UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Emprego do extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* na
prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese
induzidas pela radiação ultravioleta B na pele de
camundongos sem pêlo**

Vanessa Vitoriano da Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes
Barros

São Paulo
2007

Vanessa Vitoriano da Silva

Emprego do extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* na
prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese induzidas
pela radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pêlo

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª. Titular Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientadora/presidente

Prof. Associado Roger Chammas

Prof. Titular Carlos Frederico Martins Menck

Profª. Dr. Telma Mary Kaneko

Profª. Titular Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo, 3 de maio de 2007.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586e Silva, Vanessa Vitoriano da
Emprego do extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* na
prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese induzidas
pela radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pêlo /
Vanessa Vitoriano da Silva. -- São Paulo, 2006.
116p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes

I. *Pothomorphe umbellata* : Farmacognosia 2. Pele : Câncer
I. T. II. Barros, Silvia Berlanga de Moraes, orientador.

615.323925 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Vanessa Vitoriano da Silva no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 3 dias do mês de maio de 2007, realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Vanessa Vitoriano da Silva, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Fármaco e Medicamentos - Área: Insumos Farmacêuticos, intitulada:

Emprego do extrato de raiz de 'Pothomorphe umbellata' na prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese induzidas pela radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pêlo

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Sílvia Berlanga de Moraes Barros	Presidente	FCF - USP	<i>aprovada</i>
Carlos Frederico Martins Menck	Suplente	ICB - USP	<i>aprovado</i>
Elfriede Marianne Bacchi	Titular	FCF - USP	<i>aprovado</i>
Roger Chammas	Titular	FM - USP	<i>Aprovado</i>
Telma Mary Kaneko	Titular	FCF - USP	<i>Aprovado</i>
Resultado Final: <i>APROVADA</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Elisabete Claro de Souza Paiva *Elisabete Claro de Souza Paiva*, secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 3 dias do mês de maio de 2007.

Carlos Frederico Martins Menck
Carlos Frederico Martins Menck

Roger Chammas
Roger Chammas

Sílvia Berlanga de Moraes Barros
Sílvia Berlanga de Moraes Barros
Orientador(a)

Elfriede Marianne Bacchi
Elfriede Marianne Bacchi

Telma Mary Kaneko
Telma Mary Kaneko

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 03/05/2007

*"And love is not the easy thing....
The only baggage you can bring
Is all that you can't leave behind"*
Bono

*Aos meus pais, Hélió e Leda, e irmãos, Leonardo e Ariadne,
pelo apoio, ensinamentos transmitidos e carinho em
todas as etapas da minha vida*

*"Science is to learn to live with
a constant level of frustration"*
Helmut Sies

*À professora Silvia Berlanga de Moraes Barros,
pelo incentivo constante, pela dedicação e
pelo exemplo profissional íntegro e honesto*

*“Something waiting to happen
Something learning to fly
On the edge of exploding
Something wild and alive
Something waiting to happen
Any time that you like
I have waited to feel this
For the whole of my life “
Steve Hogarth*

*Ao querido Osmar, pelo cuidado, carinho, amor, por
acreditar que é possível e pela nossa seed of life.*

*"She'll empty the sand from her shoes
In Paradise
Sail out across the bay
She'll dance under an island sky
Until the break of day"*
Steve Hogarth

*À minha amiga Daniela por todos os momentos
compartilhados, pelo bom senso e serenidade e
pela amizade e alegria infinitas.*

"Any life career that you choose in following your bliss should be chosen with that sense - that nobody can frighten me off from this thing. And no matter what happens, this is the validation of my life and action."

Joseph Campbell

"We make our world significant by the courage of our questions and by the depth of our answers."

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

À Cristina e à Tânia, pela amizade incondicional, apoio e risadas constantes,

Aos queridos alunos de iniciação científica e amigos Clarissa, César, Denise, Rebeca e Diogo pela ajuda e paciência para realização deste trabalho,

À professora Silvy Stuchi, Carla, Laura, Tatiana, Renato e Elisângela pela amizade e pelo convívio sempre harmonioso e prazeroso,

Ao jardineiro Eladio pela coleta das raízes de *Pothomorphe umbellata*,

À professora Elfriede Marianne Bacchi, ao professor Paulo Channel e ao Sr. Roberto pela ajuda na preparação do extrato de *Pothomorphe umbellata*,

À professora Telma Mary Kaneko pelo empréstimo das células de Franz,

Ao professor Paolo DiMascio pela medida da radiação da lâmpada UVB utilizada neste trabalho,

Ao Odilon Sirino da Silva Filho, pelos cortes histológicos,

Aos colegas pós-graduandos pelo convívio amistoso,

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da secretaria do Departamento de Fármaco-Medicamentos e também da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre dispostos a ajudar,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas que me deu condições para realização deste trabalho e para minha formação profissional,

A todos os animais que doaram suas vidas pela realização deste trabalho, meus sinceros agradecimento e respeito,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado direto,

A todas as outras pessoas que me apoiaram e incentivaram para a concretização deste trabalho.

ÍNDICE

Introdução.....	01
1. Revisão da literatura.....	03
1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o sistema antioxidante da pele....	03
1.2 O ciclo celular: progressão e regulação.....	10
1.2.1 O gene supressor de tumor p53.....	13
1.3 Alterações na pele causadas pela exposição à radiação ultravioleta.....	17
1.4 Prevenção do dano induzido pela radiação ultravioleta à pele.....	20
1.4.1 <i>Pothomorphe umbellata</i> L. Miq.....	27
2. Objetivo.....	31
3. Materiais e Métodos.....	32
3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	32
3.1.1 Coleta e processamento das raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	32
3.1.2 Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico.....	33
3.1.3 Isolamento do 4-nerolidilcatecol.....	33
3.1.4 Doseamento de 4-nerolidilcatecol no extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	34
3.2 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	36
3.2.1 Preparação das formulações.....	36
3.2.2 Estudo de estabilidade química da formulação frente à concentração de 4-NC.....	37
3.3 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	38
3.3.1 Animais.....	38
3.3.2 Formulações.....	38
3.3.3 Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	39
3.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	40
3.4.1 Animais.....	40
3.4.2 Sistema de irradiação.....	40
3.4.3 Protocolos de exposição à radiação UVB.....	41

3.4.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo.....	42
3.4.4.1 Preparação do homogenado de pele.....	42
3.4.4.2 Determinação da concentração dos antioxidantes não enzimáticos.....	43
3.4.4.2.1 Determinação da concentração de ácido ascórbico.....	43
3.4.4.2.2 Determinação da concentração de α -tocoferol.....	43
3.4.4.3 Determinação da atividade dos antioxidantes enzimáticos.....	44
3.4.4.3.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	44
3.4.4.3.2 Determinação da atividade da glutathione peroxidase.....	45
3.4.4.3.3 Determinação da atividade de glutathione redutase.....	45
3.4.4.3.4 Determinação da atividade de catalase.....	46
3.4.5 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável.....	46
3.4.5.1 Obtenção das amostras.....	46
3.4.5.2 Avaliação da presença de células de queimadura solar.....	46
3.4.5.3 Análise da espessura da epiderme viável.....	47
3.4.5.4 Ensaio imunohistoquímico para a proteína PCNA.....	47
3.4.5.5 Ensaio imunohistoquímico para a proteína p53.....	48
3.5 Análise estatística dos resultados.....	49
4. Resultados.....	50
4.1 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	50
4.2 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	51
4.3 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo.....	54
4.3.1 Ensaios de exposição aguda à radiação UVB.....	54
4.3.2 Ensaios de exposição crônica à radiação UVB.....	59

4.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável.....	62
4.4.1 Avaliação dos efeitos da exposição aguda à radiação UVB.....	62
4.4.2 Avaliação dos efeitos da exposição crônica à radiação UVB.....	71
5. Discussão.....	76
5.1 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	76
5.2 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	77
5.3 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo.....	79
5.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável.....	83
7. Conclusões.....	88
8. Referências Bibliográficas.....	89
9. Anexos.....	108
9.1 Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP.....	109
9.1 Artigo Publicado.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os antioxidantes na pele.....	07
Figura 2: Rede de antioxidantes de baixo peso molecular.....	09
Figura 3: Fases do ciclo celular.....	12
Figura 4: Papel do gene p53 na parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose após lesões causadas no DNA.....	16
Figura 5: Estrutura química do resveratrol.....	25
Figura 6: Estrutura química da silibinina.....	25
Figura 7: Estrutura química dos principais polifenóis presentes no chá verde.....	26
Figura 8: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol.....	28
Figura 9: Raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	32
Figura 10: Curva de calibração de 4-NC no intervalo da concentração de 0,0156 a 0,313 µg/mL.....	35
Figura 11: Célula de Franz.....	40
Figura 12: Espectro de emissão da lâmpada UVB Philips TL 12RS 40W.....	41
Figura 13: Concentração de 4-NC (µg/g gel) nas formulações com e sem BHT armazenadas a 5, 25 e 45°C por 103 dias.....	50
Figura 14: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 0,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	51
Figura 15: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,0% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	51
Figura 16: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	52
Figura 17: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 0,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	52
Figura 18: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,0% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	52

Figura 19: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	52
Figura 20: Concentração de ácido ascórbico (nmol/g pele) após irradiação com UVB.....	55
Figura 21: Concentração de α -tocoferol (nmol/g pele) após irradiação com UVB.....	55
Figura 22: Atividade de glutationala peroxidase após irradiação com UVB.....	56
Figura 23: Atividade de superóxido dismutase após irradiação com UVB.....	56
Figura 24: Atividade de catalase após irradiação com UVB.....	56
Figura 25: Atividade de glutationala redutase após irradiação com UVB.....	56
Figura 26: Concentração de ácido ascórbico (nmol/g pele) 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	57
Figura 27: Concentração de α -tocoferol (nmol/g pele) 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	57
Figura 28: Porcentagens das concentrações remanescentes de glutationala peroxidase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	58
Figura 29: Porcentagens das concentrações remanescentes de superóxido dismutase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	58
Figura 30: Porcentagens das concentrações remanescentes de catalase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	58
Figura 31: Porcentagens das concentrações remanescentes de glutationala redutase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB.....	58
Figura 32: Porcentagens das concentrações remanescentes de ácido ascórbico após exposição crônica com doses de 8,60; 13,17 e 55,51 KJ/m ² de radiação UVB.....	60
Figura 33: Porcentagens das concentrações remanescentes de α -tocoferol após exposição crônica com doses de 8,60; 13,17 e 55,51 KJ/m ² de radiação UVB.....	60
Figura 34: Porcentagens das concentrações remanescentes de glutationala peroxidase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m ² de radiação UVB.....	61

Figura 35: Porcentagens das concentrações remanescentes de superóxido dismutase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m ² de radiação UVB.....	61
Figura 36: Porcentagens das concentrações remanescentes de catalase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m ² de radiação UVB...	61
Figura 37: Porcentagens das concentrações remanescentes de glutathione redutase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m ² de radiação UVB.....	61
Figura 38: Porcentagens de células de queimadura solar após exposição à radiação UVB.....	62
Figura 39: Indução de células de queimadura solar em pele de camundongo sem pêlo 12 horas após a irradiação ultravioleta.....	63
Figura 40: Espessura da epiderme viável (μm) após exposição à radiação UVB.....	63
Figura 41: Porcentagens de células marcadas para proteína PCNA após exposição à radiação UVB.....	64
Figura 42: Porcentagens de células marcadas para proteína p53 após exposição à radiação UVB.....	65
Figura 43: Porcentagem de células de queimadura de solar após 12 horas da irradiação nos grupos UVB.....	65
Figura 44: Espessura da epiderme viável (μm) após 12 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB + veículo e UVB + <i>P. umbellata</i>	66
Figura 45: Porcentagem de células marcadas para proteína PCNA após 2, 12, 24 e 48 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB+veículo e UVB+ <i>P. umbellata</i>	67
Figura 46: Porcentagem de células marcadas para proteína p53 após 2, 12, 24 e 48 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB+veículo e UVB+ <i>P. umbellata</i>	67
Figura 47: Fotomicrografias - Aspecto microscópico de pele de camundongos sem pêlo.....	68
Figura 48: Fotomicrografias - Reação imunohistoquímica para a proteína PCNA.....	69
Figura 49: Fotomicrografias - Reação imunohistoquímica para a proteína p53.....	70

Figura 50: Altura da epiderme viável nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+ <i>P. umbellata</i> após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m ²	72
Figura 51: Fotomicrografias - Aspecto microscópico de pele de camundongos sem pêlo após exposição crônica à radiação UVB - Dose 13,17 KJ/m ² Controle (A), UVB (B), UVB+veículo (C) e UVB+ <i>P. umbellata</i> (D), Dose 55,51 KJ/m ²	73
Figura 52: Porcentagem de células marcadas para a proteína PCNA nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+ <i>P. umbellata</i> após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m ²	74
Figura 53: Porcentagem de células marcadas para a proteína p53 nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+ <i>P.umbellata</i> após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m ²	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Valores da curva de calibração de 4-NC dissolvido em etanol Licrosolv® e avaliação da precisão quantitativa por CLAE.....	35
Tabela 2: Composição das formulações em gel contendo extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> empregadas nos estudos de estabilidade química.....	37
Tabela 3: Composição (% p/p) das formulações empregadas no estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	39
Tabela 4: Parâmetros de difusão para os géis com diferentes concentrações de carbômero 940 contendo extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol.....	53
Tabela 5: Parâmetros de difusão para os géis com diferentes concentrações de carbômero 940 contendo extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na concentração de 0,1% de 4-nerolidilcatecol.....	53

Abreviaturas

4-NC.....	4-nerolidilcatecol
8-OHdG.....	8-deoxiguanosina
ANOVA.....	análise de variância
ARK.....	animal research kit
Asc•.....	radical ascorbila
ATM.....	ataxia-telangectasia <i>mutated</i>
ATR.....	ataxia-telangiectasia <i>RAD3-related</i>
BER.....	reparo por excisão de base
BHT.....	butil-hidroxitolueno
CAT.....	catalase
CCD.....	cromatografia em camada delgada
CDKs	quinases ciclina-dependentes
Chk1.....	ponto de checagem 1
Chk2.....	ponto de checagem 2
CKI.....	proteína inibitória
CLAE.....	cromatografia líquida de alta eficiência
CPD.....	dímeros de pirimidina
CQS.....	células de queimadura solar
CV.....	coeficiente de variação
DNA.....	ácido desoxirribunocleico
e ⁻	elétron livre
EC	epicatequina
ECG	epicatequina-3-galato
EGC	epigallocatequina
EGCG.....	epigallocatequina-3-galato
EROs.....	espécies reativas de oxigênio
FDA.....	Food and Drug Administration
FPS.....	fator de proteção solar
GPx.....	glutathione peroxidase
GSH.....	glutathione
GR.....	glutathione reductase
GSSG.....	glutathione oxidada

H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO ₂ [•]	radical perhidroxila
HDM2	forma humana do gene <i>murine double minute 2</i>
HE.....	hematoxilina-eosina
MED.....	dose mínima indutora de eritema
MMP.....	metaloproteinase
MMR.....	reparo por emparelhamento errôneo
NADH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NER.....	reparo por excisão de nucleotídeo
NO.....	óxido nítrico
NO ₂	dióxido de nitrogênio
ONOO ⁻	peroxinitrito
O ₂	oxigênio molecular
¹ O ₂	oxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	radical ânion superóxido
OH [•]	radical hidroxila
p/p.....	peso por peso
PCNA.....	antígeno nuclear de proliferação celular
pRb.....	proteína do retinoblastoma
RNA.....	ácido ribunucleico
RO [•]	radical lipídico
rpm	rotações por minuto
p/v.....	peso por volume
SOD.....	superóxido dismutase
TBST.....	tampão salina Tris com Tween 20
γ-TDMG.....	derivado solúvel em água de alfa-tocoferol
UV.....	radiação ultravioleta
UVA.....	radiação ultravioleta A (320-400nm)
UVB.....	radiação ultravioleta B (290-320nm)
UVC.....	radiação ultravioleta C (220-290nm)
v/v.....	volume por volume

RESUMO

O uso de antioxidantes de origem natural apresenta uma perspectiva promissora na prevenção dos efeitos adversos causados pela radiação ultravioleta, incluindo o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese. As atividades antioxidante, fotoprotetora e antienvelhecimento cutâneo foram demonstradas para o extrato de *Pothomorphe umbellata*. No entanto, seu potencial protetor da fotocarcinogênese ainda não foi estabelecido. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da aplicação tópica do gel de extrato de raiz de *P. umbellata* nas alterações promovidas pelas exposições aguda (dose única – 0,20 KJ/m²) e crônica (4 semanas, dose total de 8,6 KJ/m², 5 semanas, 13,17KJ/m², 15 semanas, 55,51 KJ/m²) à radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pêlo. Para avaliação dos antioxidantes não enzimáticos, ácido ascórbico e α -tocoferol, foram utilizados métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e para avaliação dos enzimáticos, catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, métodos espectrofotométricos. As modulações das proteínas p53 e PCNA foram avaliadas por imunohistoquímica. Os resultados demonstram que o tratamento com gel de extrato de raiz de *P. umbellata* é capaz de modular o sistema antioxidante na pele de camundongos sem pêlo, proporcionando maior proteção frente à exposição à radiação UVB. Além disso, os resultados sugerem que a aplicação tópica de extrato de *P. umbellata* protege contra os danos causados pela radiação modulando vias de reparo e/ou morte celular. Estes resultados contribuem para elucidação do mecanismo de ação do extrato de *P.umbellata* na pele exposta à radiação UVB, indicando sua capacidade em preservar a pele sadia após a irradiação.

