharmacology,** v. 48, n. 3, p. 487-494, 1994. ISSN 0006-2952.

LEE, K. et al. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. **European Journal of Pharmacology,** v. 689, n. 1–3, p. 89-95, 8/15/ 2012. ISSN 0014-2999. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299912004712 >.

LEONARDI, G.; MAIA CAMPOS, P. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding,** v. 3, n. 4, p. 154-156, 2001.

LIN, C. M. et al. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. **Planta Med,** v. 68, n. 4, p. 3, 2002. ISSN 0032-0943 (Print)
0032-0943 (Linking).

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta,** v. 763, p. 1-10, 2013. ISSN 0003-2670. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701201728X >.

LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry,** v. 9, n. 1, p. 31-59, 2009. Disponível em: < http://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2009/00000009/00000001/art00004 http://dx.doi.org/10.2174/138955709787001712 >.

LORENCINI, M. et al. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews,** v. 15, p. 100-115, 2014. ISSN 1568-1637. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163714000397 >.

LU, J. et al. Tiron Inhibits UVB-induced AP-1 binding sites transcriptional activation on MMP-1 and MMP-3 promoters by MAPK signaling pathway in human dermal fibroblasts. **PloS one,** v. 11, n. 8, p. e0159998, 2016. ISSN 1932-6203.

LUANGWATTANANUN, P. et al. Improving enzymatic activities and thermostability of a tri-functional enzyme with SOD, catalase and cell-permeable activities. **J Biotechnol,** v. 247, p. 50-59, Apr 10 2017. ISSN 0168-1656.

MAISONNEUVE, E. et al. Rules governing selective protein carbonylation. **PLoS One,** v. 4, n. 10, p. e7269, Oct 05 2009. ISSN 1932-6203.

MALSAWMTLUANGI, C. et al. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. **J.App.Pharm.Sci,** v. 3, n. 9, p. 150, 2013.

MANSUR, J. D. S. B., MÁRIO NEI RODRIGUES; MANSUR, MARIA CRISTINA D'ASCENÇÃO; AZULAY, RUBEM DAVID. Correlaçäo entre a determinaçäo do fator de proteçäo solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais brasileiros de dermatologia,** v. 61, n. 4, p. 6, 1986.

MANUSKIATTI, W.; MAIBACH, H. I. Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. **Int J Dermatol,** v. 35, n. 8, p. 539-44, 1996. ISSN 0011-9059 (Print)
0011-9059 (Linking).

MARESCA, V. et al. UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. **J Invest Dermatol,** v. 126, n. 1, p. 182-90, Jan 2006. ISSN 0022-202X (Print)
0022-202x.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 342, n. 1–2, p. 40-48, 9/5/ 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851730700364X >.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Rheology. Physical Pharmacy, Philadelphia**. Lea & Febiger, cap. 17, p. 453-473, 1993.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **J Dermatol Sci,** v. 58, n. 2, p. 85-90, 2010. ISSN 1873-569X (Electronic)
0923-1811 (Linking).

MASAKI, H. et al. Reactive oxygen species in HaCaT keratinocytes after UVB irradiation are triggered by intracellular Ca2+ levels. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings,** v. 14, n. 1, p. 50-52, 2009. Disponível em: < http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-68849115753&partnerID=40&md5=a835217e846c0e4ef2dc1fa43a1eb30b >.

MASAKI, H. et al. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. **Biol Pharm Bull,** v. 18, n. 1, p. 162-6, Jan 1995. ISSN 0918-6158 (Print)
0918-6158.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radic Biol Med,** v. 5, n. 5-6, p. 363-9, 1988. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking).

MICHAELOUDES, C. et al. TGF-β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology,** v. 300, n. 2, p. L295-L304, 2011.

MOHAMED, M. A. et al. Protective effect of Disporum sessile D.Don extract against UVB-induced photoaging via suppressing MMP-1 expression and collagen degradation in human skin cells. **J Photochem Photobiol B,** v. 15, p. 73-79, 2014. ISSN 1873-2682 (Electronic)

1011-1344 (Linking).

MORA IZQUIERDO, A. et al. Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in Cecropia peltata plants. **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 33, n. 6, p. 2135-2147, 2011/11/01 2011. ISSN 0137-5881. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0753-5 >.

MORLIERE, P.; MOYSAN, A.; TIRACHE, I. Action spectrum for UV-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts. **Free Radic Biol Med,** v. 19, n. 3, p. 365-71, Sep 1995. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849.

MOSTAFA, D. M. et al. Transdermal cumin essential oil nanoemulsions with potent antioxidant and hepatoprotective activities: In-vitro and in-vivo evaluation. **Journal of Molecular Liquids,** v. 212, p. 6-15, 12// 2015. ISSN 0167-7322. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732215303834 >.

MUGGLESTONE, C. J.; MARIZ, S.; LANE, M. E. The development and registration of topical pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 435, n. 1, p. 22-26, 10/1/ 2012. ISSN 0378-5173. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517312003201 >.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radic Biol Med,** v. 43, n. 4, p. 477-503, 2007. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking).

MÜLLER, S. D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of Cecropia glaziovii leaves. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 185, p. 255-262, 6/5/ 2016. ISSN 0378-8741. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411630112X >.

MUNIZ, F. H. Padrões de floração e frutificação de árvores da Amazônia Maranhense. **Acta amazônica,** v. 38, n. 4, p. 617-626, 2008.

NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; OHIGASHI, H. A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 30, n. 9, p. 967-978, 2001. ISSN 0891-5849.

NAYAK, B. S. Cecropia peltata L(Cecropiaceae) Has Wound-Healing Potential: A Preclinical Study in a Sprague Dawley Rat Model. **The International Journal of Lower Extremity Wounds,** v. 5, n. 1, p. 20-26, 2006. Disponível em: < http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1534734606286472 >.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas,** v. 69, n. 3, p. 249-256, 2011. ISSN 0378-5122.

NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni medicina,** v. 53, n. 8, p. 397-411, 2008.

NICASIO-TORRES, M. D. et al. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in Cecropia obtusifolia calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 34, n. 1, p. 307-316, 2012/01/01 2012. ISSN 0137-5881. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0830-9 >.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Arch Dermatol Res,** v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010. ISSN 1432-069X (Electronic)
0340-3696 (Linking).

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects,** v. 1840, n. 2, p. 809-817, 2// 2014. ISSN 0304-4165. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416513000986 >.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova,** v. 30, n. 2, p. 400, 2007. ISSN 0100-4042.