ABSTRACT

Topical application of botanical antioxidants has been appreciated as a viable approach to reduce the occurrence of deleterious damage caused by sunlight exposure, such as photoaging and photocarcinogenesis. The plant *Pothomorphe umbellata* has been shown to exert a potent antioxidant activity on the skin and to delay the onset and reduce the incidence of UVB-induced skin damage and photoaging. The purpose of this study was to evaluate the effects of topical *P. umbellata* treatment on acute (single dose – 0.20 KJ/m²) and chronic (4 weeks, total dose 8.6 KJ/m², 5 weeks, 13.17KJ/m², 15 weeks, 55.51 KJ/m²) UVB-induced damage hairless mouse epidermis. Nonenzymic antioxidants, ascorbic acid and α -tocopherol, were assayed by high performance liquid chromatography and enzymic antioxidants, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, spectrophotometrically. UVB-induced p53 and PCNA were detected by immunohistochemical technique. The data collected here suggest that topical application of *P. umbellata* extract affords strong protection against UVB-induced damages in skin epidermis by either preventing DNA damage or enhancing repair and inhibiting UVB-caused apoptosis and sunburn cell formation. Moreover, the results also suggest that *P. umbellata* extract modulates the cutaneous antioxidant network resulting in reduced susceptibility to UVB-induced oxidative damage. Together these results contribute for the elucidation of the mechanism of action of *P.umbellata* on UVB exposed skin and indicate the capacity of this extract to preserve skin health after irradiation.

Introdução

A pele, o maior órgão do corpo humano, faz a interface entre o ambiente e o corpo e está constantemente exposto a uma diversa gama de poluentes ambientais químicos e físicos. A exposição à luz solar resulta na indução de neoplasias cutâneas devido aos efeitos mutagênicos da radiação UV.

As espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação ultravioleta, a absorção direta de radiação por moléculas fotossensíveis e os mecanismos de regeneração de antioxidantes comprometem os sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos da pele, promovendo o aumento de espécies pró-oxidantes no meio celular, sendo esta condição definida como estresse oxidativo. O estresse oxidativo causa dano aos componentes celulares e altera o padrão de expressão gênica, levando às doenças de pele como o câncer, fototoxicidade e fotoenvelhecimento.

Muitos estudos têm demonstrado que o gene supressor de tumor p53 é o um dos alvos iniciais de mutações induzidas pela radiação UV. A proteína deste gene é o elemento central em processos celulares fundamentais como o controle do ciclo celular, apoptose, replicação e reparo do DNA, estabilidade genômica e envelhecimento. A função básica da proteína p53 é manter a célula em estado normal. Em resposta ao dano ao DNA ou estresse celular, a p53 ativa genes que induzem o reparo do DNA ou a apoptose no caso de grande dano ao DNA. A perda do gene ou o seu funcionamento inadequado aumenta a possibilidade de desenvolvimento de neoplasias. A proteína p53 é conhecida como ativadora de transcrição do promotor de PCNA, sendo este o mecanismo pelo qual o gene p53 induz a expressão de PCNA em resposta ao dano ao DNA. A PCNA é uma proteína essencial na replicação, recombinação e reparo do DNA, servindo também como biomarcador de proliferação celular.

Com alta prevalência e morbidade, o tratamento e prevenção de neoplasias cutâneas estão sujeitos a custos substanciais, sendo necessário um maior entendimento do processo da doença para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapias eficazes. Uma estratégia para reduzir a incidência de fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento é o uso de agentes capazes de diminuir os efeitos adversos da radiação UVB na pele. Os antioxidantes de origem natural, aplicados topicamente ou administrados

oralmente, apresentam uma perspectiva promissora de prevenção destas doenças.

O Brasil possui uma flora extremamente rica em plantas medicinais, sendo freqüente o uso popular destas para o tratamento de inúmeras doenças. A espécie vegetal *Pothomorphe umbellata*, popularmente conhecida por pariparoba, foi selecionada entre outras espécies, por ter apresentado atividades antioxidante *in vitro* e *in vivo*, fotoprotetora e antienvelhecimento cutâneo significativas em modelos experimentais empregados no laboratório da disciplina de Patologia Geral e de Citologia Clínica. Além disto, o fato de ter um de seus princípios ativos conhecido possibilitou trabalhar sempre com extratos padronizados.

1. Revisão da literatura

1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o sistema antioxidante da pele

Os radicais livres e outras espécies oxidantes são continuamente gerados, em baixas concentrações, durante os processos fisiológicos que incluem os metabolismos aeróbico celular e antimicrobiano e as respostas inflamatórias (SANDER *et al.*, 2004). Além disso, quando presentes em quantidade moderada, estão envolvidas em vias de transdução de sinal, ativação celular, controle de diferenciação e crescimento celular. Por outro lado, quando presentes em grandes concentrações, estas espécies reativas podem causar oxidação e dano a componentes celulares como DNA, RNA, lipídeos e proteínas (PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001, SANDER *et al.*, 2004). O efeito causado por estas espécies é complexo e depende da sua concentração no local de ação, do microambiente envolvido e do componente genético individual (HUSSAIN *et al.*, 2003).

O termo espécies reativas de oxigênio compreende (a) moléculas conhecidas como radicais livres e (b) moléculas que se comportam como radicais livres, ou seja, são caracterizadas pela alta reatividade e fácil oxidação de outras moléculas. Os radicais livres são moléculas caracterizadas por um ou mais elétrons desemparelhados (TEDESCO *et al.*, 1997). Um elétron desemparelhado ocupa um orbital sozinho, o que geralmente leva à alta reatividade desta molécula, como é o caso do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). No entanto, derivados não radicalares do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) são oxidantes importantes, e, portanto, são incluídos no grupo das espécies reativas de oxigênio (PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

Após exposição à radiação ultravioleta, a absorção de fótons por moléculas fotossensíveis pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio na pele. Riboflavina, porfirina, bilirrubina, NADH, triptofano, ácidos nucleicos e melanina são exemplos de moléculas fotossensíveis ou cromóforos endógenos encontrados em células de mamíferos (FUCHS, 1998, TEDESCO *et al.*, 1997). Derivados de poluentes ambientais, plantas, medicamentos e

cosméticos são cromóforos exógenos que também podem se tornar relevantes biologicamente. Estas reações de oxidação por fotossensibilização podem ocorrer como reações Tipo I e Tipo II. A absorção de energia por uma molécula fotossensível resulta em uma espécie eletronicamente excitada. Na reação Tipo I, a molécula fotossensível excitada reage com outro substrato pela transferência de um elétron ou átomo de hidrogênio formando radicais livres ou íons radicais. Na reação Tipo II, a energia de uma molécula fotossensível é transferida para o oxigênio molecular para produzir oxigênio singlete (FOOTE,1991; FUCHS, 1998).

A formação de espécies reativas de oxigênio começa pela redução de um elétron do oxigênio molecular (O_2) formando o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Equação 1). Este radical existe em equilíbrio com sua forma protonada, o radical perhidroxila ($HO_2^{\bullet}$), que é muito mais reativo do que o $O_2^{\bullet-}$ em solução aquosa (Equação 2). A dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Equação 3). Pela via do ciclo de Haber/Weiss catalisado por metal de transição, o H_2O_2 pode ser reduzido formando o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (Equação 4), que é extremamente oxidante. A via do ciclo de Haber/Weiss quando catalizada por Fe^{2+} é conhecida como reação de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; GIROTTI, 1990). O Cu^{2+} é quase tão eficiente como catalisador quanto o ferro, mas é um agente mutagênico mais potente do que este devido ao seu potencial de reação direta com as bases do DNA (BICKERS & ATHAR, 2006).

(PERCHELLET & PERCHELLET, 1989)

Por sua extrema reatividade, o radical hidroxila pode reagir imediatamente com moléculas próximas ao local da sua formação. O radical hidroxila reage com a maioria das ligações carbono-hidrogênio, com constantes de velocidades relativamente altas. Um dos mecanismos mais comuns de reação é a abstração de um átomo de hidrogênio levando à formação de um

radical orgânico. Ironicamente, a menor reatividade do radical ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio pode causar dano maior, já que estes podem difundir dos locais de formação e induzir a formação de radical hidroxila em locais remotos da célula. Ao contrário do radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio pode atravessar a membrana celular e causar dano em outras células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

O óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) é um radical livre com um elétron desemparelhado. Na pele, além de auxiliar na manutenção da homeostase celular, pode controlar a vasodilatação, a melanogênese e atuar na proteção contra patógenos invasores (BRUCH-GERHARZ *et al.*, 1998). Assim como o radical ânion superóxido, o radical óxido nítrico não é muito reativo. No entanto, se a produção de radical óxido nítrico for muito alta, ele pode causar danos aos tecidos celulares, como doenças neurodegenerativas e inflamações crônicas. O radical óxido nítrico pode interagir com radical ânion superóxido formando o peroxinitrito (ONOO^{-}), que é altamente reativo e citotóxico (HALLIWELL, 1997). Além disto, reage com radicais tirosina, encontrados no sítio ativo de algumas enzimas, em particular ribonucleotídeo redutase. Na presença de oxigênio, o radical óxido nítrico pode levar a formação de dióxido de nitrogênio (NO_2), que é um radical muito mais reativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A pele está situada na interface entre o corpo e o meio ambiente e atua como barreira para os efeitos deletérios da exposição à radiação ultravioleta (UV) e poluentes químicos. Além disso, um grande número de contaminantes presentes na dieta e nos medicamentos pode manifestar sua toxicidade na pele. Esses agentes ou seus metabólitos podem ser oxidantes e/ou produzirem, direta ou indiretamente, uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BICKERS & ATHAR, 2006). No entanto, a pele está equipada com uma variedade de antioxidantes capazes de inibir o dano oxidativo. Esta proteção pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1) seqüestro das primeiras espécies pro-oxidantes, 2) seqüestro de metais de transição, prevenindo a iniciação e propagação das reações de produção de radicais livres, 3) seqüestro dos radicais secundários que podem propagar as reações em cadeia ou reduzir grupos oxidados e, 4) reparo de macromoléculas e renovação celular (TEDESCO *et al.*, 1997).

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA, 1993).

Os antioxidantes naturalmente presentes em células são classificados em enzimáticos, ou antioxidantes de alto peso molecular, e não enzimáticos, ou antioxidantes de baixo peso molecular.

Os principais antioxidantes enzimáticos identificados na pele são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (**Figura 1**). A SOD, uma metaloproteína cuja função foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, é responsável pela dismutação do radical ânion superóxido a peróxido de hidrogênio. Na pele, esta enzima está presente nas formas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD. A catalase, uma hemoproteína contendo quatro grupos heme, catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. O mecanismo de inativação da catalase envolve a decomposição dependente de oxigênio de um dos quatro anéis de porfirina pela luz visível, tornando a capacidade da célula de remover peróxido de hidrogênio diminuída (STEENVOORDEN *et al.*, 1997; AFAQ & MUKHTAR, 2001). A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutathione reduzida (GSH) levando à formação de glutathione oxidada (GSSG) e água. A molécula de GPx é um tetrâmero, contendo um átomo de selênio por subunidade (BLACK, 1987). Como a atividade de glutathione peroxidase não é intensamente afetada pela radiação UV, ela é considerada o antioxidante mais importante da pele (FUCHS *et al.*, 1989; SHINDO *et al.*, 1994). Também estão presentes na pele enzimas auxiliares, responsáveis pelo suprimento de coenzimas como NADPH/NADH, a ubiquinona redutase e o sistema tioredoxina/tioredoxina redutase, que exercem importante função antioxidante (FUCHS, 1998).

Figura 1: Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio e os antioxidantes na pele. Células normais geram EROs, como radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como resultado do metabolismo normal ou como resultado da exposição a agentes ambientais, como poluentes químicos e radiação UV. Estas duas espécies podem gerar o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), altamente reativo pela reação de Haber–Weiss catalisada por metais de transição. Além destes, radicais livres de nitrogênio podem ser produzidos. O óxido nítrico (NO) gerado reage com $O_2^{\bullet-}$ produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). Após exposição à radiação UV, a absorção de fótons por componentes celulares chamados de cromóforos pode levar à formação de EROs (reações de fotossensibilização tipo I e II), que interagem com os lipídeos da membrana plasmática iniciando as reações de lipoperoxidação (LPO). Várias enzimas antioxidantes atuam na pele para degradar estas EROs. A SOD dismuta $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que é reduzido à água pela CAT e GPx. A GPx também catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos pela GSH levando à formação de GSSG, que é reciclada pela GSH redutase (Adaptado de BICKERS & ATHAR, 2006).

Os antioxidantes não enzimáticos não sintetizados pelo corpo humano, são o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), considerado o

antioxidante lipofílico de maior importância. Além destes, estão presentes compostos antioxidantes sintetizados pelo organismo, como a ubiquinona (coenzima Q), o tripeptídeo glutathione (GSH), o polipeptídeo tioredoxina e o ácido lipóico. O ascorbato, além de reagir com oxigênio singlete, radical hidroxila e radical ânion superóxido, atua na regeneração do radical tocoferil à alfa-tocoferol, preservando a capacidade desse último nas membranas biológicas (STEENVOORDEN *et al.*, 1997). Vitamina E é a descrição genérica para todos os derivados de tocoferol e tocotrienol, que qualitativamente exibem a mesma atividade biológica que o α -tocoferol, a forma mais ativa da vitamina E (WEBER *et al.*, 1997). A função principal do α -tocoferol *in vivo* é agir como um bloqueador da fase de propagação da peroxidação lipídica. O α -tocoferol também atua como um seqüestrante químico de oxigênio singlete (FRYER, 1993). No entanto, o tocoferol é fotoinstável, sendo que o seu espectro absorção estende-se até a faixa da radiação UV ($\lambda_{\text{max}}=295\text{nm}$). Quando a pele é exposta à radiação UV, o radical tocoferil é formado e pode induzir a lipoperoxidação (KAGAN *et al.*, 1992). Estes radicais podem ser regenerados a tocoferol pelo ascorbato. A glutathione (GSH), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, reduz hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela doação de um átomo de hidrogênio, formando glutathione oxidada (GSSG). A continuidade deste ciclo catalítico depende da redução da GSSG pela enzima glutathione redutase (GSH-Rd) na presença de NADPH, formado na via das pentoses (STEENVOORDEN *et al.*, 1997).

Os antioxidantes lipossolúveis tocoferol e ubiquinona encontram-se nas membranas e os antioxidantes hidrossolúveis ascorbato e glutathione estão principalmente localizados no citoplasma. Apesar da localização distinta na célula, os antioxidantes de baixo peso molecular não são independentes uns dos outros. Na verdade, como resultado de potenciais de redução decrescentes, eles podem reduzir uns aos outros e assim restaurar as suas formas ativas. Estes antioxidantes formam uma associação, que também é descrita como rede antioxidante (**Figura 2**) (PODDA & GRUNDMANN & KOLLMANN, 2001).

Figura 2: Rede de antioxidantes de baixo peso molecular. Um radical formado na região lipofílica da célula é reduzido pelo tocoferol localizado nas membranas, levando à formação do radical tocoferoxila. Este pode ser diretamente reduzido por um antioxidante lipossolúvel o ubiquinol. Entretanto, o radical tocoferoxila também pode ser reduzido pelo ascorbato, pela mudança no limite membrana-citosol. A forma oxidada, deidroascorbato, pode ser reconvertida pela glutatona (GSH). A GSH é regenerada a partir da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona redutase, que utiliza NADPH como cofator (PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

As espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação ultravioleta, a absorção direta de radiação por moléculas fotossensíveis e os mecanismos de regeneração de antioxidantes comprometem os sistemas de defesa antioxidante da pele promovendo o aumento de espécies pro-oxidantes no meio celular, sendo esta condição definida como estresse oxidativo (SIES, 1985, FUCHS *et al.*, 1989, LOPES-TORRES *et al.*, 1998). As espécies reativas de oxigênio podem causar dano a macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios, levando a doenças de pele como o câncer, fotoenvelhecimento e outras doenças inflamatórias cutâneas (SCHARTEFFETER-KOCHANKEK *et al.*, 1997).

1.2 O ciclo celular: progressão e regulação

O ciclo celular é um processo altamente organizado e regulado, o que garante a completa e correta replicação da célula antes da divisão celular. Este processo está dividido em quatro fases. Durante duas fases, uma cópia do material genético é produzida (fase S) e há uma partição de todos os componentes celulares entre as duas células filhas (fase M). As outras duas fases do ciclo, G_1 e G_2 (*gaps*), representam períodos intermediários durante os quais a célula se prepara para concluir as fases S e M. Células em G_1 que não se programam para a replicação do DNA podem parar e entrar em um estado de quiescência, denominado G_0 (**Figura 3**). Células em G_0 correspondem à maioria das células do corpo humano. As células normais precisam receber sinais mitogênicos antes de passar de um estado quiescente para um estado proliferativo. Estes sinais são transmitidos à célula por receptores, os quais ligam diferentes classes de moléculas sinalizadoras, tais como fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, moléculas de adesão ou hormônios. Este evento desencadeia uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação, que culmina com a ativação da maquinaria responsável pela divisão celular (MANGONE & FEDERICO, 2003).