OH, S. M.; KIM, Y. P.; CHUNG, K. H. Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. **Archives of pharmacal research,** v. 29, n. 5, p. 354-362, 2006. ISSN 0253-6269.

OLIVEIRA, R. R. et al. High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from Cecropia lyratiloba Miquel. **Phytochemical Analysis,** v. 14, n. 2, p. 96-99, 2003. ISSN 1099-1565. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/pca.688 >.

ORTMANN, C. F. **Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides C-glicosídeos presentes em Cecropia glaziovii**. 2013. 122 (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis.

ORTMANN, C. F. et al. Enriched Flavonoid Fraction from Cecropia pachystachya Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotoxicity Research,** v. 29, n. 4, p. 469-483, 2016. ISSN 1476-3524. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s12640-016-9596-6 >.

PAPAKONSTANTINOU, E.; ROTH, M.; KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. **Dermato-endocrinology,** v. 4, n. 3, p. 253-258, 2012. ISSN 1938-1972
1938-1980. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583886/ >.

PENA, L. E.; LEE, B. L.; STEARNS, J. F. Consistency development and destabilization of a model cream. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, n. 44, p. 337-345, 1993.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod,** v. 63, n. 7, p. 1035-42, Jul 2000. ISSN 0163-3864 (Print)
0163-3864.

PIWOWARSKI, J. P.; KISS, A. K. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to Lythrum salicaria L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. **Journal of Natural Medicines,** v. 69, n. 1, p. 100-110, 2015. ISSN 1861-0293. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s11418-014-0873-5 >.

POLEFKA, T. G. et al. Effects of solar radiation on the skin. **J Cosmet Dermatol,** v. 11, n. 2, p. 134-43, 2012. ISSN 1473-2165 (Electronic)
1473-2130 (Linking).

POTTS, R. Skin barrier: Principles of percutaneous absorption. **Archives of Dermatology,** v. 133, n. 7, p. 924-924, 1997. ISSN 0003-987X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1997.03890430146031 >.

POUDYAL, H. et al. Responses to oleic, linoleic and α-linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry,** v. 24, n. 7, p. 1381-1392, 7// 2013. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286312002914 >.

PUROHIT, P. S.; SOMASUNDARAN, P. Modification of surface properties of cellulosic substrates by quaternized silicone emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 426, p. 235-240, 7/15/ 2014. ISSN 0021-9797. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197971400215X >.

QI, H. et al. ROS production in homogenate from the body wall of sea cucumber Stichopus japonicus under UVA irradiation: ESR spin-trapping study. **Food Chemistry,** v. 192, p. 358-362, 2/1/ 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615010353 >.

QUAN, T. et al. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings,** v. 14, n. 1, p. 20-24, 8// 2009. ISSN 1087-0024. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087002415305050 >.

ROCQUE, C.; SOARES, A. J. **História geral de Belém e do Grão-Pará**. Distribel, 2001. ISBN 8533804385.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research,** v. 6, p. 317-320, 2003. ISSN 1516-1439. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300003&nrm=iso >.

SAIJA, A. et al. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 175, n. 1, p. 85-94, 1998. ISSN 0378-5173.

SAKURAI, H. et al. Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. **Photochem Photobiol Sci,** v. 4, n. 9, p. 715-20, 2005. ISSN 1474-905X (Print)
1474-905X (Linking).

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochem Photobiol,** v. 86, n. 2, p. 273-8, Mar-Apr 2010. ISSN 0031-8655.

SCHILLER, J. et al. Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer. In: (Ed.). **Biopolymers**: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p.1-34. ISBN 9781118164792.

SEDOUD, A. et al. The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher. **The Plant Cell,** v. 26, n. 4, p. 1781-1791, April 1, 2014 2014. Disponível em: < http://www.plantcell.org/content/26/4/1781.abstract >.

SHINDO, Y.; HASHIMOTO, T. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. **J Dermatol Sci,** v. 14, n. 3, p. 225-32, Mar 1997. ISSN 0923-1811 (Print)
0923-1811.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry,** v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606002007 >.

SKOTARCZAK, K. et al. Photoprotection: facts and controversies. **Eur Rev Med Pharmacol Sci,** v. 19, n. 1, p. 98-112, Jan 2015. ISSN 1128-3602.

SOMASUNDARAN, P. P., P.; GOKARN, N.; KULKARNI, R.D. Silicone emulsions Interfacial aspects and applications. **H&PC Today,** v. 5, n. 3, p. 9, 2010.

STAMENIC, M. et al. Free-radical scavenging activity and antibacterial impact of Greek oregano isolates obtained by SFE. **Food Chemistry,** v. 165, p. 307-315, 12/15/ 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614008073 >.

STEENVOORDEN, D. P.; VAN HENEGOUWEN, G. M. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **J Photochem Photobiol B,** v. 41, n. 1-2, p. 1-10, 1997. ISSN 1011-1344 (Print)
1011-1344 (Linking).

STERN, R.; MAIBACH, H. I. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. **Clin Dermatol,** v. 26, n. 2, p. 106-22, 2008. ISSN 0738-081X (Print)
0738-081X (Linking).

STERN, R.; MAIBACH, H. I. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. **Clinics in Dermatology,** v. 26, n. 2, p. 106-122, 3// 2008. ISSN 0738-081X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X07001976 >. Acesso em: 2008/4//.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v. 69, n. 1, p. 71-77, 6// 2014. ISSN 0273-2300. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230014000385 >.

TERRA, V. A. et al. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. **J Photochem Photobiol B,** v. 109, p. 34-41, 2012. ISSN 1873-2682 (Electronic)

1011-1344 (Linking).

TOŠOVIĆ, J. et al. Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid. **Food Chemistry,** v. 237, p. 9, 2017. ISSN 0308-8146.

UCHIYAMA, H. et al. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. **Journal of Biological Chemistry,** v. 265, n. 14, p. 7753-7759, 1990. ISSN 0021-9258.

UITTO, J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. **J Drugs Dermatol,** v. 7, n. 2 Suppl, p. s12-6, Feb 2008. ISSN 1545-9616 (Print) 1545-9616.

VAN REYK, D. M. et al. The intracellular oxidation of 2′,7′-dichlorofluorescin in murine T lymphocytes. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 30, n. 1, p. 82-88, 1/1/ 2001. ISSN 0891-5849. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584900004494 >.

VARGAS, A. J.; BURD, R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. **Nutrition reviews,** v. 68, n. 7, p. 418-428, 2010. ISSN 1753-4887.

VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. **J Cosmet Dermatol,** v. 5, n. 1, p. 53-7, Mar 2006. ISSN 1473-2130.

VELASCO, M. V. R. B., T. S; PEDRIALI, C. A; SARRUF, F. D; PINTO, C. A. S. O; BABY, A. R; KANEKO, T. M. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) - revisão / New analytical methods for photoprotection effectiveness testing (in vitro) - a review. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada,** v. 32, n. 1, p. 8, 2011.

VICENTINI, F. T. M. C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**. 2009. 173 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

VICENTINI, F. T. M. C. C., 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. **Lat. Am. J. Pharm. ,** v. 26, n. 6, p. 5, 2007.

VIGETTI, D. et al. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. **Hyaluronan: Biosynthesis and signaling.**, 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking).

VILELA, F. M. et al. Sunscreen protection against ultraviolet-induced oxidative stress: evaluation of reduced glutathione levels, metalloproteinase secretion, and myeloperoxidase activity. **Pharmazie,** v. 68, n. 11, p. 872-6, 2013. ISSN 0031-7144 (Print)
0031-7144 (Linking).

WAGEMAKER, T. A. L. **Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora**. 2013. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med,** v. 27, n. 5-6, p. 612-6, Sep 1999. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849.

WÖLFLE, U. et al. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 50, n. 9, p. 1081-1093, 5/1/ 2011. ISSN 0891-5849. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584911000487 >.

YAHYAVI, H.; KAYKHAII, M.; HASHEMI, M. A rapid spectrofluorimetric method for the determination of malondialdehyde in human plasma after its derivatization with thiobarbituric acid and vortex assisted liquid-liquid microextraction. **RSC Advances,** v. 6, n. 3, p. 2361-2367, 2016. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/C5RA22079C >.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med,** v. 33, n. 3, p. 337-49, Aug 01 2002. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849.

ZHU, H. et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS Lett,** v. 579, n. 14, p. 3029-36, Jun 6 2005. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793.

ANEXOS

Figura 29. Espectro de absorção na região do ultravioleta, espectro de MS e MS/MS no modo negativo, espectro de MS e MS/MS no modo positivo da substância 1.

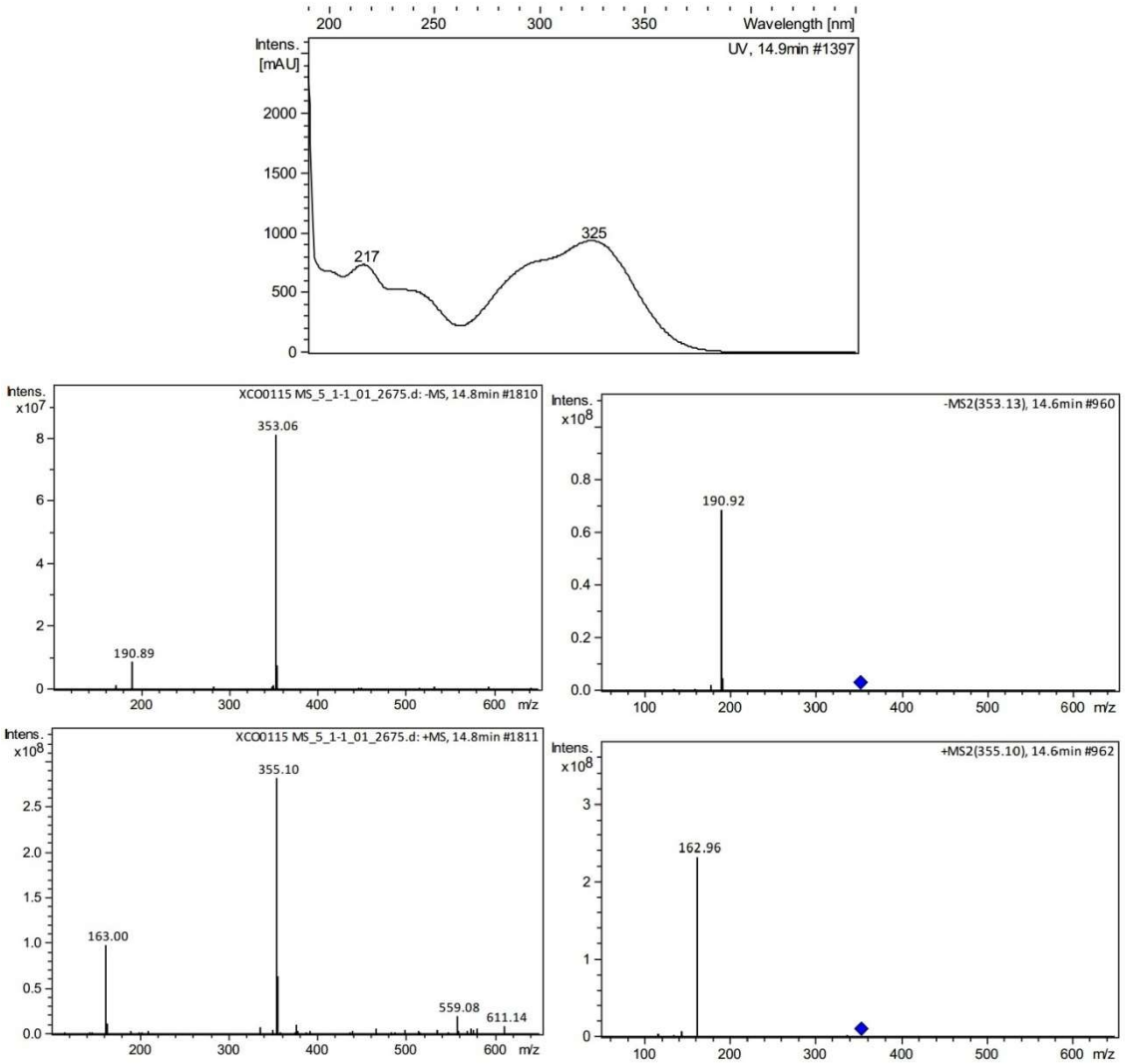


Figura 30. Espectro de absorção na região do ultravioleta, espectro de MS e MS/MS no modo negativo, espectro de MS e MS/MS no modo positivo da substância 2.