Para assegurar a correta progressão do ciclo, as células desenvolveram uma série de pontos de checagem que previne a entrada em uma nova fase até que se tenha completado com sucesso a fase anterior. Mecanismos de conferência se desenvolveram para impedir que carcinógenos do meio ambiente, luz ultravioleta ou radiação ionizante, bem como espécies reativas de oxigênio, danifiquem o DNA, resultando em desenvolvimento de malformações, letalidade embrionária ou acúmulo de mutações que levam às doenças genéticas, incluindo o câncer. A ocorrência de lesões no DNA requer parada temporária da progressão no ciclo de forma a haver tempo para o reparo e para prevenir a fixação de mutações deletérias. Os pontos de verificação estão nas transições das fases G_0/G_1 (ponto de restrição R), G_1/S e G_2 /Mitose (**Figura 3**). Após passarem do ponto de restrição R, as células se tornam independentes dos estímulos mitogênicos (MALUMBRES & BARBACID, 2001). Estes mecanismos de checagem são dependentes de reações em cascatas mediadas por enzimas quinases e fosfatases. As duas

principais vias estudadas são a do ATM (ataxia-telangectasia *mutated*) e ATR (ataxia-telangiectasia *RAD3-related*), que são os sensores iniciais da lesão. Estas proteínas utilizam serina-treonina quinases de pontos de checagem (Chk1 e Chk2) como transdutores do sinal de lesão para ativação de proteínas efetoras que atuam no reparo do DNA, regulação da transcrição, replicação, controle do ciclo celular e apoptose, como cdc25 e p53 (ZHOU & BARTEK, 2004).

Para entrar em um ciclo celular de divisão, as células recrutam um grupo de proteínas regulatórias e enzimas. As enzimas-chave envolvidas no ciclo celular são um grupo de serina/treonina quinases conhecidas como quinases ciclina-dependentes (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*). Para fosforilar seus substratos, estas enzimas ligam-se a proteínas da família das ciclinas. Para uma divisão ordenada, cada uma das CDKs é ativa em certas fases do ciclo celular, regulada por uma ciclina específica, cujo nível varia durante o ciclo. A formação do complexo CDK4/6:ciclina D no início da fase G₁ comanda a passagem pelo ponto de restrição, sendo importante para progressão até a metade da fase G₁. O complexo ciclina E:CDK2, é responsável pela transição G₁-S, a ciclina A:CDK2 governa a progressão na fase S e a ciclina E:CDK1, a transição G₂-M (**Figura 3**) (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Os substratos atacados pelas ciclinas G1/CDK são fosfoproteínas da família da proteína do retinoblastoma (Rb): Rb, p107 e p130, que na sua forma ativa hipofosforilada, agem como inibidores da proliferação, mantendo acopladas proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular. Uma dessas proteínas é o fator transcricional E₂F. Havendo quantidade suficiente de ciclinas e ativação dos CDKs, o complexo entra no núcleo e as proteínas da família Rb são fosforiladas e liberam E₂F transcricionalmente ativo, que se liga ao promotor do gene da ciclina E, cujo produto protéico ativa CDK2. A indução da atividade máxima do complexo ciclina E-CDK2 está na transição G1/S. Quando as células entram em fase S, a ciclina E é degradada e CDK2 complexa-se com a ciclina A que é expressa no limite de G1/S promovendo a síntese de histonas e a transcrição de outros genes necessários para a replicação (MALUMBRES & BARBACID, 2001; VERMEULEN *et al.*, 2003).

Figura 3: Fases do ciclo celular. O local de atividade dos complexos regulatórios ciclina/CDK e os pontos de checagem estão também indicados (Adaptado de VERMEULEN *et al.*, 2003).

As CDKs podem ser inativadas de várias maneiras: os níveis de ciclina podem diminuir; a subunidade catalítica pode ser fosforilada mantendo-as em um estado inativo ou o complexo CDK-ciclina pode ligar-se a uma proteína inibitória (CKI, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor*) que interrompe sua atividade. A regulação destes pontos de inibição tem sido reconhecida atualmente como um mecanismo fundamental da inibição da proliferação. As CKIs são de dois tipos: família INK4 (p15, p16, p18 e p19) que se ligam à CDK4 ou CDK6, impedindo sua ligação às ciclinas, e a família CIP/KIP (p21, p27 e p57) que formam complexos com CDKs da fase G₁/S e inibem sua atividade (MANGONE & FEDERICO, 2003).

1.2.1 O gene supressor de tumor p53

A integridade e funcionalidade de um determinado tecidos são conferidos por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Esse equilíbrio é mantido por um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Nas duas últimas décadas do século XX, mais de 200 genes envolvidos no controle da proliferação celular foram caracterizados. A ativação de proto-oncogenes celulares, geralmente envolvidos na regulação positiva da proliferação, juntamente com a inativação dos genes supressores de tumor, que atuam restringindo-a, são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral. Os genes supressores de tumor codificam para proteínas que pela regulação dos pontos de checagem celulares inibem a progressão do ciclo, caso o DNA esteja danificado. As mutações inativadores para a maioria dos genes supressores de tumor são recessivas, ou seja, somente afetam sua função quando os dois alelos estão inativados (CAMARGO & COSTA, 2003; SILVA, 2004).

O gene p53, descrito em 1979, foi o primeiro gene supressor de tumor identificado. Inicialmente descrito como um oncogene, dados genéticos e funcionais obtidos 10 anos depois mostraram sua função como supressor de tumor. Além disso, foi demonstrado que a proteína p53 não atua corretamente na maioria dos tipos de câncer humanos. Em, aproximadamente, metade destes tumores, o p53 está inativado diretamente como resultado de mutações no gene. Em outros, sua inativação é indireta pela ligação com proteínas virais ou como resultado de alterações em genes que produzem produtos que interagem com p53 ou transmitem informações de/ou para o p53 (MAY & MAY, 1999; VOGELSTEIN *et al.*, 2000).

O gene supressor de tumor, que codifica para uma fosfoproteína de 53-kDa, mantém as células em estado normal pela modulação do ciclo celular, já que atua como reguladora transcricional de genes regulatórios. Em resposta ao dano ao DNA ou estresse celular, a p53 ativa genes que induzem o reparo o DNA ou a apoptose no caso de grande dano ao DNA (**Figura 4**) (LEVINE *et al.*, 1991; VOGELSTEIN & KINZLER, 1992, NATARAJ *et al.*, 1995).

Uma quebra na molécula de DNA é suficiente para aumentar a concentração celular da proteína p53. Os mecanismos envolvidos na ativação

de p53 ainda não estão completamente esclarecidos, mas envolvem ativação de genes como ATM, ATR, JNK e p38 na fosforilação de vários resíduos de serina de p53 (WOODS & VOUSDEN, 2001). A fosforilação de p53 leva a sua ativação por três mecanismos: 1) estabilizando a proteína, quebrando a interação entre HDM2 e p53, 2) aumentando sua atividade transcricional e 3) promovendo a localização nuclear de p53 (MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005).

A concentração da proteína p53 na célula é determinada, principalmente, pela velocidade com que é degradada. A degradação ocorre por um processo chamado de proteólise mediada pela ubiquitina, ou ubiquitinação. Neste processo, uma série de cópias de ubiquitina liga-se à proteína a ser degradada, permitindo seu reconhecimento pela maquinaria celular de degradação protéica. A proteína p53 liga-se a região regulatória do gene HDM2 (a forma humana do gene *murine double minute 2* – MDM2) e estimula sua transcrição. A proteína HDM2 liga-se à p53 e estimula a adição de grupos ubiquitinas a carboxi-terminação de p53, que é degradado (**Figura 4**). A proteína p14 (também conhecida como ARF) é um inibidor da ligação do HDM2 à p53 e conseqüentemente, leva ao aumento na concentração de p53 (VOGELSTEIN *et al.*, 2000; WOODS & VOUSDEN, 2001; WILLIAMS & OUHTIT, 2005).

O acúmulo de proteína p53 ativada induz a parada do ciclo celular na fase G₁, permitindo o reparo do DNA com dano antes da sua replicação S. Neste mecanismo, a proteína p53 ativa a transcrição de p21, um inibidor de CDK. A proteína p21 é encontrada como um complexo quaternário incluindo a ciclina, a CDK e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *proteasome-proliferating cell nuclear antigen*), que funciona como uma subunidade da DNA polimerase delta. Portanto, p21 pode inibir diretamente a replicação do DNA dependente de PCNA. O complexo ciclina/CDK inativo perde sua capacidade de fosforilar as proteínas da família RB. A proteína pRb na sua forma hipofosforilada seqüestra o fator de transcrição E₂F, necessário para a síntese de DNA, bloqueando a progressão do ciclo (**Figura 4**) (VOGELSTEIN *et al.*, 2000).

A proteína p53 é conhecida como ativadora de transcrição do promotor de PCNA, sendo o mecanismo pelo qual o gene p53 induz a expressão de

PCNA em resposta ao dano ao DNA (OUHTIT *et al.*, 2000a). A PCNA é uma proteína nuclear multifuncional de 36kDa e cofator de DNA polimerases. Atualmente, é sabido que PCNA não é, nem estruturalmente, nem evolutivamente relacionado às proteínas do ciclo. A PCNA é componente essencial para a síntese e metabolismo de ácidos nucleicos, atuando também na recombinação e replicação do DNA. Além disso, participa do reparo do DNA pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*) pela sua ligação com o gene Gadd45 (do inglês, *Growth arrest and DNA damage*) (KELMAN, 1997). A expressão de PCNA está aumentada em células que estão na fase S do ciclo celular. A ausência ou baixos níveis de PCNA funcional podem induzir a apoptose celular (KELMAN, 1997; PAUNESKU *et al.*, 2001). Além de marcador de proliferação celular, a PCNA é um importante marcador inicial para o reparo do DNA (MOORE *et al.*, 2004).

A p53 afeta diretamente dois mecanismos de reparo de DNA, NER e BER (do inglês, *Base Excision Repair*) pela ativação de genes destas vias. No NER, a p53 ativa p48XPE e XPC, genes associados a xeroderma pigmentosum. Outra proteína regulada por p53 é a Gadd45. Células com p53 mutado ou deletado não removem os adutos de DNA induzidos pela exposição à radiação UV, que são geralmente reparados por complexos do NER. Sabe-se menos sobre a via de reparo BER, no entanto, supõe-se que a p53 afeta BER pela regulação da DNA polimerase beta, que está diretamente envolvida no reparo e síntese do DNA (MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005).

Além da parada do ciclo celular, o acúmulo de p53 pode também induzir vias de apoptose, caso o dano ao DNA seja severo (**Figura 4**). Muitos dos sinais que induzem a apoptose convergem na mitocôndria, que responde aos sinais pró-apoptóticos pela liberação de citocromo-c, um potente catalisador de apoptose. Os membros da família Bcl-2 possuem tanto função pró-apoptótica (Bax, Bak, Bid, Bim) quanto anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W). A p53 ativa a expressão de genes pró-apoptóticos, como Bax, PUMA (do inglês, *p53-upregulated modulator of apoptosis*) e Noxa, que levam à liberação de citocromo-c pela mitocôndria. No citoplasma, o citocromo-c liga-se com a proteína Apaf-1, sendo esta por sua vez, capaz de se ligar a procaspases-9. Este agregado é chamado de apoptosoma. Este, na presença de ATP ou ADP,

gera caspase-9 ativa, que cliva caspases efetoras como as caspases-2, -3, -6 e -7, que levam a apoptose (HANAHAH & WEINBERG, 2000; MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005). Outra via de apoptose ativada por p53 é a dos receptores de morte celular, capazes de induzir caspases, como o Fas (CD95/APO-1). Estes receptores funcionam pelo recrutamento de uma série de moléculas sinalizadoras que fazem a transdução de sinais necessários para a indução de apoptose. A interação de Fas com o seu ligante (FasL) resulta no recrutamento de procaspase 8, que geram caspases-8 ativadas, capazes de clivarem caspases-1 e -3, que executam a morte apoptótica da célula (MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005).

Figura 4: Papel do gene p53 na parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose após lesões causadas no DNA (Adaptado de MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002)

1.3 Alterações na pele causadas pela exposição à radiação ultravioleta

A exposição à radiação UV pode ser tanto benéfica quanto maléfica à pele. Os efeitos benéficos compreendem a morte de patógenos, a indução da síntese de vitamina D e o tratamento de doenças de pele, como a psoríase. Dentre os efeitos maléficos, a exposição aguda à radiação UV pode resultar em dano ao DNA, a peroxidação lipídica e a degradação de proteínas, que podem levar a formação de eritema, queimadura solar, supressão imune, ativação de vias de proliferação e morte celular. Já a exposição crônica resulta na desregulação do mecanismo de apoptose celular levando a proliferação anormal de queratinócitos com dano ao DNA, mutações no gene p53, perda da interação do Fas-FasL, que contribui para o desenvolvimento do câncer de pele. Além disso, esta exposição também resulta na supressão imune e fotoenvelhecimento da pele (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002; MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005).

A porção UV da luz solar é subdividida de acordo com o comprimento de onda. Embora a camada de ozônio seja capaz de bloquear a radiação UVC (abaixo de 280 nm) e parte da radiação UVB (280-290 nm), outra parte da radiação UVB (290-315 nm) e a radiação UVA (315-400 nm) atingem a superfície terrestre. A radiação UVB corresponde de 1 a 10% da radiação que chega a superfície terrestre, enquanto a radiação UVA, de 90 a 99%. Ambas podem causar dano ao DNA direta ou indiretamente pela geração de espécies reativas de oxigênio. Estas EROs ativam fatores de transcrição que podem contribuir para a parada do ciclo celular, proliferação ou morte celular por apoptose (ICHIHASHI *et al.*, 2003; BOWDEN, 2004).

A porção mais citotóxica e mutagênica da radiação UV é a radiação UVB. As bases do DNA absorvem diretamente os fótons incidentes neste intervalo de comprimento de onda. O efeito fototóxico da radiação UVA é muito menor que da radiação UVB. A molécula de DNA não é um cromóforo para a radiação UVA, embora possa ser danificado pela reação de fotossensibilização iniciada pela absorção de UVA por outro cromóforo (ICHIHASHI *et al.*, 2003).

A maioria dos efeitos da radiação UVB no DNA é causada pela formação de fotoprodutos diméricos entre bases pirimidínicas adjacentes da mesma fita. As principais classes de lesões produzidas são os dímeros de pirimidina (CPD,

do inglês *cyclobutane pyrimidine dimers*) e os fotoprodutos 6-4, sendo este último menos freqüente que os primeiros. Outros tipos de dano que podem ocorrer são as quebras de fita do DNA, ligações cruzadas das fitas e fotoprodutos de purina (BLACK *et al.*, 1997). Dentre os dímeros de pirimidina, os dímeros de timina-citosina (TC) e citosina-citosina (CC) são as mais mutagênicas, já que as mutações TC → TT e CC → TT são as mais freqüentemente encontradas no gene p53 das células com câncer induzido por radiação UV (BRASH *et al.*, 1991).

Outros tipos de dano que podem ocorrer após exposição à radiação UV são as quebras de fita do DNA, ligações cruzadas das fitas e fotoprodutos de purina (BLACK *et al.*, 1997). As radiações UVA e visível (> 400-500 nm) causam dano indireto ao DNA pela geração de espécies reativas de oxigênio, como o radical ânion superóxido, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio pela formação de moléculas fotossensíveis. O principal alvo destas EROs é a base guanina do DNA, levando à formação de 8-deoxiguanosina (8-OHdG) (ICHIHASHI *et al.*, 2003). O dano fotooxidativo é uma consequência da supressão do sistema antioxidante da pele pelas espécies oxidantes (RANGARAJAN & ZATZ, 1999). Existem pelo menos três maneiras pelas quais a concentração de antioxidantes pode ser afetada pela radiação ultravioleta: (I) absorção direta de luz; (II) reação com espécies reativas de oxigênio geradas pelas reações de fotossensibilização e (III) mecanismo de recuperação no qual um antioxidante é poupado à custa de outro (LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998).

As células são equipadas com diversos mecanismos capazes de proteger as células dos efeitos deletérios das lesões induzidas no DNA. Os mecanismos de reparo incluem reversão da lesão, reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por emparelhamento errôneo (MMR, do inglês *Mismatch Repair*), reparo de quebras duplas do DNA, recombinação homóloga e junção de extremidades. Cada tipo de lesão requer um mecanismo de reparo específico e dependendo do erro, uma ou mais vias podem ser ativadas. Por exemplo, os dímeros de piridina e os fotoprodutos 6-4, que causam distorções maiores na dupla hélice são reconhecidas e removidas por NER. Lesões mais sutis, como as pequenas modificações de base, como 8- OHdG, induzidas por agentes oxidativos são removidas por BER (COSTA & MENCK, 2004).