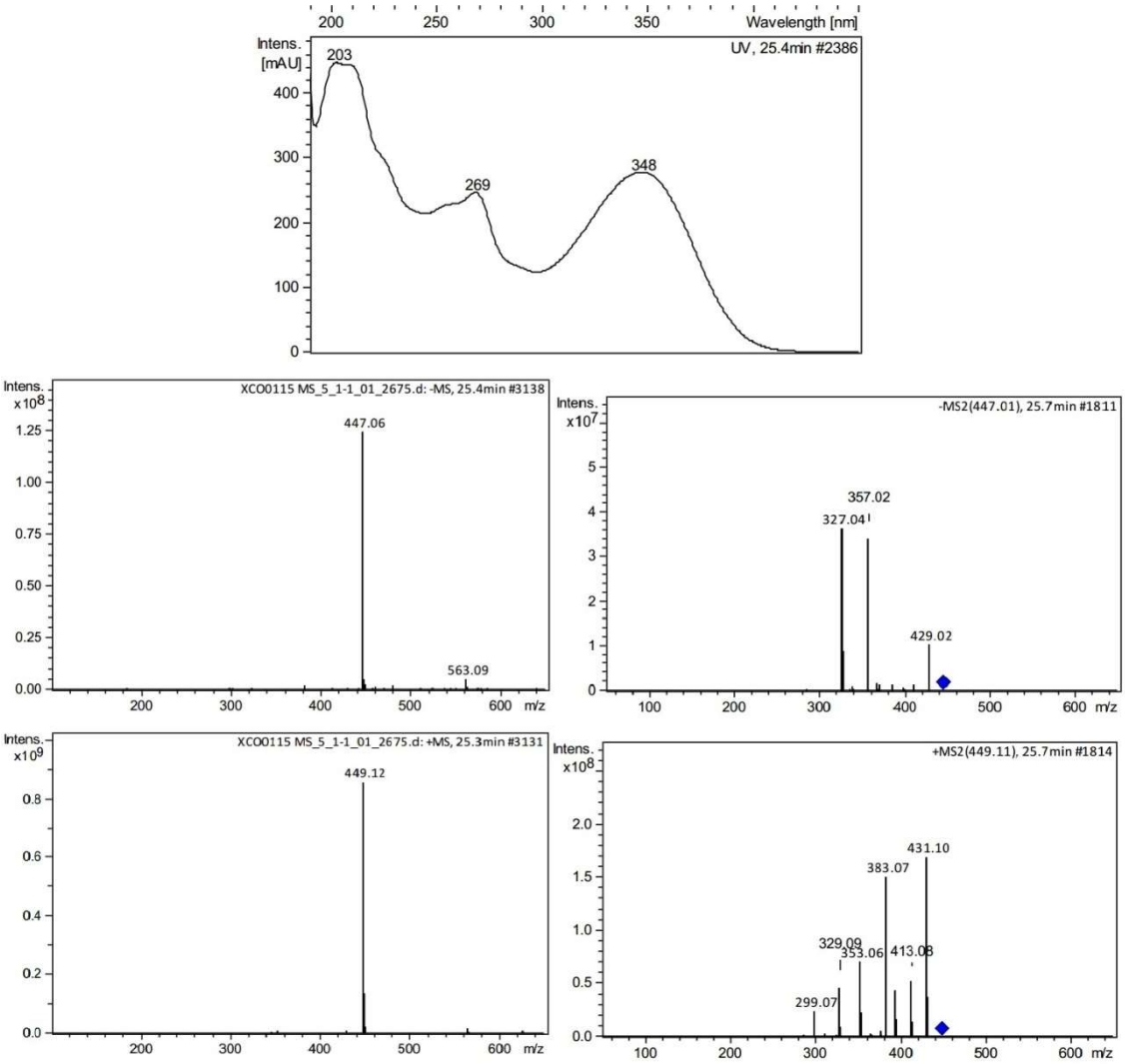


Figura 31. Espectro de absorção na região do ultravioleta, espectro de MS e MS/MS no modo negativo, espectro de MS e MS/MS no modo positivo da substância 3.