A exposição à radiação UV pode ativar vários genes envolvidos no controle do ciclo celular e na regulação de proliferação. Dentre eles, o gene p53 tem papel importante na regulação do ciclo celular após a lesão do DNA induzida pela radiação UV. O acúmulo de proteína p53 resulta na parada de ciclo, pela indução da via do gene p21, seguida de reparo do DNA ou morte por apoptose, caso o dano seja muito severo (MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005). Quando o dano ao DNA não puder ser reparado, a formação de células de queimadura solar (CQS) assegura o descarte das células com dano. As CQS apresentam características morfológicas das células apoptóticas, como núcleo picnótico e encolhimento do citoplasma (ZIEGLER *et al.*, 1994). Tipicamente, as CQS acumulam-se na camada suprabasal da epiderme após exposição à radiação UV. As vias de morte celular que regulam a formação das CQS incluem vias do p53, do Fas/FasL, das proteases lisossomais e do apoptossomo. A formação das CQS é um processo multifatorial complexo e a via de morte que se segue depende do estado do queratinócito, da dose de UVB e do balanço entre fatores de morte e sobrevivência presentes no microambiente do queratinócito (LAETHEM *et al.*, 2005).

Embora o gene do p53 seja encontrado mutado em células de áreas freqüentemente expostas à radiação UV, somente uma pequena porcentagem desenvolve o câncer de pele. Isto não só indica que o arsenal apoptótico dos queratinócitos é extenso e é induzido por outras vias além da do p53, como também que pode ser ativado de maneira eficiente quando o reparo do DNA não é mais uma opção. Em longo prazo, a exposição repetida à radiação UV compromete o sofisticado balanço entre a formação de CQS e sobrevivência, importante na manutenção da homeostase da pele, e leva a expansão clonal de células com lesões pré-cancerosas. Neste estágio, a aquisição de mutações nos genes de sobrevivência e promotores de crescimento, ou alterações nos seus reguladores, poderá levar ao desenvolvimento de tumores malignos na pele (LAETHEM *et al.*, 2005; MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005).

A radiação solar pode exercer efeitos diversos sobre o sistema antioxidante da pele, dependendo da dose e da seqüência de exposição. Na pele exposta a doses eritematogênicas de UVB ou de radiação solar simulada, foi observada redução nas concentrações de ácido ascórbico (JURKIEWICZ & BUETTNER, 1994), alfa-tocoferol (FUCHS *et al.*, 1989; SHINDO *et al.*, 1993,

LOPEZ-TORRES, 1998); ubiquinol/ubiquinona e glutathione (FUCHS *et al.*, 1989; SHINDO *et al.*, 1993) e a inativação de glutathione peroxidase (LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998), glutathione reductase (FUCHS *et al.*, 1989), superóxido dismutase e catalase (PENCE & NAYLOR, 1990). O efeito da radiação UV no sistema antioxidante da pele varia entre estudos diversos. Estas variações podem estar relacionadas ao tipo de lâmpada empregada (comprimento de onda), à dose de exposição (SHINDO *et al.*, 1994) e ao tempo entre a exposição à radiação e a observação do efeito (PENCE & NAYLOR, 1990).

A exposição crônica à radiação UV pode resultar no envelhecimento acelerado da pele. Macroscopicamente, a pele fotoenvelhecida apresenta-se como uma superfície seca, nodular, com rugas profundas, sulcos acentuados, bolsas e saliências, pigmentação irregular, podendo haver o desenvolvimento de neoplasmas premalignos e malignos (GILCHREST & YAAR, 1992). Além disso, a exposição à radiação UV, pela geração de EROs, resulta na indução de uma série de metaloproteinases (MMPs, do inglês *Matrix metalloproteinases*), que estão implicadas no fotoenvelhecimento. Estas proteinases são capazes de degradar a rede de colágeno e outros componentes do tecido conjuntivo da pele. As EROs também podem atuar no mecanismo de elastose encontrado na pele fotoenvelhecida (MA *et al.*, 2001).

1.4 Prevenção do dano induzido pela radiação ultravioleta à pele

A helioterapia, originado na Europa, e o bronzamento recreacional foram popularizados no início do século XX. Gradualmente, a pele bronzeada foi associada à boa saúde e a melhor qualidade de vida. O primeiro produto utilizado para proteção solar, vendido no início dos anos 20, continha salicilato ou cinamato de benzila. A popularização dos filtros solares crescia à medida que o público percebia que quando utilizavam os filtros era possível permanecer por mais tempo expostos ao sol sem o risco de queimaduras graves. Uma publicação no ano de 1959 associou a exposição à radiação UV ao desenvolvimento de câncer de pele em camundongos. No entanto, o interesse nos protetores solares aumentou lentamente. O conceito de fator de proteção solar (FPS) foi desenvolvido pelo Prof. Franz J. Greiter na Áustria e adotado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) americano em

1978. Atualmente, muitas pessoas acreditam que a pele bronzeada parece mais sadia e atrativa. Outras acreditam que a queimadura solar é necessária para o bronzeamento. Algumas duvidam que filtros solares protejam contra o câncer de pele. Muitas acham que a exposição ao sol causa somente desidratação da pele, e, portanto, o dano causado pode ser facilmente tratado com aplicação de hidratantes. Portanto, a falta de conhecimento pode ser um fator significativo na falha de proteção solar individual (revisado por TAYLOR *et al.*, 1990).

Ao contrário da crença popular, um dia nublado ou o guarda-sol oferecem fotoproteção limitada. Uma nuvem fina reduz a incidência de radiação UV em apenas 20-40% num dia ensolarado. Algumas pessoas podem aumentar seu tempo de exposição ao sol, já que em um dia nublado podem não sentir a pele mais quente. A areia reflete a maior parte da radiação UV e, portanto, a sombra de um guarda-sol na praia reduz a exposição em apenas 50%. As roupas constituem o mais simples e prático de fotoproteção. As janelas de vidro bloqueiam virtualmente toda radiação UVB e, pelo menos, metade da radiação UVA, preferencialmente os comprimentos de onda mais curtos e biologicamente ativos (TAYLOR *et al.*, 1990).

Entre as estratégias de fotoproteção estão o aumento de absorção e/ou a dispersão de radiação solar. A natureza alcança isto promovendo o aumento da espessura do estrato córneo e da epiderme viável e estimulando a melanogênese. Uma maneira artificial de conseguir este tipo de fotoproteção é a aplicação tópica de filtros solares (ELMETS *et al.*, 1992).

Os filtros solares são formulações tópicas que reduzem os efeitos deletérios da radiação UV pela sua absorção, reflexão ou dispersão. Para ser eficiente deve apresentar grande espectro de absorção. Atualmente, a maioria dos filtros solares contém dois ou três componentes para bloquear uma maior porcentagem e espectro de comprimentos de onda. Os filtros físicos são, geralmente, formulações opacas com ingredientes que não absorvem seletivamente a radiação UV, mas refletem ou dispersam a radiação UV e visível. Estes filtros não são facilmente laváveis, mas podem derreter no sol e, portanto, oferecem proteção limitada quando o indivíduo se expõe ao sol por mais de algumas horas. Exemplos de filtros físicos incluem dióxido de titânio e óxido de zinco. Os filtros químicos são, em geral, formulações não opacas que

contém um componente que absorve a radiação. O PABA (do inglês, *ácido para-aminobenzóico*) e seus ésteres são os filtros químicos mais usados. Eles penetram no estrato córneo e se ligam a proteínas por pontes de hidrogênio. As benzofenonas e os cinamatos atuam em um espectro de UV maior. Em uma concentração de 6-10%, eles absorvem UVB e comprimentos de onda mais curtos de UVA, e, portanto, podem auxiliar na prevenção de algumas reações deletérias causadas pela radiação UV (GUPTA & MUKHTAR, 2002).

ELMETS e colaboradores (1992) demonstraram que uma formulação contendo cinamato e benzofenona, administrada topicamente em voluntários que receberam 1,5 MED (dose mínima capaz de causar eritema, do inglês, *minimal erythema dose*) de radiação solar simulada por 4 dias, foi capaz de reduzir a formação de eritema e células de queimadura solar.

Os resultados obtidos por ANANTHASWAMY e colaboradores (1999) indicam que formulações contendo diferentes filtros químicos e físicos são capazes de reduzir as mutações no gene p53, assim como o aparecimento de tumores, reforçando a importância do uso de filtros solares na prevenção do câncer de pele do tipo não melanoma.

Uma outra estratégia de fotoproteção é a inibição da formação e/ou o seqüestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas em consequência da exposição à radiação UV, mediante a aplicação tópica de antioxidantes (FUCHS, 1998).

A aplicação tópica de alfa-tocoferol e ascorbato na pele de camundongos sem pêlo, antes da irradiação crônica com radiação UVB e UVA, foi eficaz na prevenção do fotoenvelhecimento. A aplicação tópica de palmitato de ascorbila e de acetato de α -tocoferol (pró-fármacos mais estáveis do ponto de vista farmacotécnico) foi menos eficiente na prevenção do fotoenvelhecimento que as formas livres (BISSET *et al.*, 1990).

LOPEZ-TORREZ e colaboradores (1998) estudaram o efeito da aplicação tópica de alfa-tocoferol sobre o sistema antioxidante da pele exposta à radiação UV (exposição aguda a um simulador solar; Solar Light Co.). Foi demonstrado que esta aplicação modula os níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos da pele e inibe de maneira significativa a peroxidação lipídica induzida por radiação UV na epiderme.

BERTON e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento tópico de camundongos sem pêlo com alfa-tocoferol aumentou o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) dos dímeros de pirimidina produzidos pela exposição à radiação UVB, assim como os efeitos iniciais da fotocarcinogênese, como a expressão do p53. Além disso, McVEAN e LIEBLER (1999) demonstraram que a aplicação tópica de alfa-tocoferol e seus derivados foi capaz de prevenir a formação de dímeros de pirimidina na pele de camundongo exposta à radiação UVB.

BURKE e colaboradores (2000) demonstraram que a aplicação tópica de alfa-tocoferol e derivados foi capaz de reduzir os danos causados pela exposição aguda à radiação UVB, como inflamação e pigmentação. Além disso, observaram diminuição na incidência de tumores e maior tempo necessário para o aparecimento dos mesmos, nos animais tratados com alfa-tocoferol e seus derivados.

A aplicação tópica de um derivado solúvel em água de alfa-tocoferol (γ -TDMG) foi capaz de prevenir significativamente a formação de CQS, peroxidação lipídica e o edema/inflamação induzidos pela exposição aguda à radiação UVB (5kJ/m^2) (YASUOKA *et al.*, 2005).

Recentemente, os antioxidantes de origem natural, aplicados topicamente ou administrados oralmente, apresentam uma perspectiva promissora de prevenção dos efeitos deletérios causados pela radiação UV na pele. Esta abordagem é conhecida como fotoquimioprevenção, que difere do tratamento de câncer, já que seu objetivo é reduzir a taxa de aparecimento do câncer e, portanto, sua incidência (AFAQ *et al.*, 2005).

GONZÁLEZ e colaboradores (2003) investigaram o efeito da administração oral de luteína e zeaxantina na resposta cutânea à exposição UVB. A luteína e a zeaxantina são carotenóides encontrados em diversas frutas e vegetais, como brócolis, espinafre e couve. Os resultados demonstraram que este tratamento reduz significativamente o edema cutâneo e a células marcadas com PCNA, sugerindo que estes carotenóides diminuem a resposta inflamatória e a hiperproliferação celular induzidas pela exposição à radiação UVB.

A administração oral de cafeína duas semanas antes da exposição aguda à radiação UVB aumentou a apoptose na epiderme de camundongos

sem pêlo (LU *et al.*, 2000). Além disso, a aplicação tópica de cafeína imediatamente após a irradiação também aumentou a apoptose (LU *et al.*, 2002a). Em estudos de exposição crônica, os animais irradiados duas vezes por semana por 20 semanas. Estes animais não apresentavam tumores de pele, mas tinham alto risco de desenvolvê-los nos próximos meses (camundongos de alto risco). Tanto a aplicação tópica quanto oral foram capazes de inibir a formação destes tumores como aumentar seletivamente a apoptose das células com dano (Lou *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002b). Estudos recentes com camundongos sem pêlo demonstraram que a aplicação tópica de um creme contendo 8% de benzoato sódico de cafeína (cafeína-SB) imediatamente depois da exposição à radiação UVB foi capaz de aumentar em 2 a 3 vezes a apoptose do que nos animais tratados com doses equimolares de cafeína (creme com 4,8% de cafeína). Além disso, a cafeína-SB e a cafeína foram capazes de diminuir a formação de dímeros de pirimidina quando aplicadas 30 minutos antes da irradiação. Adicionalmente, a cafeína-SB inibiu a formação de tumores em camundongos pré-tratados com UVB cronicamente (camundongos de alto risco) (LU *et al.*, 2007).

O resveratrol (trans-3,4'-5-trihidroxistilbeno) (**Figura 5**) é um polifenol encontrado na pele e sementes de uva, noz e frutas e também, no vinho tinto. Possui alta atividade antioxidante, com propriedades antiinflamatórias e antiproliferativas (AFAQ & MUKHTAR, 2006). A aplicação tópica de resveratrol em camundongos sem pêlo antes da exposição à radiação UVB reduziu o edema, a formação de peróxido de hidrogênio e a infiltração de leucócitos (AFAQ *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou que o efeito fotoprotetor do resveratrol contra os efeitos causados pela exposição múltipla à radiação UVB ocorre pela modulação da rede ciclina/CDK/CKI, com diminuição de PCNA, ciclina D₁ e ciclina D₂ e aumento da expressão de p53 e p21 (REAGAN-SHAW *et al.*, 2004). Em estudos de exposição crônica, a aplicação tópica de resveratrol (antes e depois da irradiação) demonstrou inibição significativa da incidência de tumores e o retardo no aparecimento da tumorigênese (AZIZ *et al.*, 2005).

Figura 5: Estrutura química do resveratrol (AFAQ *et al.*, 2003)

A silimarina, flavonóide extraído das sementes do *Silybum marianum*, é uma mistura de pelo menos três isômeros estruturais: silibinina (ou silibina) (**Figura 6**), silidianina e silicristina. Clinicamente, é utilizada como agente hepatoprotetor. Diversos estudos demonstraram que a silibinina é um antioxidante eficiente, capaz de seqüestrar EROs, sendo aproximadamente 10 vezes mais eficaz do que a vitamina E (revisado por SINGH & AGARWAL, 2005). MALLIKARJUNA e colaboradores (2004) utilizaram administração tópica e oral da silibinina em seus estudos para investigar um possível efeito protetor na fotocarcinogênese induzida pela radiação UVB na pele de camundongos sem pêlo. Três protocolos diferentes foram utilizados, nos quais a silibinina foi aplicada topicamente antes ou depois da irradiação, ou administrada na dieta. Estes tratamentos resultaram na diminuição moderada da incidência de tumores e no aumento do período de latência (aparecimento do primeiro tumor) em até quatro semanas, além de afetar a multiplicidade e o volume tumoral.

Figura 6: Estrutura química da silibinina (SINGH & AGARWAL, 2005)

Outros estudos demonstraram que os tratamentos tópico e oral com silibinina reduziram a formação de dímeros de pirimidina, causada pela radiação UVB na pele de camundongos sem pêlo (DHANALAKHMI *et al.*, 2004; MALLIKARJUNA *et al.*, 2005). A silibinina também foi capaz de reduzir o número de células marcadas para PCNA e aumentar as células positivas para p53 e p21 na pele de camundongos tanto nas exposições aguda e crônica à

radiação UVB, além de inibir em 52% o aumento da espessura da epiderme viável no estudo de exposição aguda (MALLIKARJUNA *et al.*, 2004; DHANALAKHMI *et al.*, 2004). Além disso, tanto o tratamento prévio quanto o posterior à irradiação foram capazes de diminuir a formação de células apoptóticas na exposição aguda à radiação UVB na pele (DHANALAKHMI *et al.*, 2004). Na exposição crônica (25 semanas) a silibinina promoveu apoptose na pele de camundongos (MALLIKARJUNA *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem o papel fotoquimioprotetor da silibinina contra a fotocarcinogênese.

O chá verde, manufaturado a partir das folhas frescas da *Camellia sinensis*, contém quatro polifenóis principais: epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigallocatequina (EGC) e epigallocatequina-3-galato (EGCG) (**Figura 7**). Existem algumas evidências que indicam que os polifenóis do chá verde protegem contra o dano oxidativo causado pela radiação UV na pele. Um dos mecanismos propostos é pelo seqüestro das EROs pelas moléculas dos polifenóis (revisado por YUSUF *et al.*, 2007). Foi demonstrado que pequenas concentrações destes polifenóis reduzem o dano às bases e a quebra de fita do DNA causadas pelo radical hidroxil por um mecanismo de transferência de elétron das catequinas para o radical (ANDERSON *et al.*, 2001).

Figura 7: Estrutura química dos principais polifenóis presentes no chá verde (YUSUF *et al.*, 2007).

Em experimentos *in vivo*, tanto a administração oral quanto tópica dos polifenóis do chá verde e da EGCG foram capazes de proteger contra as respostas de queimadura, supressão imune e fotoenvelhecimento causadas pela radiação UV (revisado por YUSUF *et al.*, 2007). A aplicação tópica de EGCG reduziu a produção de metaloproteínas induzidas pela exposição à

radiação UV, que degradam o colágeno levando ao fotodano (VAYALIL *et al.*, 2004). Adicionalmente, quando aplicada tópica ou oralmente antes da exposição à radiação UVB na pele de camundongos sem pêlo, os polifenóis do chá verde e a EGCG protegem contra a depleção de glutatona, glutatona peroxidase e catalase, diminuem a peroxidação lipídica e inibe a oxidação de proteínas (VAYALIL *et al.*, 2003; VAYALIL *et al.*, 2004). A EGCG também protege a pele humana contra os efeitos causados pelo estresse oxidativo induzido pela radiação UV. Quando aplicado previamente na pele de voluntários antes da exposição com UVB (4MED), ocorreu diminuição na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, além da redução da peroxidação lipídica na derme e epiderme (KATYAR *et al.*, 2001).

Outros estudos *in vivo* demonstraram que a pele previamente tratada com polifenóis do chá verde antes da exposição à radiação UVB apresentou menor formação de dímeros de pirimidina, aumento das células positivas para p53 e p21 (KATYAR *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2000). Estes resultados indicam os efeitos fotoprotetores dos polifenóis do chá verde na fotocarcinogênese.

1.4.1 *Pothomorphe umbellata* L. Miq

O Brasil possui uma flora extremamente rica em plantas medicinais, sendo freqüente o uso popular destas para o tratamento de inúmeras doenças. A *Pothomorphe umbellata*, família *Piperaceae*, popularmente conhecida como pariparoba, é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como: insuficiência renal, males do fígado, má digestão, bronquite asmática e, externamente, no tratamento de queimaduras e feridas comuns (Moraes, 1983). A Farmacopéia Brasileira, em sua primeira edição, oficializou o uso da pariparoba, *Pothomorphe umbellata* L. Miq, no Brasil, registrando como droga as raízes secas do vegetal (Silva, 1926).

Estudos realizados demonstraram a atividade antioxidante do extrato liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata*, quando avaliada em ensaios *in vitro*, em parte atribuída à presença do composto fenólico, o 4-nerolidilcatecol (4-NC) (**Figura 8**) (BARROS *et al.*, 1996). Em outro ensaio *in vitro*, o extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata* mostrou um potencial antioxidante significativamente maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado, sugerindo a

presença de compostos adicionais com atividade antioxidante (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

Figura 8: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol (KIJJOA *et al.*, 1980)

Visando uma aplicação do extrato de *P. umbellata* como antioxidante para uso tópico, Ropke (1998) iniciou estudos *in vivo* de avaliação de atividade antioxidante em pele de camundongos sem pêlo. Este estudo demonstrou que a aplicação tópica de um extrato liofilizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* foi capaz de causar uma redução de 97% nos indicadores de lipoperoxidação, avaliados pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e emissão de quimiluminescência. Esta atividade antioxidante foi 2,5 vezes maior que a do α -tocoferol, aplicado nas mesmas condições, sugerindo o emprego do extrato de pariparoba em formulações cosméticas, com objetivo de combater os efeitos danosos causados por radicais livres.

O extrato de *P. umbellata* mostrou atividade antiinflamatória, no modelo animal de edema de pata de rato induzido por carragenina (DESMARCHELIER *et al.*, 2000). Além disso, PERAZZO e colaboradores (2005) demonstraram que o pré-tratamento com o extrato *P. umbellata* diminuiu o número de contrações musculares induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%, modelo utilizado para avaliação de efeitos analgésicos. Estes autores confirmaram ainda o efeito do pré-tratamento, por via oral, com o extrato bruto sobre a inibição do edema de pata induzido por carragenina, bem como sobre a formação de granuloma subcutâneo induzido por algodão.

A fim de exercer sua atividade antioxidante, no caso de uma aplicação externa, o princípio ativo deve primeiro permear a pele, que funciona como barreira de permeação para certas substâncias (SAIJA *et al.*, 2000). O estudo de permeação cutânea utilizando quatro formulações tópicas (gel de 4-NC, gel-creme de 4-NC, creme O/A de 4-NC e gel de *P. umbellata*) demonstrou que o

gel de *P.umbellata* apresentou uma maior taxa de permeação levando a uma maior concentração do princípio ativo 4-NC na pele (ROPKE *et al.*, 2002).

Ropke e colaboradores (2003) avaliaram ainda a influência da aplicação de um gel contendo extrato de *P. umbellata* (0,1% de 4-NC) nas concentrações e atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos da pele de camundongos sem pêlo irradiados com 230 mJ/cm² de radiação UVB. A irradiação não teve influência nas concentrações de ácido ascórbico e na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), tendo, entretanto, sido observada uma redução de 40% ($p < 0,01$) na concentração de α -tocoferol na pele do grupo controle irradiado. No grupo tratado com *P. umbellata*, o α -tocoferol foi totalmente preservado, quando comparado às concentrações encontrados no grupo controle não irradiado ($\approx 100\%$, $p > 0,05$). Segundo os autores, os resultados sugerem que ou a dose de exposição pode ter sido insuficiente para causar alterações nos demais antioxidantes avaliados ou o tempo de sacrifício dos animais após a irradiação (imediatamente após a irradiação) foi insuficiente para se promover alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Outros autores observaram que as concentrações de CAT e SOD diminuem 6h após a irradiação e permanecem diminuídos até 72h (PENCE & NAYLOR, 1990; SHINDO *et al.*, 1994). MAEDA e colaboradores (1991) observaram, em ensaios de exposição crônica de 6, 12 e 24 semanas à radiação UVA, aumento significativo na atividade da SOD e da GPx.

Adicionalmente, Ropke e colaboradores (2005), descreveram os efeitos benéficos da aplicação tópica de pariparoba, em pele exposta cronicamente (22 semanas) à radiação UVB. Seus resultados demonstraram que o gel contendo *P. umbellata* previne o aumento da espessura epidérmica classicamente observada em grupos irradiados com radiação UVB. Observou-se também a modulação da espessura das fibrilas elásticas e colagênicas em relação ao grupo irradiado. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4-NC, presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

A espécie *Pothomorphe umbellata* foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 proveniente de homogeneizados de pele de camundongos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* o efeito inibitório do extrato de *P.umbellata* foi muito maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado, o que sugere a presença de outras substâncias com atividade inibitória de MMPs no extrato (Ropke *et al.*, 2006). Os resultados do estudo de fotoenvelhecimento podem estar relacionados à inibição da atividade das MMPs pelo extrato de *P. umbellata*, uma vez que a exposição à radiação ultravioleta é capaz de induzir diretamente ou, indiretamente, por geração de espécies reativas de oxigênio, alterações na expressão gênica e protéica de elementos da matriz extracelular (Gilchrest & YAAR, 1998; Seité *et al.*, 2004; Ropke *et al.*, 2005).

Em relação à avaliação toxicológica *in vivo*, Barros e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato de *P. umbellata* não apresentou toxicidade oral aguda e sub-crônica para ratos, bem como ausência de mutagênese avaliada pela presença de micronúcleos em sangue periférico de camundongos tratados com 3 doses de 500mg/Kg de peso corpóreo de extrato bruto de raiz de *P. umbellata*.

A fim de garantir a eficácia da formulação ao longo do tratamento é importante o conhecimento da estabilidade do princípio ativo na mesma.

Estudos anteriores mostraram, em animais que receberam aplicação tópica de gel contendo extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* e irradiados com UVB, ausência de degradação do 4-nerolidilcatecol frente à radiação (ROPKE, 2003c).

Entretanto estudos controlados para verificar a estabilidade do princípio ativo de interesse (4-nerolidilcatecol) devem ser conduzidos para validar a formulação em estudo e descartar os efeitos da radiação, garantindo que os efeitos biológicos encontrados possam ser relacionados à presença do princípio ativo.

2. Objetivo

Avaliar os efeitos do gel de extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* sobre alterações promovidas pela exposição aguda e crônica à radiação ultravioleta em pele de camundongos sem pêlo, linhagem HRS/J, visando aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de fotoproteção promovidos por este tratamento.

Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade química de formulação em gel contendo extrato padronizado de raiz de *P. umbellata*
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *P. umbellata*
- Avaliar os efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B nos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático da pele de camundongos sem pêlo tratados ou não com gel de extrato padronizado de raiz de *P. umbellata*.
- Avaliar, em camundongos sem pêlo tratados ou não com gel de extrato padronizado de raiz de *P. umbellata*, os efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B por meio da avaliação imunohistoquímica das proteínas p53 e PCNA, observação de células de queimadura solar e medida da espessura da epiderme viável.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata*

3.1.1 Coleta e processamento das raízes de *Pothomorphe umbellata*

As raízes de *Pothomorphe umbellata* (**Figura 9**) foram coletadas no campus da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária (Butantã, São Paulo) e uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com o nome de Silva/Ropke 01.

Figura 9: Raízes de *Pothomorphe umbellata*

As raízes foram lavadas e secas à sombra por quatro dias e trituradas em partes menores. Posteriormente, foram secas em estufa com circulação de ar e temperatura de 50°C por cinco dias e estocadas em local seco e ao abrigo da luz.

Para a obtenção do extrato, as raízes foram moídas em moinho de facas e martelo, passadas por tamis de malha de 1 mm e posteriormente, o material foi reprocessado no moinho de facas e martelos e tamisado em malha de 0,25 mm, já que resultados obtidos anteriormente no laboratório demonstraram que a extração de 4-nerolidicatecol é três vezes maior quando se utiliza este tamanho de malha quando comparada com a malha de 1 mm (NORIEGA-SALAZAR *et al.*, 2005).

3.1.2 Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico

As raízes tamisadas foram umedecidas com solução de etanol:água (1:1, v/v) colocadas no percolador e maceradas por uma hora. Procedeu-se, então, a percolação até esgotamento total da droga, segundo processo A da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). Posteriormente, o extrato foi concentrado a vácuo a temperatura constante de 40°C e o resíduo aquoso liofilizado em liofilizador marca Edwards do Brasil (BARROS *et al.*, 1996).

3.1.3 Isolamento do 4-nerolidilcatecol

O extrato liofilizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* foi submetido à cromatografia em coluna filtrante de sílica gel 60 (0,063 – 0,100 mm Merck®) (100 g) para o isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC), utilizando-se como eluente diclorometano (Merck® p.a.). O isolamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de alumínio para cromatografia de sílica gel 60 F250 (Merck®) e fase móvel composta por diclorometano:metanol (91:1, v/v), tendo como reveladores: a) luz ultravioleta e b) solução de beta-caroteno 0,02% em etanol:clorofórmio (2:1, v/v) (FREITAS, 1999), sendo o padrão o 4-NC previamente isolado em nosso laboratório e identificado por ressonância magnética nuclear.

As frações 3 e 4, que continham 4-NC, foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna semipreparativa com detecção ultravioleta. O sistema utilizado foi o Shimadzu SCL 10A vp com detector SPD 10A vp (diode array), software Class VP, coluna semi-preparativa Luna C18, 10µ, 250x10mm (Phenomenex®) com pré-coluna C18, 10x10mm (Phenomenex®). A fase móvel utilizada foi metanol:água (9:1, v/v), com fluxo de 4mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 282 nm. A fração correspondente ao 4-NC foi coletada aos 8 minutos da corrida cromatográfica, sendo este o tempo de eluição correspondente ao padrão. A identificação estrutural do 4-nerolidilcatecol presente nesta última fração isolada foi realizada mediante obtenção de dados de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio.

3.1.4 Doseamento de 4-nerolidilcatecol no extrato de *Pothomorphe umbellata*

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi composto de bomba Waters Model 510 injector 7161 Rheodyne dotado de loop de 20µL, detector eletroquímico HP 1049^A, constituído de eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products. A fase móvel utilizada foi metanol:água 9:1(v/v), contendo KCl 2mM e LiClO₄ 20mM, com fluxo 1,0mL/min. Coluna Supelcosil LC-8,3µm, 75x4,6mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). O detector eletroquímico foi programado para potencial 0,600V, polaridade de oxidação, modo de amperometria. O 4-NC foi dissolvido em etanol Licrosolv[®] (Merck[®]). A padronização foi realizada segundo ROPKE e colaboradores (2003b).

A curva de calibração para o 4-NC (**Figura 10**) foi construída a partir das sextuplicatas de 5 concentrações (0,313; 0,153; 0,077; 0,035 e 0,0156 µg/mL), sendo o cálculo de regressão linear realizado pelo método dos mínimos quadrados.

A precisão da análise foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%).

Precisão = CV% = desvio padrão/concentração média determinada.

A precisão foi avaliada em dias diferentes (CV% inter-dia) (**Tabela 1**). Variações entre 15 e 20% têm sido consideradas aceitáveis, segundo Guia para validação de métodos analíticos publicado pela ANVISA na resolução nº475 (2002).

Figura 10: Curva de calibração de 4-NC no intervalo de concentração de 0,0156 a 0,313 µg/mL

Tabela 1: Valores da curva de calibração de 4-NC dissolvido em etanol Licrosolv® e avaliação da precisão quantitativa por CLAE

Concentração (µg/mL)	Média das áreas dos picos*	desvio-padrão	CV% inter-dia
0,313	806515	87244	10,8
0,153	395988	40498	10,2
0,077	206969	25234	12,2
0,035	117801	10020	8,5
0,0156	62591	8795	14,1

* média de no mínimo 6 injeções; CV – coeficiente de variação

Foram analisadas seis amostras do extrato seco da raiz de *Pothomorphe umbellata*, diluídas até a concentração de 2,5 µg/mL em etanol:água 1:1 (3 diluições para cada amostra). A média das concentrações foi de 0,179±0,007 µg/mL, o que equivale a uma concentração de 7,09% de 4-NC no extrato.

3.2 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* (SILVA, *et al.*, 2005 – anexo 2)

3.2.1 Preparação das formulações

Considerando-se que a formulação em gel contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* apresentou melhores resultados quando comparada com formulações gel-creme e creme em estudo de permeação *in vitro* (ROPKE *et al.*, 2002), esta foi escolhida para realização dos estudos de estabilidade química.

Nesse mesmo estudo (ROPKE *et al.*, 2002), a concentração de carbômero 940 (Carbopol® 940) utilizada na formulação em gel foi de 0,6% (p/p). Porém, quando se adicionou a quantidade de extrato de *Pothomorphe umbellata* necessária para concentração final de 0,1% de 4-NC (concentração escolhida com base nos estudos de avaliação de atividade antioxidante, ROPKE, 1998), o gel apresentou menor consistência do que a obtida anteriormente. Isto pode ser explicado pela maior quantidade de extrato que se adicionou, já que nos estudos anteriores a concentração de 4-NC no extrato utilizado era de 23,7%.

Realizando-se testes com géis com outras concentrações de carbômero 940 (0,5; 1,0 e 1,5% p/p), observou-se que o gel com 1,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração final de 0,1% de 4-NC, apresentava a melhor consistência, sendo este escolhido para o estudo de estabilidade.

A fim de verificar se a adição de um outro antioxidante poderia influenciar a estabilidade do 4-NC na formulação, optou-se pela adição de butil-hidroxitolueno (BHT) a 0,05%, antioxidante amplamente utilizado na indústria cosmética em concentrações que variam de 0,0002% a 0,5% (LANIGAN & YAMARIK, 2002). As formulações apresentadas na **Tabela 2** foram utilizadas neste estudo.

Tabela 2: Composição das formulações em gel contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* empregadas nos estudos de estabilidade química

	1	2
Carbômero 940	1,5	1,5
Propilenoglicol	10	10
Trietanolamina	0,5	0,5
Metilparabeno	0,25	0,25
BHT	-	0.05
Extrato seco da raiz de <i>P. umbellata</i>	1,41*	1,41*
Água destilada q.s.p.	100	100

*porcentagem estabelecida após determinação da concentração 4-nerolidilcatecol no extrato de *Pothomorphe umbellata* (7,09%) (item 3.1.4).

As formulações foram preparadas hidratando-se o carbômero em metade do volume total de água. Após 24 horas, adicionou-se o volume restante de água, o propilenoglicol, o metilparabeno, o BHT (este somente na formulação 2 da **Tabela 2**) e finalmente, o extrato de *P. umbellata*. Seguiu-se, então, a neutralização com trietanolamina sob constante agitação manual, até consistência adequada para o gel e pH igual a 5.

3.2.2 Estudo de estabilidade química da formulação frente à concentração de 4-NC

As duas formulações foram preparadas e divididas (10g) em vidros âmbar com tampa lacre de rosca, sendo 3 amostras de cada formulação para cada tempo predeterminado de análise. As amostras foram armazenadas sob diferentes condições de temperatura escolhidas: 4, 25 e 45°C (± 1 °C). A concentração de 4-NC foi determinada nos dias 1, 3, 7, 17, 37, 44, 81, 103 após preparação das formulações (RIBEIRO *et al.*, 1996; CARLOTTI *et al.*, 2002).