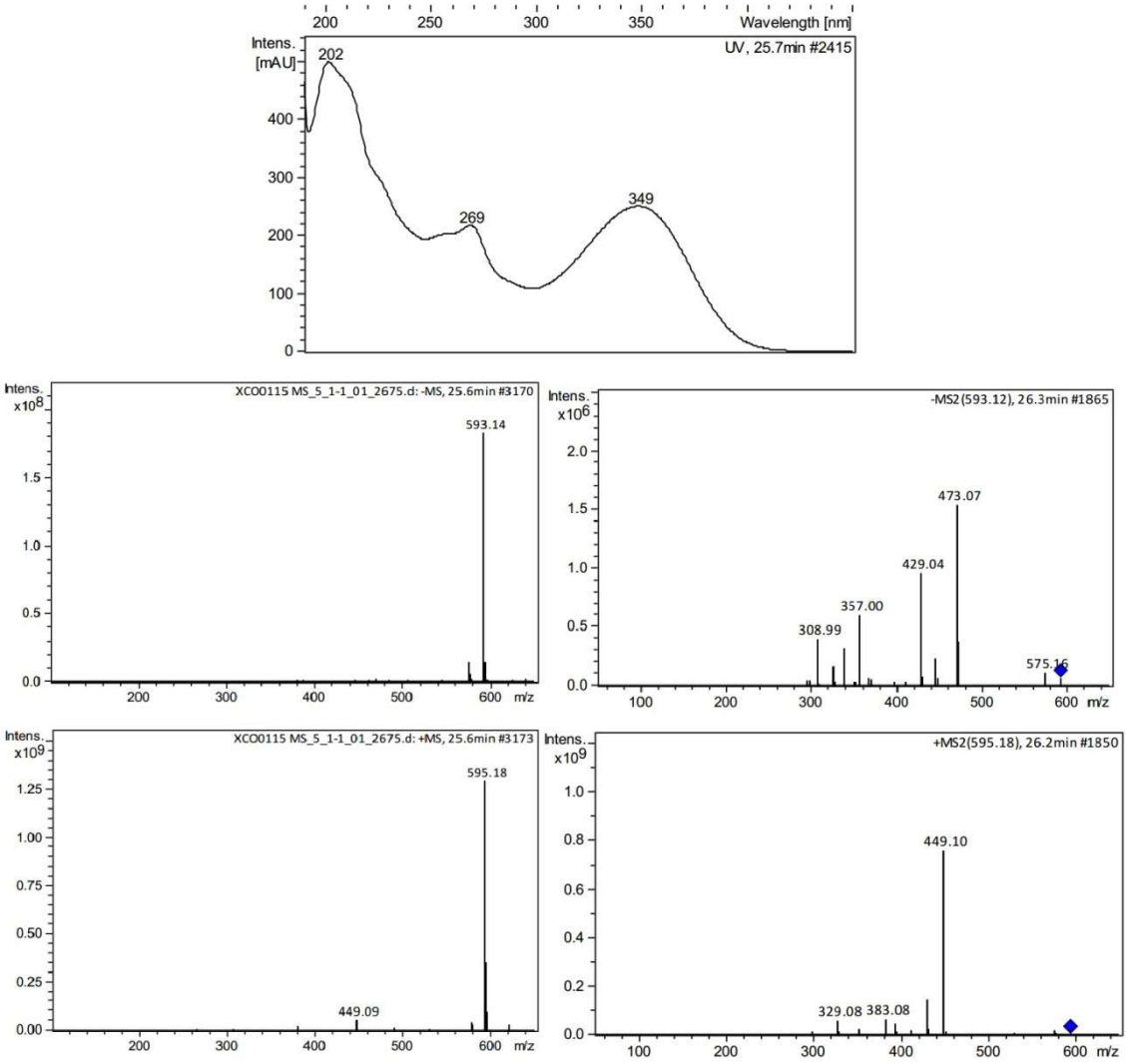


Figura 32. Espectro de absorção na região do ultravioleta, espectro de MS e MS/MS no modo negativo, espectro de MS e MS/MS no modo positivo da substância 4.

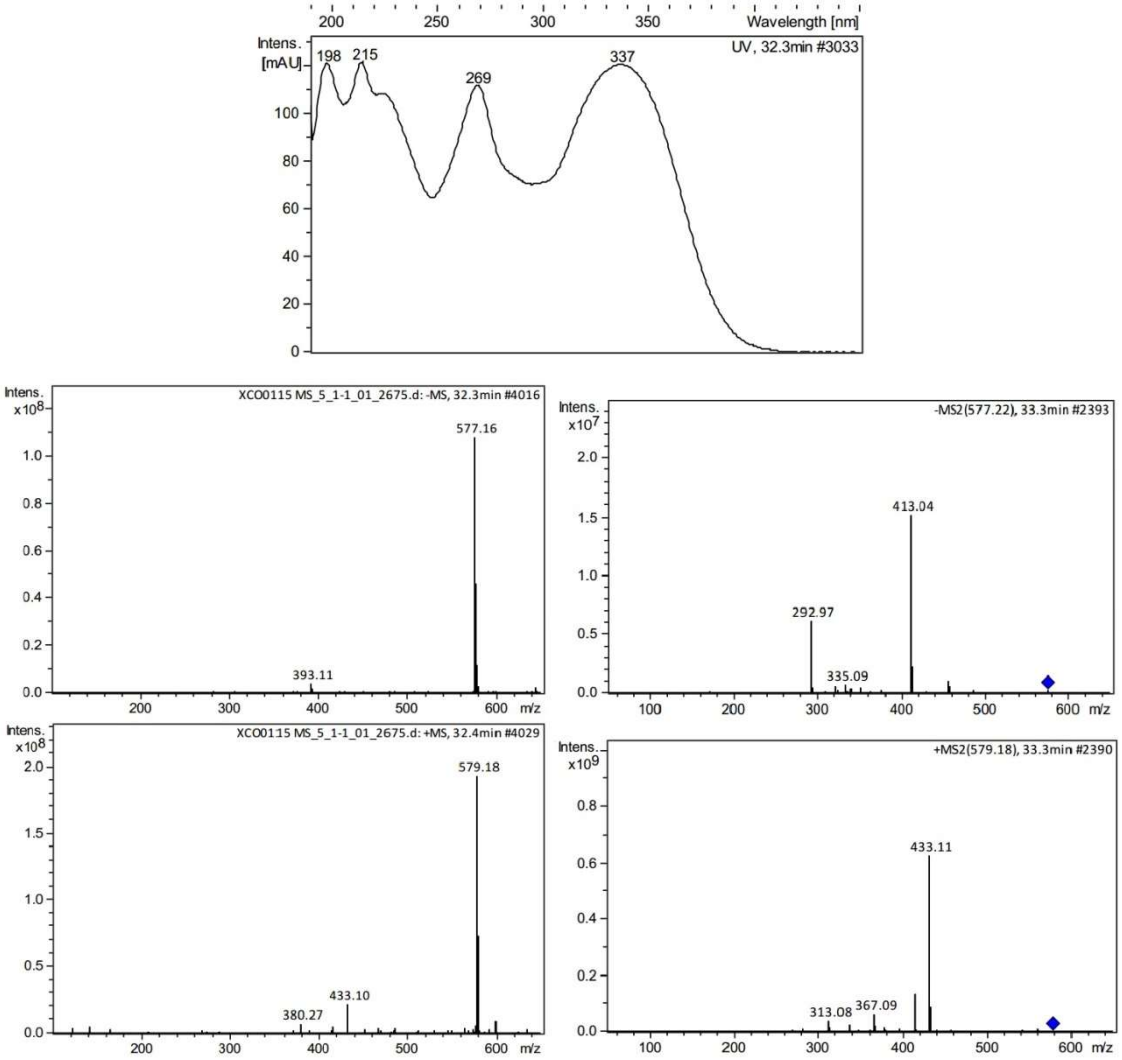
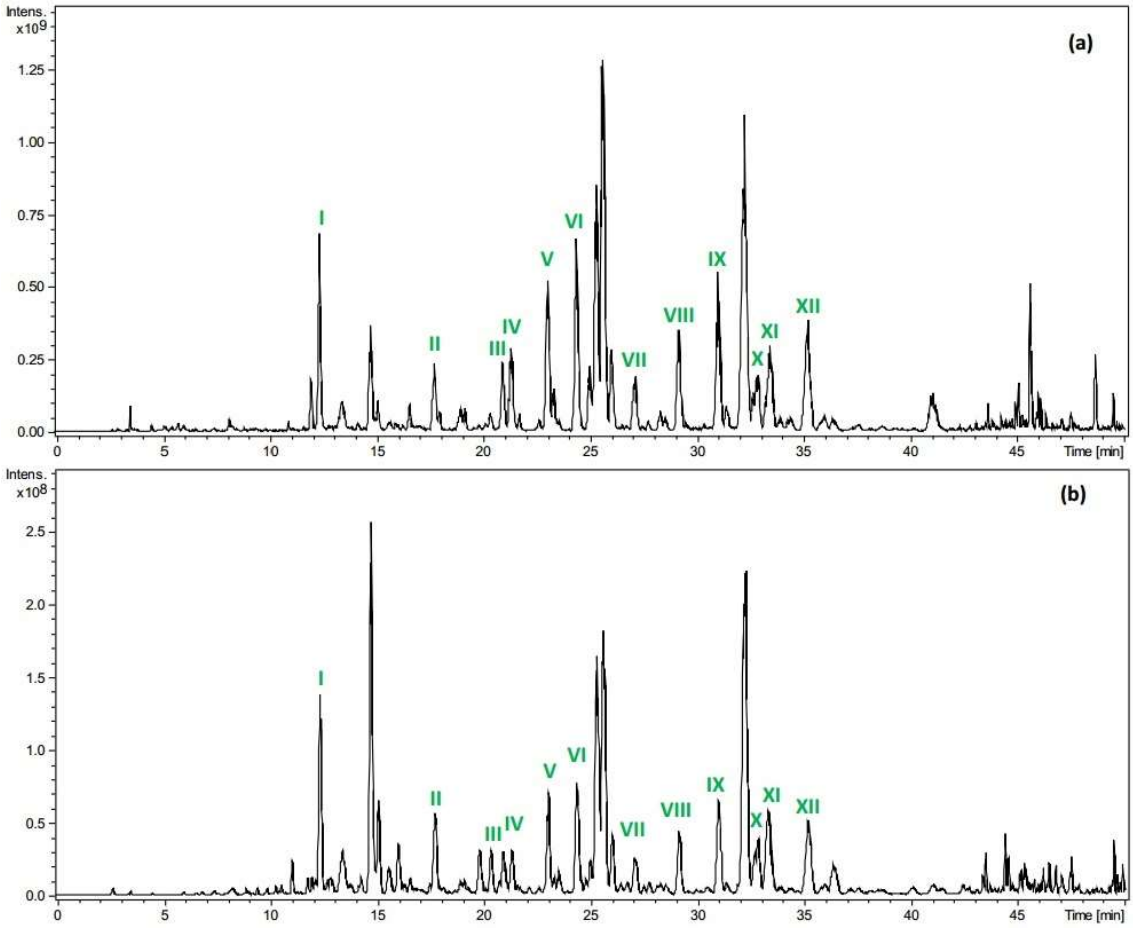