Para extração do 4-NC do gel de carbômero 940 utilizou-se técnica de Burton e colaboradores (1985) para extração de alfa-tocoferol de homogenatos de tecidos, modificada para estas condições (ROPKE *et.al.*, 2002). A 0,05g de

gel adicionou-se 1mL de água deionizada e agitou-se em vórtex por 1 minuto. Adicionou-se 10mL de hexano (Merck® p.a.) e a mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos. Após centrifugação (3 minutos, 1000 rpm) 1 mL da fração hexânica foi retirada e evaporada em atmosfera de nitrogênio. As amostras foram então, ressuspensas em 1mL de etanol Licrosolv® (Merck) até diluição final 1:16, filtradas (0,22µm) e analisadas por CLAE no sistema cromatográfico descrito no item 3.1.4.

3.3 Estudo de permeação cutânea *in vitro* de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata*

3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas sem pêlo, linhagem HRS/J, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 10 semanas de idade. Os animais foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas, ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e receberam ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.3.2 Formulações

Neste estudo foram avaliadas 6 diferentes formulações: três com extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% (p/p) de 4-NC, contendo 0,5; 1,0 e 1,5% (p/p) de carbômero 940; e três formulações com extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,05% (p/p) de 4-NC, contendo 0,5; 1,0 e 1,5% (p/p) de carbômero 940. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das diferentes concentrações de carbômero 940 e do extrato de *Pothomorphe umbellata* na permeação cutânea nestas formulações. Na **Tabela 3** são apresentadas as composições das formulações utilizadas neste estudo.

Tabela 3: Composição (% p/p) das formulações empregadas no estudo de permeação cutânea *in vitro* do extrato de *Pothomorphe umbellata*

	Gel 0,05% 4-nerolidilcatecol			Gel 0,1% 4-nerolidilcatecol		
Carbômero 940	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
Propilenoglicol	10	10	10	10	10	10
Trietanolamina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Metilparabeno	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Extrato seco da raiz de <i>P.umbellata</i>	0,71*	0,71*	0,71*	1,41*	1,41*	1,41*
Água destilada q.s.p.	100	100	100	100	100	100

* porcentagem estabelecida após determinação da concentração 4-NC no extrato de *Pothomorphe umbellata* (7,09%) (item 3.1.4).

As formulações foram preparadas hidratando-se o carbômero em metade do volume total de água. Após 24 horas, adicionou-se o volume restante de água, o propilenoglicol, o metilparabeno e o extrato de *P. umbellata*. Seguiu-se, então, a neutralização com trietanolamina sob constante agitação manual, até consistência adequada para o gel e pH igual a 5.

3.3.3 Estudos de permeação cutânea *in vitro*

A permeabilidade de uma membrana foi estudada *in vitro* pelo uso de célula de Franz modificada.

Após o sacrifício, por deslocamento cervical, dos camundongos fêmeas sem pêlo, a pele dorsal foi retirada e a fáscia e a cútis foram removidas com gaze e tampão fosfato de potássio 0,1mM pH7,0. Os cortes de pele foram montados em células de Franz modificadas (1,61 cm² de superfície) (**Figura 11**). Foram aplicados 600 miligramas das formulações (**Tabela 3**) na superfície da pele, cobrindo completamente a área de pele exposta. A solução receptora utilizada foi etanol:água (1:1, v/v) (TOUITOU & FABIN, 1988), para garantir a total dissolução do 4-NC, uma vez que compostos insolúveis em água podem não ter uma partição adequada em um meio receptor, dificultando a criação de condições adequadas ao estudo de permeação (BRONAUGH & STEWARD,

1983). O meio receptor foi mantido a 37°C e sob agitação durante a realização dos experimentos. Foram retiradas amostras (600µL) em tempos predeterminados (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 11,5; 24h) durante o processo de permeação. A cada coleta, o volume de amostra retirado foi repostado com solução receptora. As amostras foram analisadas em sistema cromatográfico descrito no item 3.1.4. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Figura 11: Célula de Franz

3.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata*

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas sem pêlo do biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, com idades entre 8 e 20 semanas. Os animais foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas, ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e receberam ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.4.2 Sistema de irradiação

A lâmpada utilizada para irradiação dos animais foi a UVB Philips TL 12RS 40W. A dose foi medida em radiômetro International Light IL 1700, com

sensor UVB SED 240, no laboratório do Prof. Titular Paolo DiMascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O espectro de emissão da lâmpada está representado graficamente na **Figura 12**. A distância entre a lâmpada e o dorso dos animais foi de 21cm.

Figura 12: Espectro de emissão da lâmpada UVB Philips TL 12RS 40W

3.4.3 Protocolos de exposição à radiação UVB

Para todos os ensaios, os animais foram separados em quatro grupos: controle (sem exposição à radiação UVB e sem tratamento), UVB (expostos à radiação UVB e sem tratamento), UVB+veículo (expostos à radiação UVB e tratados com gel de carbômero) e UVB+*P. umbellata* (expostos à radiação UVB e tratados com extrato padronizado de raiz de *P. umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC). A formulação em gel contendo 0,5% (p/p) de carbômero e extrato de raiz de *P. umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC foi escolhido para estes ensaios a partir dos resultados obtidos no estudo de permeação cutânea (item 4.2).

O tratamento tópico dos animais com veículo ou com gel contendo extrato de *P. umbellata* foi realizado duas horas antes da irradiação com UVB, conforme protocolo proposto por BISSET (1989). Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Nos ensaios de exposição aguda, os animais foram irradiados durante 30 minutos (2 MED) com uma dose de 201,6 mJ/cm². Os camundongos do grupo UVB foram sacrificados 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação e os dos grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*, 2, 12 e 48 horas

após a irradiação. Para avaliação do sistema antioxidante da pele foram utilizados os animais do grupo UVB sacrificados 2, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação, além dos grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*. Como cada tempo de sacrifício foi realizado em dias diferentes, utilizou-se um grupo controle (n=2) para cada dia de experimento. Com isso, o grupo referente aos animais não-irradiados apresenta um tamanho amostral maior (n=12) em relação aos demais grupos (n=4). Para avaliação das proteínas dos genes p53 e PCNA, observação de células de queimadura solar e da medida da espessura da epiderme viável foram utilizados os animais do grupo UVB sacrificados 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação, além dos grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*. Nestes ensaios foram utilizados 3 animais por grupo.

Três protocolos de exposição crônica foram realizados. No primeiro, os animais foram irradiados 4 vezes por semana durante 4 semanas com doses crescentes de UVB, totalizando uma dose de 8,60 KJ/m². Os animais foram sacrificados 7 dias após a última irradiação. No segundo, os animais foram irradiados 4 vezes por semana durante cinco semanas com doses crescentes de UVB, totalizando uma dose de 13,17 KJ/m². Neste protocolo, os animais foram sacrificados duas horas após a última irradiação. No terceiro protocolo, os animais foram irradiados 4 vezes por semana durante dezoito semanas com doses crescentes de UVB, totalizando uma dose de 55,51 KJ/m², sendo sacrificados duas horas após a última irradiação. Nestes ensaios, foram utilizados 6 animais por grupo.

3.4.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo

3.4.4.1 Preparação do homogenado de pele

Após sacrifício dos animais, a pele foi separada, lavada com tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0 e reduzida a pequenos fragmentos (0,75-1g) com auxílio de tesoura. O homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0 foi obtido em homogeneizador Ultra Turax seguido de

homogeneizador Potter-Elvehjem, e centrifugados a 13000g durante 10 minutos, em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf 5403. O sobrenadante foi empregado como amostra para determinação de ácido ascórbico e das enzimas do sistema antioxidante da pele. Para determinação do α -tocoferol foi utilizado o homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão fosfato de potássio, 1M pH7,0.

Cada sobrenadante foi dividido em duas alíquotas e analisadas, em duplicata, como amostras independentes.

3.4.4.2 Determinação da concentração dos antioxidantes não enzimáticos

3.4.4.2.1 Determinação da concentração de ácido ascórbico

Para determinação do ácido ascórbico foi empregada a metodologia proposta por ROSS (1994). O sistema cromatográfico foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Linear Instruments, modelo 525, com comprimento de onda 254nm e coluna Waters C18, 3,9x300mm, 10 μ m. Como fase móvel empregou-se solução de ácido metafosfórico 0,2% e fluxo 0,7mL/min. Ácido ascórbico (Sigma[®]) foi utilizado como padrão.

Antes da injeção no sistema cromatográfico, as amostras foram diluídas 1:2 (v/v) em ácido metafosfórico 10% em água, agitadas por 1 minuto e centrifugadas (4 minutos) para precipitação das proteínas. O sobrenadante foi novamente diluído 1:2 (v/v) em ácido metafosfórico 0,2% em água e filtrado em filtro de acetato de celulose 0,22 μ m.

3.4.4.2.2 Determinação da concentração de α -tocoferol

A metodologia utilizada para esta determinação foi adaptada do método proposto por BURTON e colaboradores (1985). O sistema cromatográfico foi composto de bomba Waters Model 510, injetor 7161 Rheodyne dotado de loop de 20 μ L, detector eletroquímico HP1049A, constituído de um eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido, operando em potencial de 0,600V, polaridade de oxidação e modo

amperométrico. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP 4600 Termoseparation Products. A fase móvel utilizada foi metanol:água (95:5, v/v), contendo 2mM KCl e 20mM LiClO₄, com fluxo 1,0 mL/min. A coluna cromatográfica utilizada foi a Supelcosil LC-8, 3µm, 75x4,6mm (ROPKE *et al.*, 2003b). Alfa-tocoferol (Sigma®) foi utilizado como padrão.

Adicionou-se 400 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% e 800 µL de metanol a 400 µL da amostra e agitou-se em vórtex durante 20s. Ao tubo foram então, adicionados 6 mL de hexano e a mistura foi agitada em vórtex durante 3 minutos. Após centrifugação (3 min, 1000xg), a fração hexânica foi retirada (3mL) e evaporada sob atmosfera de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 200 µL de etanol Licrosolv®, filtradas em filtro de acetato de celulose 0,22 µm e injetadas no sistema cromatográfico.

3.4.4.3 Determinação da atividade dos antioxidantes enzimáticos

3.4.4.3.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A metodologia empregada foi adaptada da técnica descrita por MC CORD & FRIDOVIC (1969). Esta técnica avalia a inibição da produção de ânion superóxido produzido pela reação da xantina oxidase em presença de xantina. A redução do citocromo c pelo ânion superóxido é medida pelo aumento de absorbância em 550 nm, a 25°C.

A concentração de xantina oxidase utilizada na reação é determinada num branco, sem SOD, de maneira que a absorbância a 550 nm varie entre 0,028 a 0,030/min.

O meio de reação continha citocromo c, 100 µM, xantina 500 µM, EDTA 1mM e KCN 200 µM em tampão fosfato de potássio 0.05M, pH 7,8 e a 1 mL de meio de reação adicionou-se 15 µL de amostra.

Os valores de atividade foram expressos em U/g de pele. Uma unidade (U) é definida como a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina a 25°C, em pH 7,8. Os resultados estão apresentados em porcentagem remanescente de atividade, após irradiação com UVB, considerando-se 100% o controle de cada experimento.

3.4.4.3.2 Determinação da atividade da glutathione peroxidase

O método baseia-se na medida da diminuição de absorvância relacionada à oxidação do NADPH, medida a 340 nm a 30°C (coeficiente de extinção molar $6,22 \text{ nM}^{-1}/\text{cm}$), durante a redução da glutathione oxidada, catalisada pela glutathione redutase (SIES *et al.*, 1979).

O meio de reação continha GSH 0,1 M, GR 0,1 U/mL, peróxido de t-butila, NADPH 20 mM, tampão fosfato K 0,1 M, pH 7,0 e EDTA 0,005 M pH 7,0.

Às cubetas contendo 1mL de meio de reação adicionou-se 10 μL de amostra, diluída 1:1 em tampão fosfato K 0,1 M, pH 7,0.

Os valores de atividade foram expressos em U/g de pele. Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 μmol de NADPH por minuto a 30°C em pH 7,0. Os resultados estão apresentados em porcentagem remanescente de atividade, após irradiação com UVB, considerando-se 100% o controle de cada experimento.

3.4.4.3.3 Determinação da atividade de glutathione redutase

A glutathione redutase catalisa a redução da glutathione oxidada, através da oxidação do NADPH, cujo decréscimo de absorvância a 340 nm, a 30°C (coeficiente de extinção molar $6,22\text{nM}^{-1}/\text{cm}$), é medido espectrofotometricamente (SIES *et al.*, 1979).

O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M EDTA 5mM pH 7,0, GSSG 0,1M, NADPH 20mM. À cubeta contendo 970 μL de meio, adicionou-se 50 μL de amostra (sobrenadante do homogenado).

Os valores de atividade foram expressos em U/g de pele. Uma unidade de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 μmol de NADPH por minuto a 30°C em pH 7,0. Os resultados estão apresentados em porcentagem remanescente de atividade, após irradiação com UVB, considerando-se 100% o controle de cada experimento.

3.4.4.3.4 Determinação da atividade de catalase

A catalase promove a oxidação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. A técnica foi adaptada de BEUTLER (1975) e quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo da absorbância a 230 nm (ϵ 0,0071 nM^{-1}/cm), a 30 °C.

O meio de reação continha Tris HCl 1 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0, peróxido de hidrogênio 10mM. Para leitura espectrofotométrica foram adicionados 15 μL de amostra, diluída 1:1 em tampão Tris HCl, a 985 μL de meio.

Os valores de atividade da catalase foram expressos em U/g de pele. Uma unidade (U) de catalase corresponde a atividade da enzima que hidrolisa 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 30 °C, em pH 8,0. Os resultados estão apresentados em porcentagem remanescente de atividade, após irradiação com UVB, considerando-se 100% o controle de cada experimento.

3.4.5 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável

3.4.5.1 Obtenção das amostras

Após o sacrifício dos animais, a pele dorsal foi retirada e um fragmento imediatamente fixado em formol 4% tamponado. Posteriormente, foram incluídos em parafina e submetidos a cortes de 5 μm de espessura em micrótomo rotatório.

3.4.5.2 Avaliação da presença de células de queimadura solar

Para este estudo os cortes de pele foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumento 200x) para a presença de células de queimadura solar. Tipicamente, as células de queimadura solar estão presentes na epiderme e exibem a característica morfológica de núcleo picnótico e citoplasma intensamente corado com eosina (LAETHEM *et al.*, 2005). O número de células de queimadura solar por 100 células por campo foi contado por dois investigadores independentes, sendo avaliados três campos por animal e três animais por grupo (OUHTIT *et al.*, 2000a).

3.4.5.3 Análise da espessura da epiderme viável

Para esta avaliação foram utilizados os mesmos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) do item 3.4.5.2. De cada lâmina foram selecionados três campos, dos quais a imagem foi capturada em um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital. Utilizou-se a espessura da epiderme viável (μm) como parâmetro de comparação entre os diferentes grupos de tratamento. A análise de imagem foi feita com o auxílio do programa Image Tool 3.00, com o qual foi possível fazer 30 medidas para cada campo, sendo três campos por corte e três animais por grupo.

3.4.5.4 Ensaio imunohistoquímico para a proteína PCNA

O ensaio foi realizado segundo OUHTIT e colaboradores (2000a) para proteína PCNA, com modificações.

Os fragmentos de pele foram fixados em formalina tamponada a 4% e posteriormente, incluídos em parafina em até 24 horas após a fixação para garantir a preservação dos antígenos. Foram, então, cortados ($5\mu\text{m}$) em micrótomo rotatório, sendo montados em lâminas silanizadas.

Após desparafinização e rehidratação, os cortes foram tratados com soluções para recuperação antigênica: solução de tampão citrato pH 6,0 (S1699, DAKO®) em banho aquecido com vapor de água e mantido a 97°C durante 30 minutos. As lâminas foram, então, resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos, ainda na solução de recuperação antigênica e

lavadas, posteriormente, com água destilada e tampão TBST (tampão salina Tris com Tween 20, S3306, DAKO®).

O anticorpo primário utilizado foi anti-PCNA rato monoclonal de camundongo clone PC10 (M0879, DAKO®) diluído 1:50 em solução de diluente de anticorpo, tampão Tris-HCl contendo carreador de proteína e azida sódica 0,015M (S0809, DAKO®). Este anticorpo marca a proteína PCNA presente no núcleo.

A reação imunohistoquímica foi realizada com o kit ARK (Animal Research Kit, K3954 – DAKO®). Este kit é utilizado para colorações imunohistoquímicas com anticorpos primários de camundongo em tecidos de qualquer espécie, incluindo camundongos. O sistema é formulado para minimizar a reatividade do anticorpo secundário anti-camundongo com as imunoglobulinas endógenas que podem estar presentes nos tecidos. A coloração é feita pelo complexo avidina-biotina.

A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harrys. As lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética (Entellan® – Merck®).

O número de células marcadas por 100 células por campo foi contado por dois investigadores independentes, sendo três campos por animal e três animais por grupo em microscópio óptico (aumento 1000x).

3.4.5.5 Ensaio imunohistoquímico para a proteína p53

O ensaio foi realizado segundo BERG e colaboradores (1996). A preparação dos cortes foi a mesma descrita no item 3.4.5.4.

Após desparafinização e rehidratação, os cortes foram tratados com soluções para recuperação antigênica: solução de tampão Tris EDTA pH9,0 (S3307, DAKO®), em banho aquecido com vapor de água e mantido a 97°C durante 30 minutos. As lâminas foram, então, resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos, ainda nesta solução e lavadas, posteriormente, com água destilada e tampão TBST (tampão salina Tris com Tween 20, S3306, DAKO®).

O anticorpo primário utilizado foi anti-p53 humano monoclonal de camundongo clone PAb240 (M3566, DAKO®) diluído 1:50 em solução de diluente de anticorpo, tampão Tris-HCl contendo carreador de proteína e azida

sódica 0,015M (S0809, DAKO®). Este anticorpo marca a proteína PCNA presente no núcleo.

A reação imunohistoquímica foi realizada com o kit LSAB+ (Labeled StreptAvidin Biotin, K0690 – DAKO®). Neste sistema, a coloração é feita pelo complexo avidina-biotina.

A contracoloração, a contagem do número de células marcadas e a captura das imagens foram realizadas de acordo com o que foi descrito no item anterior (item 3.4.5.4).

3.5 Análise estatística dos resultados

Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para Múltiplas Comparações, para a localização dos contrastes. A significância utilizada foi $P < 0,05$ para cada comparação.

4. Resultados

4.1 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* (SILVA *et al.*, 2005 – anexo 2)

A estabilidade do gel de extrato seco de *Pothomorphe umbellata* foi avaliada quanto à concentração de 4-NC presente nas formulações estudadas para cada condição de temperatura por 103 dias. A concentração final foi expressa em μg de 4-NC por g de gel. Os resultados obtidos, apresentados na **Figura 13**, mostram os valores das médias de três amostras para cada tempo e temperatura de armazenamento.

Figura 13: Concentração de 4-NC ($\mu\text{g/g gel}$) nas formulações com e sem BHT armazenadas a 5 e 25°C por 103 dias. Média de três amostras para tempo em cada temperatura, analisadas em duplicata. As barras de erros foram omitidas para melhorar a clareza na observação dos dados. Não houve diferença significativa entre os tempos para cada temperatura de armazenamento de cada formulação.

4.2 Estudo de permeação cutânea *in vitro* de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata*

Para análise dos dados foi empregado o método do *lag time*, que utiliza os pontos da porção linear dos perfis de permeação, ou seja, depois de atingido o equilíbrio (*steady-state*). A partir destes pontos é possível determinar o fluxo, utilizando-se a inclinação da reta da parte linear do perfil de permeação, sendo que o intercepto no eixo x desta mesma reta fornece o tempo de latência do processo de difusão (BARRY, 1983; SHAH, 1993). O tempo de comportamento não linear dos perfis de permeação mostrados nas Figuras 14 a 19 é o período de latência.

Figura 14: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 0,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 15: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,0% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 16: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 17: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 0,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 18: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,0% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 19: Perfil de permeação da formulação gel, contendo 1,5% (p/p) de carbômero 940 e extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% (p/p) de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Conhecendo-se a concentração de soluto no compartimento doador ($C=1000\mu\text{g}/\text{g}$ quando 0,1% (p/p) de 4-NC; $C=500\mu\text{g}/\text{g}$ quando 0,05% (p/p) de 4-nc), a espessura da membrana ($e=0,1\text{cm}$), o tempo de latência (T_{lag}) e o fluxo (J) pode-se determinar o coeficiente de difusão (D), a permeabilidade (P) e o coeficiente de partição (k) da molécula de 4-NC (BARRY, 1983; SHAH, 1993). Sendo assim:

- Fluxo (J) ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$) = inclinação da reta da porção linear do perfil de permeação

- Coeficiente de permeabilidade (P) (cm h^{-1}) = J/C
- Tempo de latência T_{lag} (h) = intercepto x do perfil de permeação linear
- Coeficiente de difusão (D) ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$) = $1/6 e^2 T_{lag}^{-1}$
- Coeficiente de partição (k) = ePD^{-1}

Os parâmetros de permeação descritos acima foram calculados para cada ensaio e os resultados mostrados nas **Tabelas 4 e 5** apresentam a média e o desvio-padrão de três ensaios.

Tabela 4: Parâmetros de difusão para os géis com diferentes concentrações de carbômero 940 contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,05% (p/p) de 4-nerolidilcatecol

% de carbômero 940 (p/p)	Fluxo (J) $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Permeabilidade (P) $10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$	Lag time (T_{lag}) H	Coeficiente de Difusão (D) $10^{-3} \text{ cm}^2 \text{h}^{-1}$	Coeficiente de Partição (K)
1,5	0,3171 $\pm$ 0,1362	0,1585 $\pm$ 0,0681	2,76 $\pm$ 1,09	0,69 $\pm$ 0,22	0,02 $\pm$ 0,01*
1,0	0,5533 $\pm$ 0,1139	0,2767 $\pm$ 0,0569	2,06 $\pm$ 0,20	0,82 $\pm$ 0,08	0,03 $\pm$ 0,01
0,5	0,5414 $\pm$ 0,0667	0,2707 $\pm$ 0,0334	3,22 $\pm$ 0,29	0,52 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,01

* $p < 0,05$ em comparação ao gel 0,5% (p/p) de carbômero 940

Tabela 5: Parâmetros de difusão para os géis com diferentes concentrações de carbômero 940 contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% de 4-nerolidilcatecol

% de carbômero 940 (p/p)	Fluxo (J) $\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Permeabilidade (P) $10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$	Lag time (T_{lag}) h	Coeficiente de Difusão (D) $10^{-3} \text{ cm}^2 \text{h}^{-1}$	Coeficiente de Partição (K)
1,5	0,4994 $\pm$ 0,1903*	0,4994 $\pm$ 0,1903*	2,31 $\pm$ 0,42	0,75 $\pm$ 0,15	0,06 $\pm$ 0,01**
1,0	0,4832 $\pm$ 0,0980*	0,4832 $\pm$ 0,0980*	1,95 $\pm$ 0,59	0,94 $\pm$ 0,29	0,05 $\pm$ 0,01**
0,5	0,8916 $\pm$ 0,0830	0,8916 $\pm$ 0,0830	2,62 $\pm$ 0,19	0,64 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,01

* $p < 0,05$ em comparação ao gel 0,5% (p/p) de carbômero 940

** $p < 0,001$ em comparação ao gel 0,5% (p/p) de carbômero 940

4.3 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo

4.3.1 Ensaios de exposição aguda à radiação UVB

Nestes ensaios os animais dos grupos UVB foram sacrificados 2, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. Os animais dos grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata* foram sacrificados 2, 12 e 48 horas após a irradiação. O grupo controle (não-irradiado) apresenta um tamanho amostral maior (n=12) em relação aos demais grupos (n=4), já que cada tempo de sacrifício foi realizado em dias diferentes e foi feito um grupo controle para cada dia de experimento.

As cinéticas dos antioxidantes não enzimáticos, ácido ascórbico e α -tocoferol, após irradiação com UVB estão apresentadas nas **Figuras 20 e 21**, respectivamente. Os resultados estão expressos em nmol/g de pele. As cinéticas de cada um dos antioxidantes enzimáticos, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione reductase, estão apresentados nas **Figuras 22 a 25**, respectivamente. Os valores de atividade estão expressos em U/g de pele. A análise estatística destas cinéticas foi realizada pela diferença entre os tempos de sacrifício dos animais após irradiação em relação ao grupo não-irradiado (controle).

Os resultados das determinações dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos dos grupos UVB, UVB+veículo, UVB+*P. umbellata* sacrificados 2, 12 e 48 horas após a irradiação estão expressos nas **Figuras 26 a 31**. A análise estatística destes resultados foi realizada pela diferença entre os grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata* em relação aos grupos não irradiados (controle), UVB e UVB+veículo.

Figura 20: Concentração de ácido ascórbico (nmol/g pele) após irradiação com UVB. Controle $795,17 \pm 99,82$; 2 horas $849,80 \pm 75,25$; 12 horas $717,49 \pm 119,41$; 24 horas $615,91 \pm 56,53$; 48 horas $579,49 \pm 91,36$; 72 horas $541,75 \pm 83,04$ e 96 horas $969,18 \pm 96,00$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle

Figura 21: Concentração de α -tocoferol (nmol/g pele) após irradiação com UVB. Controle $2,89 \pm 0,36$; 2h $2,43 \pm 0,69$; 12h $4,22 \pm 0,51$; 24h $4,67 \pm 0,63$; 48h $3,56 \pm 0,53$; 72h $2,91 \pm 0,45$; 96h $3,07 \pm 0,61$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

Figura 22: Atividade de glutatona peroxidase após irradiação com UVB. Atividade no grupo controle (U/g pele) $4,43 \pm 0,60$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos

Figura 23: Atividade de superóxido dismutase após irradiação com UVB. Atividade no grupo controle (U/g pele) $251,40 \pm 64,79$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

Figura 24: Atividade de catalase após irradiação com UVB. Atividade no grupo controle (U/gpele) $400,21 \pm 30,70$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos

Figura 25: Atividade de glutatona redutase após irradiação com UVB. Atividade no grupo controle (U/g pele) $1,35 \pm 0,13$ (média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

Figura 26: Concentração de ácido ascórbico (nmol/g pele) 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Concentração no grupo controle $795,17 \pm 99,82$. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos, ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo controle e ^b $p < 0,05$, ^{bb} $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo UVB

Figura 27: Concentração de α -tocoferol (nmol/g pele) 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Concentração no grupo controle ($\mu\text{g/g}$ pele) $2,89 \pm 0,36$. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo controle e ^b $p < 0,01$, ^{bb} $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo UVB

Figura 28: Porcentagens das atividades remanescentes de glutathione peroxidase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), ^b $p < 0,05$ e ^{bb} $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo irradiado

Figura 29: Porcentagens das atividades remanescentes de superóxido dismutase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), ^a $p < 0,05$ e ^{aa} $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, ^b $p < 0,05$ e ^{bb} $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo irradiado

Figura 30: Porcentagens das atividades remanescentes de catalase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), ^a $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, ^b $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo irradiado, ^{cc} $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo tratado com veículo

Figura 31: Porcentagens das atividades remanescentes de glutathione redutase 2, 12 e 48 horas após irradiação com UVB. Média de 12 animais no grupo controle e 4 nos demais grupos), ^a $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, ^b $p < 0,05$ e ^{bb} $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo irradiado

4.3.2 Ensaios de exposição crônica à radiação UVB

Três protocolos de exposição crônica a radiação ultravioleta foram realizados. No primeiro, os animais foram sacrificados após 7 dias da última irradiação e receberam uma dose total de 8,60 KJ/m² de radiação UVB. No segundo protocolo, os animais foram sacrificados 2 horas após a última irradiação e receberam uma dose total de UVB de 13,17 KJ/m². No terceiro, os animais receberam uma dose total de UVB de 55,51 KJ/m² e foram sacrificados 2 horas após a última irradiação. Os animais foram separados em 4 grupos: controle, UVB (sem tratamento, expostos à radiação UVB), UVB+veículo (expostos à radiação UVB e tratados com gel de carbômero) e UVB+*P. umbellata* (expostos à radiação UVB e tratados com extrato de *P. umbellata*). Foram utilizados 6 animais por grupo.

Os resultados estão apresentados nas **Figuras 32 a 37** e estão expressos em porcentagem remanescentes em relação ao grupo controle, considerando-se que os experimentos foram realizados em períodos diferentes e ocorreu uma variabilidade nos valores encontrados para cada antioxidante. A análise estatística destes resultados foi realizada pela diferença entre os grupos UVB+veículo e UVB+*P. umbellata* em relação ao grupo UVB de cada dose total de radiação UVB (8,60; 13,17 e 55,51 KJ/m²).

Figura 32: Porcentagens das concentrações remanescentes de ácido ascórbico após exposição crônica com doses de 8,60; 13,17 e 55,51 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (nmol/g pele) 8,60 KJ/m² 696,83±14,06; 13,17 KJ/m² 533,25±47,71 e 55,51 KJ/m² 189,11±25,13 (n=6); ^ap<0,01 e ^ap<0,001 em relação ao grupo controle, ^bp<0,01 e ^{bb}p<0,001 em relação ao respectivo grupo UVB, ^cp<0,05 e ^{cc}p<0,01 em relação ao respectivo grupo UVB+veículo

Figura 33: Porcentagens das concentrações remanescentes de α -tocoferol após exposição crônica com doses de 8,60; 13,17 e 55,51 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (nmol/g pele) 8,60 KJ/m² 1,05±0,15; 13,17 KJ/m² 2,00±0,33 e 55,51 KJ/m² 1,79±0,55 (n=6); ^ap<0,01 e ^ap<0,001 em relação ao grupo controle, ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 e ^{bbb}p<0,001 em relação ao respectivo grupo UVB, ^bp<0,05, ^{bb}p<0,01 em relação ao respectivo grupo UVB+veículo

Figura 34: Porcentagens das atividades remanescentes de glutathione peroxidase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (U/g pele) 8,60 KJ/m² $4,01 \pm 1,06$ e 13,17 KJ/m² $3,88 \pm 0,59$ (n=6). Não houve diferença significativa entre os grupos

Figura 35: Porcentagens das atividades remanescentes de superóxido dismutase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (U/g pele) 8,60 KJ/m² $405,67 \pm 33,49$ e 13,17 KJ/m² $530,87 \pm 110,88$ (n=6). Não houve diferença significativa entre os grupos

Figura 36: Porcentagens das atividades remanescentes de catalase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (U/g pele) 8,60 KJ/m² $325,09 \pm 57,51$ e 13,17 KJ/m² $327,36 \pm 92,57$ (n=6). Não houve diferença significativa entre os grupos

Figura 37: Porcentagens das atividades remanescentes de glutathione reductase após exposição crônica com doses de 8,60 e 13,17 KJ/m² de radiação UVB. Concentração nos grupos controle (U/g pele) 8,60 KJ/m² $1,08 \pm 0,12$ e 13,17 KJ/m² $1,40 \pm 0,17$ (n=6). Não houve diferença significativa entre os grupos

4.4. Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável

4.4.1 Avaliação dos efeitos da exposição aguda à radiação UVB

A exposição aguda à radiação UVB induziu o aparecimento de células de queimadura solar após 4 horas com um aumento de número até 48 horas. O pico de aparecimento de células de queimadura solar ocorreu após 12 horas da irradiação (**Figura 38**). A **Figura 39** mostra um corte de pele corado com HE e as setas indicam as células de queimadura solar.

Figura 38. Porcentagens de células de queimadura solar após exposição à radiação UVB. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p< 0,001 em relação ao grupo controle

Figura 39: Indução de células de queimadura solar em pele de camundongo sem pêlo 12 horas após a irradiação ultravioleta. As setas indicam as células de queimadura solar (Aumento 400x)

A análise morfométrica dos cortes histológicos da pele de camundongos expostos à radiação UVB mostrou um aumento significativo da espessura da epiderme viável a partir de 24 horas após irradiação ($p < 0,001$) (**Figura 40**). A **Figura 47** mostra fotomicrografias das peles dos animais expostos à radiação UVB.

Figura 40: Espessura da epiderme viável (μm) após exposição à radiação UVB. Média de 3 campos por animal ($n=3$) por grupo, * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle

A exposição à radiação UVB (201,6 mJ/cm²) resultou em decréscimo das células marcadas para a proteína PCNA até 8 horas após irradiação e posterior aumento significativo destas células a partir de 12 horas (**Figura 41**). Nos cortes de pele dos animais controle (não-irradiados) a marcação para proteína PCNA foi vista somente na camada basal da epiderme e nos grupos irradiados (tratados ou não) a marcação pode ser verificada também nas camadas suprabasais. As fotomicrografias mostradas na **Figura 48** mostram as células marcadas para a proteína PCNA.

Figura 41: Porcentagens de células marcadas para proteína PCNA após exposição à radiação UVB. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, * p<0,05 e **p< 0,001 em relação ao grupo controle

Neste estudo, o tempo de indução máxima de células marcadas para a proteína p53 ocorreu entre 8 e 12 horas após irradiação com UVB (**Figura 42**). As células marcadas para a proteína p53 estão mostradas nas fotomicrografias na **Figura 49**.

Figura 42: Porcentagens de células marcadas para proteína p53 após exposição à radiação UVB. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p<0,001 em relação ao grupo controle

A aplicação tópica prévia à irradiação de gel de *P. umbellata* foi capaz de reduzir o aparecimento das células de queimadura solar após 12 horas da exposição à radiação UVB, sendo a diferença deste resultado em relação ao grupo irradiado (UVB) significativa (p<0,001) (**Figura 43**). Não foram observadas células de queimadura solar nos animais sacrificados nos tempos de 2 e 48 horas após a irradiação.

Figura 43: Porcentagem de células de queimadura de solar após 12 horas da irradiação nos grupos UVB, UVB + veículo e UVB + *P. umbellata*. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p<0,001 em relação ao grupo UVB, ^ap<0,001 em relação ao grupo UVB+veículo

O aumento da espessura da epiderme viável foi reduzido com a aplicação tópica prévia à irradiação de veículo e gel de *P. umbellata*, sendo a

diferença do grupo tratado com gel de *P.umbellata* em relação ao grupo irradiado (UVB), significativa ($p<0,001$) (**Figura 44**).

Figura 44: Espessura da epiderme viável (μm) após 2, 12 e 48 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, * $p<0,001$ em relação ao grupo UVB

O tratamento com gel de *P. umbellata* antes da irradiação resultou em aumento significativo de marcação da proteína PCNA nos tempos 12 e 24 horas após a irradiação em relação ao grupo irradiado (UVB). Após 48 horas, tanto o grupo tratado com gel base quanto o grupo tratado com gel de *P. umbellata* demonstraram uma diminuição significativa de marcação em relação ao grupo irradiado (UVB) (**Figura 45**).