Figura 33. Cromatogramas da análise do extrato de *Cecropia obtusa*.



Detecção ESIMS (Modo Positivo) (a), ESIMS (Modo Negativo) (b), e numeração dos picos cujos espectros de absorção na região do ultravioleta e espectros de massa (MS) são apresentados a seguir.

Figura 34. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (I).

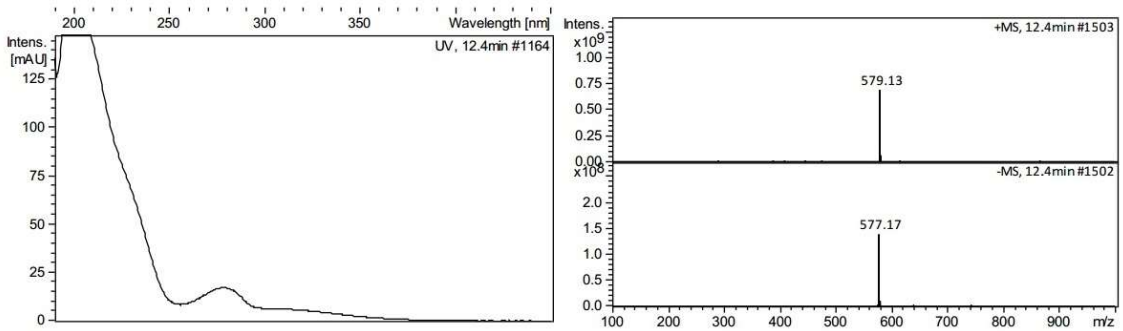


Figura 35. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (II).

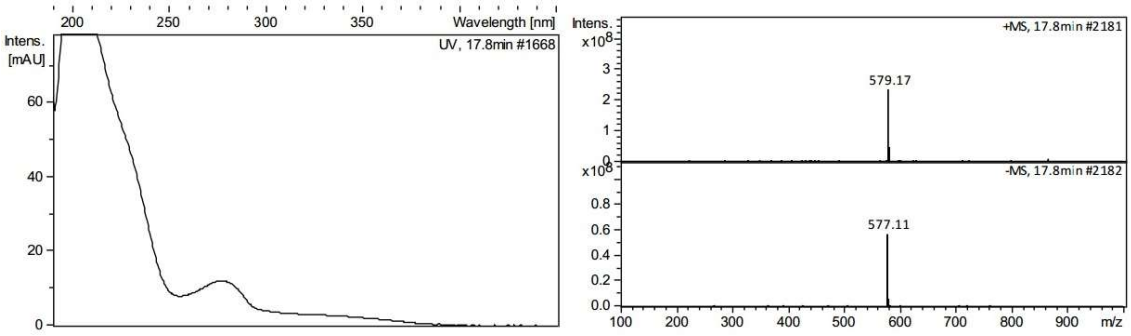


Figura 36. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (III).

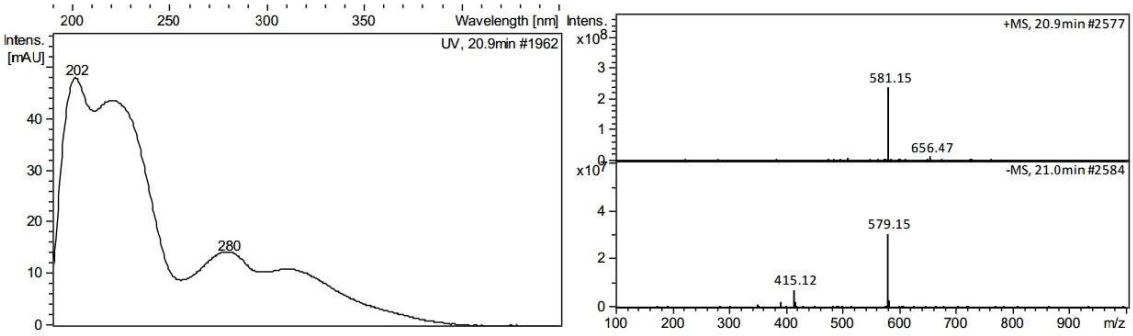


Figura 37. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (IV).

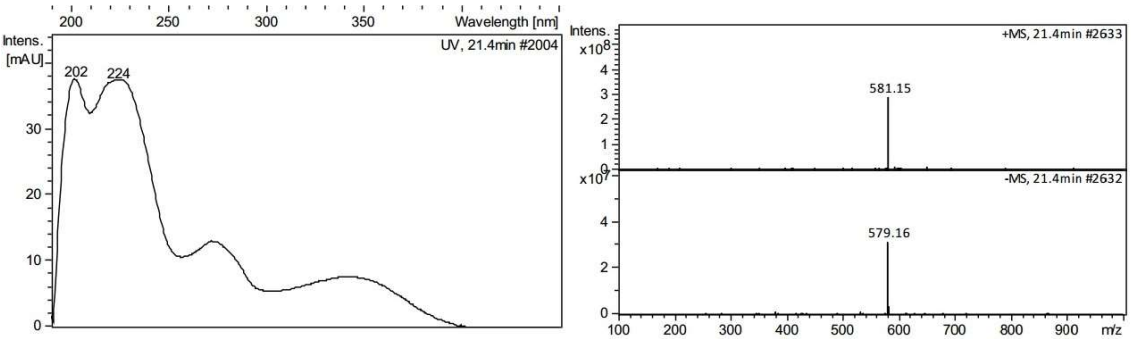


Figura 38. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (V).

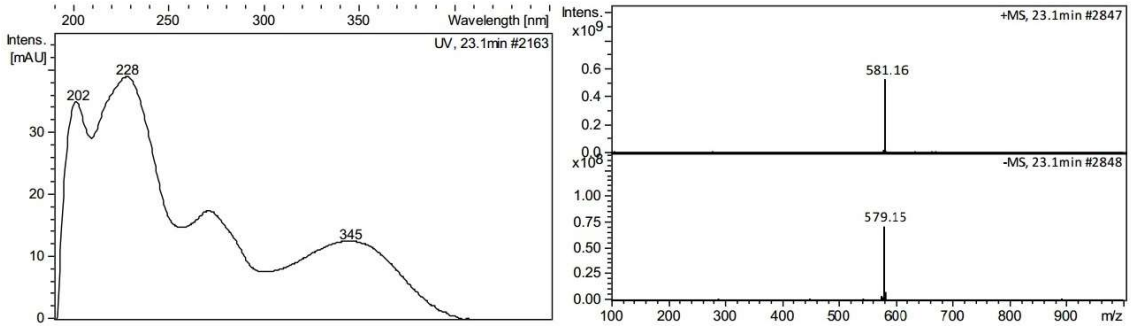


Figura 39. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (VI).

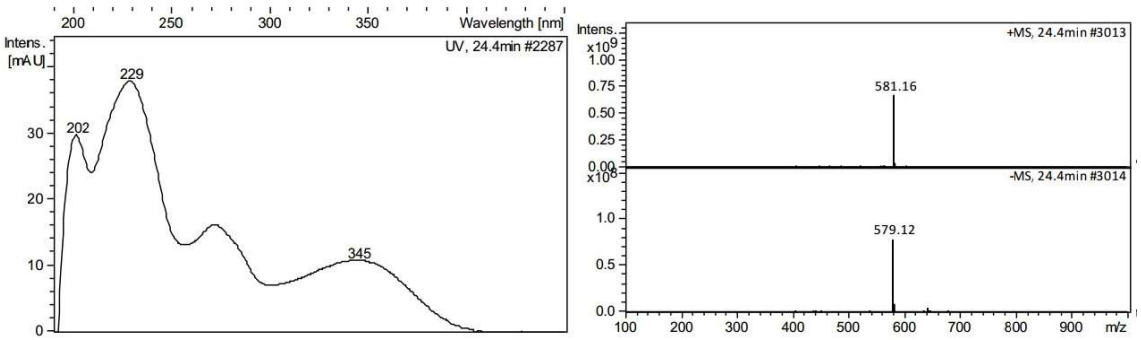


Figura 40. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (VII).

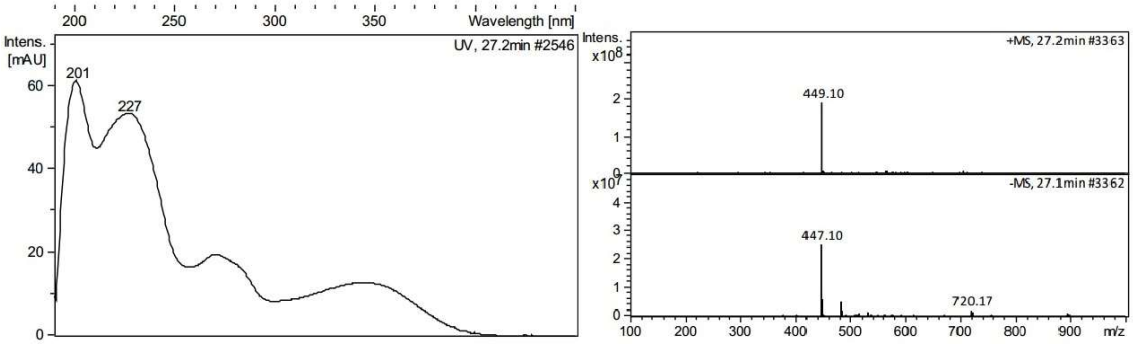


Figura 41. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (VIII).

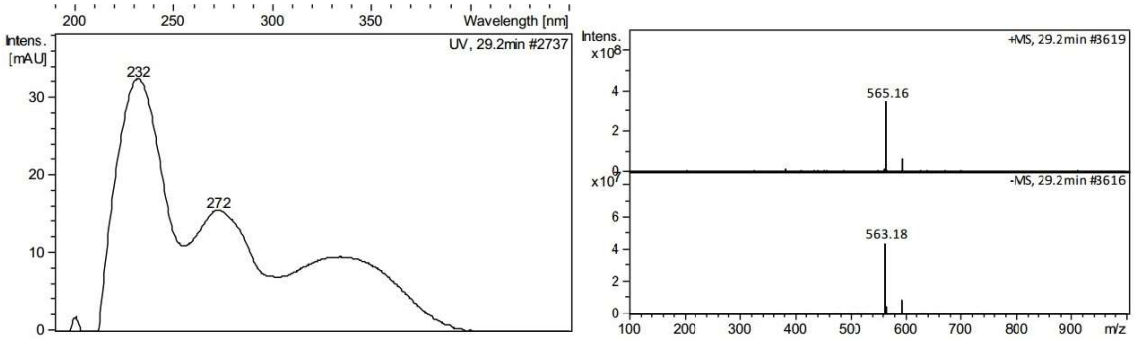


Figura 42. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (IX).

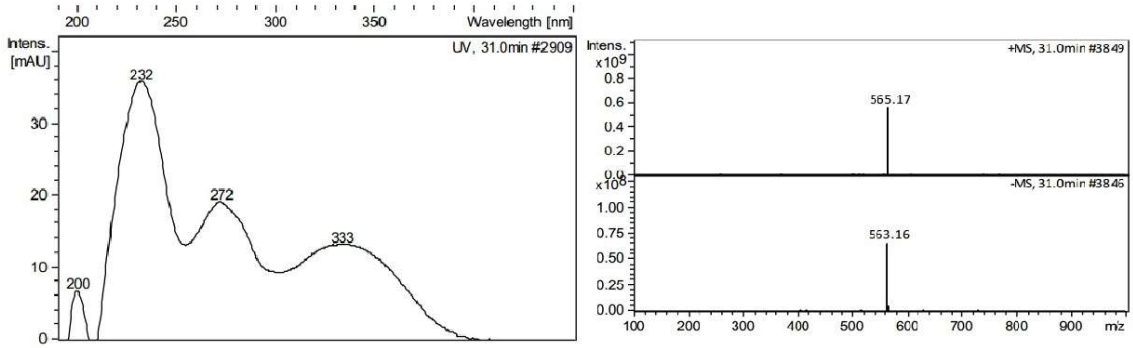


Figura 43. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (X).

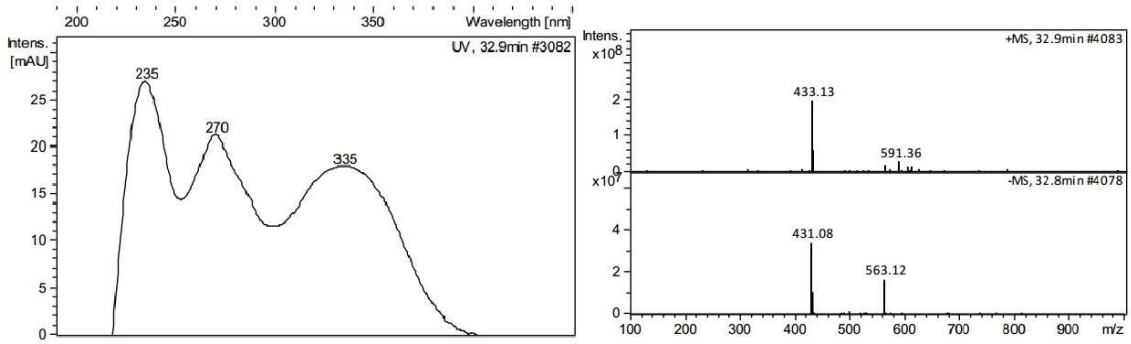


Figura 44. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (XI).

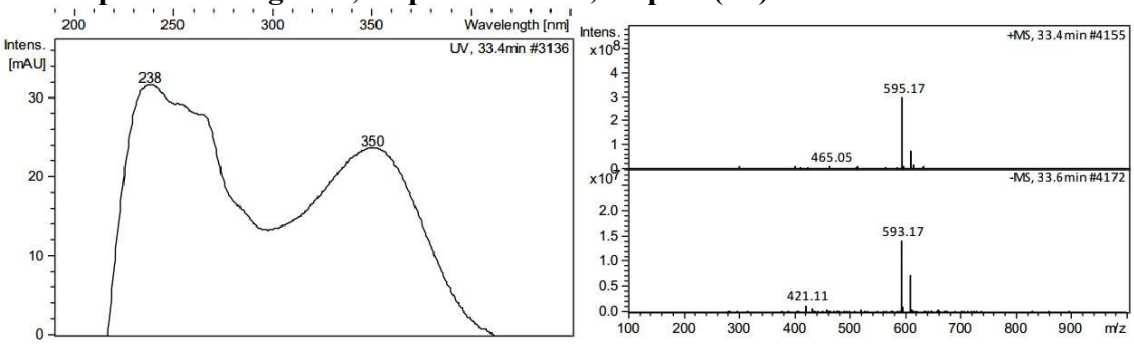


Figura 45. Espectro de absorção na região do ultravioleta e espectro de massa (MS) nos modos positivo e negativo, respectivamente, do pico (XII).

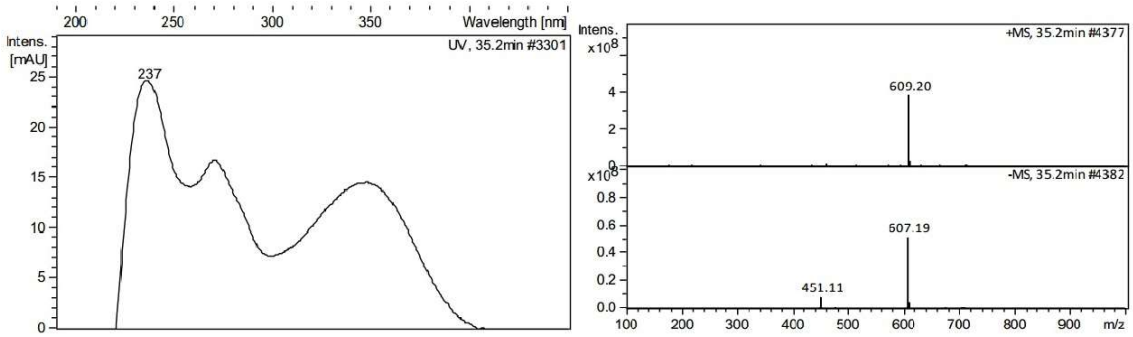


Figura 46. Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 013/2016
dfav

Ribeirão Preto, 10 de maio de 2016.

À Sra.
Prof.ª Dr.ª Maria José Vieira Fonseca
Departamento de Ciências Farmacêuticas
FCFRP/USP

Prezada Professora

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR E FOTOQUIMIOPROTETOR DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS ADICIONADAS DO EXTRATO DE *CECROPIA OBTUSA* EM CULTURA DE CÉLULAS E PELE HUMANA**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 386 – CAAE nº 45128614.2.0000.5403,** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 152ª Reunião Ordinária realizada em 09/05/2016.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-4213 ou 3315-4216 – Fax: (16) 3315-4892