Figura 45: Porcentagem de células marcadas para proteína PCNA após 2, 12, 24 e 48 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p<0,05 e **p<0,001 em relação ao grupo UVB, ^ap<0,05 e ^{aa}p<0,001 em relação ao grupo UVB+veículo

Os grupos tratados com veículo e com gel de *P. umbellata* mostraram após 12 horas da irradiação uma diminuição na indução de células marcadas para proteína p53 em relação ao grupo irradiado (UVB), sendo no grupo tratado com gel de *P. umbellata* esta diminuição mais expressiva. Após 24 horas, o grupo tratado com gel base mostrou uma diminuição significativa da marcação em relação ao grupo irradiado. O grupo tratado com gel de *P. umbellata* resultou em um aumento significativo em relação ao grupo irradiado após 24 e 48 horas da irradiação (**Figura 46**).

Figura 46: Porcentagem de células marcadas para proteína p53 após 2, 12, 24 e 48 horas da irradiação nos grupos controle, UVB, UVB+veículo e UVB+*P. umbellata*. Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p<0,001 em relação ao grupo UVB, ^ap<0,001 em relação ao grupo UVB+veículo

Figura 47: Fotomicrografias - Aspecto microscópico de pele de camundongos sem pêlo dos grupos controle (A), UVB e sacrificados após 2h (B), 4h (C), 8h (D), 12h (E), 24h (F), 48 (G), 72h (H), 96h (I), UVB+veículo sacrificados após 2h (J), 12h (L) e 48h (M), UVB+*P. umbellata* sacrificados após 2h (N), 12h (O) e 48h (P). Coloração HE, aumento 200X.

Figura 48: Fotomicrografias - Reação imunohistoquímica para a proteína PCNA. Controle negativo da reação (A), Grupos: controle (B), UVB sacrificados após 4h (C), 12h (D), 24h (E), 48h (F), 72 (G), 96h (H), UVB+veículo sacrificados após 12h (I) e 48h (J), UVB+*P. umbellata* sacrificados após 12h (L) e 48h (M). Aumento 200X.

Figura 49: Fotomicrografias - Reação imunohistoquímica para a proteína p53. Controle negativo da reação (A), Grupos: controle (B), UVB sacrificados após 2h (C), 12h (D), 24h (E), 48h (F), 72 (G), 96h (H), UVB+veículo sacrificados após 2h (I) e 12h (J), UVB+*P. umbellata* sacrificados após 2h (L) e 12h (M). Aumento 200X.

4.4.2 Avaliação dos efeitos da exposição crônica à radiação UVB

Três protocolos de exposição crônica à radiação ultravioleta foram realizados. Como no primeiro, os animais foram sacrificados após 7 dias da última irradiação, não foi possível verificar nenhum dos efeitos previstos nestes estudos, aparecimento de células de queimadura solar, alteração de espessura da epiderme, indução/redução de células marcadas para proteínas PCNA e p53 (dados não apresentados). No segundo protocolo, os animais foram sacrificados 2 horas após a última irradiação e receberam uma dose total de UVB de 13,17 KJ/m². No terceiro, os animais receberam uma dose total de UVB de 55,51 KJ/m² e foram sacrificados 2 horas após a última irradiação. Os animais foram separados em 4 grupos: controle, UVB (sem tratamento, expostos à radiação UVB), UVB+veículo (expostos à radiação UVB e tratados com gel de carbômero) e UVB+*P. umbellata* (expostos à radiação UVB e tratados com extrato de *P. umbellata*). Foram utilizados 3 animais por grupo.

Nos estudos crônicos, não foi possível verificar o aparecimento de células de queimadura solar.

Os resultados da análise da espessura da epiderme viável da pele (**Figura 50**) demonstraram que após exposição com dose de 13,17 KJ/m² houve aumento da espessura da epiderme viável nos grupos irradiado, irradiados e tratados com gel base e irradiados e tratados com gel de *P. umbellata* em relação ao grupo controle não-irradiado. No entanto, não houve diferença entre os grupos irradiados. Utilizando-se dose de 55,51 KJ/m², foi possível verificar aumento ($p<0,05$) da espessura da epiderme viável do grupo tratado com gel base e diminuição ($p<0,001$) no grupo tratado com gel de *P. umbellata* em relação ao grupo irradiado (UVB). A **Figura 51** mostra fotomicrografias das peles dos animais expostos cronicamente à radiação UVB.

Figura 50: Altura da epiderme viável nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+*P. umbellata* após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m², Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo, *p<0,05 e **p<0,001 em relação ao grupo UVB, ^{aa}p<0,001 em relação ao grupo UVB+veículo

Figura 51: Fotomicrografias - Aspecto microscópico de pele de camundongos sem pêlo após exposição crônica à radiação UVB. Dose 13,17 KJ/m² Controle (A), UVB (B), UVB+veículo (C) e UVB+ *P. umbellata* (D), Dose 55,51 KJ/m² Controle (E), UVB (F), UVB+veículo (G) e UVB+ *P. umbellata* (H) Coloração HE, aumento 200X.

O ensaio imunohistoquímico para proteína PCNA com dose de radiação UVB de 13,17 KJ/m² demonstrou diminuição do número de células marcadas nos grupos irradiados e tratados com veículo ($p<0,05$) e gel de *P. umbellata* ($p<0,01$) em relação ao grupo irradiado (UVB). Nos experimentos com dose de radiação de 55,51 KJ/m² houve aumento nas células marcadas no grupo irradiado e tratado com veículo ($p<0,01$) em relação ao grupo irradiado (**Figura 52**).

Figura 52: Porcentagem de células marcadas para a proteína PCNA nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+*P. umbellata* após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m². Média de 3 campos por animal (n=3) por grupo. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao respectivo grupo UVB

No experimento com dose de radiação de UVB de 13,17 KJ/m², os resultados mostram que o número de células marcadas para proteína p53 nos grupos irradiados é maior do que no grupo controle. No grupo irradiado e tratado com gel de *P. umbellata* este aumento é significativamente maior ($p<0,05$) que no grupo irradiado. Utilizando-se dose de radiação de 55,51 KJ/m² houve aumento nas células marcadas no grupo irradiado e tratado com gel de *P. umbellata* ($p<0,001$) em relação ao grupo irradiado (**Figura 53**).

Figura 53: Porcentagem de células marcadas para a proteína p53 nos grupos controle, UVB, UVB+veículo, UVB+*P. umbellata* após exposição crônica à radiação UVB com doses de 13,17 e 55,51 KJ/m², média de 3 campos por animal (n=3) por grupo. *p<0,05 e **p<0,001 em relação ao respectivo grupo UVB, ^ap<0,05 em relação ao respectivo grupo UVB+veículo

5. Discussão

5.1 Estudo de estabilidade química de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* (SILVA, *et al.*, 2005 – anexo 2)

Carbômeros são derivados carboxílicos de natureza aniônica e um grande número de grupos ácidos, tendendo a interagir com substâncias catiônicas e outros polímeros hidrofílicos que contêm grupos álcoois (BLANCO-FUENTE *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* com carbômeros 934 e 940 demonstraram interação destes com alguns fármacos como lidocaína e hidrocloreto de mebeverina, sendo esta interação dependente de pH, concentração de eletrólitos, concentração da substância e do polímero (AL-GOHARY & FODA, 1993; GLAVAS-DODOV *et al.*, 2002; JIMENEZ-KAIRUZ *et al.*, 2002). BLANCO-FUENTE e colaboradores (2002) demonstraram que a inclusão de beta-ciclodextrina em uma formulação gel de hidrocloreto de propanolol reduz as interações fármaco/polímero, melhorando a liberação do princípio ativo do gel.

A recuperação do 4-NC obtida, utilizando-se água para quebrar a estrutura do gel de carbômero 940, foi de 60%. Com o objetivo de melhorar a recuperação, foram avaliadas outras soluções com diferentes pHs e diferentes molaridades, já que estes fatores poderiam influenciar no rompimento da estrutura do gel. Além disso, utilizaram-se diferentes volumes de hexano para garantir que a fase extratora não estivesse saturada. Nenhuma das condições avaliadas aumentou a porcentagem de recuperação do composto isolado, o que poderia ser um indicativo da presença de alguma interação do carbômero 940 com o 4-NC, sendo independente de pH e da concentração de eletrólitos.

As amostras, tanto da formulação sem BHT (F1) quanto da formulação com BHT (F2), armazenadas em estufa (45°C) permaneceram estáveis por até 7 dias (dados não apresentados). Após este período houve degradação da estrutura do gel, demonstrando que a formulação não é estável nesta temperatura.

Todas as formulações armazenadas em geladeira (4°C) e à temperatura ambiente (25°C) apresentaram-se estáveis ao longo do período do estudo (103 dias), tanto na concentração de 4-NC como na aparência do gel. Entre os dias

0 e 1 de análise houve uma diminuição de, aproximadamente, 20% da concentração inicial de 4-NC e após este período a concentração manteve-se estável pelo período restante. Isto poderia ser explicado pela possível interação do carbômero com o extrato de *Pothomorphe umbellata*. A adição de 0,05% (v/v) de BHT não influenciou a estabilidade do 4-NC nas formulações. A diferença entre as concentrações de 4-NC ao longo do tempo foi considerada não significativa na análise estatística dos resultados.

5.2 Estudo de permeação cutânea *in vitro* de formulações em gel contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata*

A liberação de uma substância de uma preparação farmacêutica tópica pode ser influenciada pela natureza do veículo utilizado. A formulação correta de uma preparação de uso tópico pode garantir que o fármaco exerça sua atividade máxima na pele (IDSON, 1980).

O primeiro requisito para um tratamento tópico eficaz é que o fármaco incorporado em um veículo alcance a superfície cutânea em concentração adequada, para iniciar o processo de difusão através da membrana. A afinidade relativa do fármaco pela pele e pelo veículo no qual se encontra é representada pelo coeficiente de partição K (IDSON, 1983). No ensaio realizado com a formulação contendo 0,05% de 4-NC, foi possível observar diferença estatística no coeficiente de partição K, apenas para a concentração mais alta de carbômero 940 (1,5%) (**Tabela 4**). Neste ensaio foi possível observar uma diferença significativa entre os valores de K, principalmente, entre as formulações contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC (**Tabela 5**). Um valor alto de K indica uma baixa afinidade do veículo pelo fármaco. Valores baixos de K indicam um alto grau de interação mútua, refletindo a tendência do fármaco de permanecer no veículo. Segundo este raciocínio, a liberação do fármaco será favorecida pela escolha de veículos que possuam baixa afinidade por este fármaco (IDSON, 1983). No caso deste ensaio, o gel contendo 0,5% (p/p) de carbômero 940 com extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC apresentou o mais alto valor de coeficiente de partição K. Este resultado pode ser consequência da interação entre o carbômero e o extrato de *Pothomorphe umbellata*, influenciando a partição e a permeabilidade. Estudos *in vitro* com

carbômeros 934 e 940 demonstraram interação destes com alguns fármacos, como lidocaína e hidrocloreto de mebeverina, sendo esta interação dependente de pH, concentração de eletrólitos, concentração da substância e do polímero (AL-GOHARY & FODA, 1993; GLAVAS-DODOV *et al.*, 2002; JIMENEZ-KAIRUZ *et al.*, 2002).

Observou-se também uma diferença significativa nos valores de permeabilidade das formulações contendo 0,5% de carbômero em relação às demais formulações (1,0% e 1,5% de carbômero 940) contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC. O coeficiente de permeabilidade (P) é uma função do fluxo e da concentração do fármaco no compartimento doador da célula de difusão. Como nestas formulações a concentração no recipiente doador é a mesma para todas as formulações, a diferença de permeabilidade observada no ensaio é uma consequência do fluxo. O fluxo (J) é proporcional a um gradiente de atividade termodinâmica, e não tanto à concentração do fármaco. Esta atividade termodinâmica varia de acordo com o veículo da formulação utilizada (MARTIN & BUSTAMANTE, 1993).

O coeficiente de difusão (D) reflete a facilidade com a qual as moléculas se movem através da membrana (IDSON, 1983, SHAH & MAIBACH, 1993). A difusibilidade é uma função da estrutura molecular do fármaco, que é constante ao longo deste experimento. O coeficiente de difusão também é uma função do material que constitui a membrana (SHAH *et al.*, 1994). Neste ensaio a membrana (pele de camundongo sem pêlo) não parece ter sido afetada pelo veículo. Por esta razão, não foi possível observar diferenças significativas entre os valores de coeficiente de difusão obtidos para as diferentes formulações.

Os resultados obtidos nestes estudo mostram, portanto, que os géis com 0,5% de carbômero 940 possuem maiores valores de K (coeficiente de partição), indicando uma baixa afinidade do veículo pelo fármaco, uma vez que K representa a afinidade relativa do fármaco pela pele e pelo veículo no qual se encontra. Além disso, o aumento no valor de K parece ser proporcional à diminuição da concentração de carbômero 940, nos dois diferentes grupos (géis com 0,05% 4-NC e com 0,1% de 4-NC) o que poderia indicar uma possível interação entre o carbômero e o extrato de *P.umbellata*.

5.3 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* no sistema antioxidante da pele de camundongos sem pêlo

Existem pelo menos três maneiras pelas quais a concentração de antioxidantes pode ser afetada pela radiação ultravioleta: (I) absorção direta de luz, (II) reação com espécies reativas de oxigênio geradas pelas reações de fotossensibilização e (III) mecanismo de recuperação, no qual um antioxidante é poupado à custa de outro (LOPEZ-TORRES *et. al.*, 1998).

Em um estudo com exposição aguda a radiação UVB, ROPKE e colaboradores (2003a) demonstraram uma redução de, aproximadamente, 16% na concentração de α -tocoferol 2 horas após a radiação ultravioleta. Neste estudo foi demonstrado um acréscimo significativo na concentração de α -tocoferol 12 e 24 horas após radiação UVB (**Figura 21**). Isto pode ter ocorrido porque, apesar do α -tocoferol endógeno sofrer reação de fotossensibilização, com formação do radical α -tocoferila e outros produtos, estes radicais teriam acesso a antioxidantes capazes de levar a uma regeneração do α -tocoferol. Os antioxidantes capazes de regenerar o α -tocoferol são o ácido ascórbico, ubiquinóis e tióis, e estes por sua vez, podem ser regenerados pelo ácido α -lipóico (PACKER *et al.*, 1997). É possível notar um decréscimo na concentração de ácido ascórbico após 24 horas até 72 horas após a irradiação (**Figura 20**) o que poderia justificar a regeneração de α -tocoferol. SHINDO e colaboradores (1994) demonstraram um decréscimo na concentração de ácido ascórbico após exposição a doses baixas de UV (até 5 J/cm²), sendo que a concentração de α -tocoferol não foi alterada.

O tratamento tópico prévio com gel contendo extrato padronizado de raiz de *P. umbellata* foi capaz de prevenir a depleção de ácido ascórbico após 48 horas da exposição aguda à radiação UVB, mantendo a concentração deste antioxidante nas mesmas concentrações encontradas para os animais do grupo não irradiado (**Figura 26**). Do mesmo modo, não houve variação das concentrações de α -tocoferol após 12 e 48 horas da irradiação (**Figura 27**). Os resultados encontrados para a aplicação do extrato de *P. umbellata* foram os mesmos encontrados para o grupo tratado somente com veículo, sugerindo

que esta proteção poderia ser decorrente da formação de filme causado pelo carbômero e não efeito do extrato.

No estudo de exposição crônica à radiação UVB, observou-se aumento na concentração de ácido ascórbico quando se utilizou dose de 8,60 KJ/m² tanto nos grupos irradiados quanto nos grupos tratados com gel base ou gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* quando comparados ao grupo não irradiado (**Figura 32**). Neste protocolo, os animais foram sacrificados 7 dias após a última irradiação. Isto poderia ser explicado pela adaptação do sistema antioxidante frente à exposição à radiação UVB. Além disso, houve aumento na concentração de α -tocoferol nos animais tratados com gel base ou gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* quando comparados aos grupos não irradiado ou irradiado. Neste caso, as concentrações de α -tocoferol encontradas para o grupo tratado com *P. umbellata* são significativamente maiores do que àquelas encontradas para o grupo tratado somente com veículo (**Figura 33**), o que poderia sugerir a redução do 4-NC em lugar do α -tocoferol. Quando se utilizou dose de 13,17 KJ/m² e os animais foram sacrificados 2 horas após a última irradiação, apenas o grupo tratado com gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* mostrou tanto aumento de ácido ascórbico como de α -tocoferol, quando comparados aos grupos não irradiado, irradiado ou irradiado e tratados somente com veículo (**Figuras 32 e 33**). Utilizando-se tempo total de exposição e dose maior de UVB (55,51 KJ/m²) foi possível observar um aumento significativo na concentração de ácido ascórbico nos animais tratados com gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* em relação aos grupos irradiado e irradiado e tratados somente com veículo (**Figuras 32**). Foi demonstrado também que a radiação UVB reduziu as concentrações de α -tocoferol nos animais irradiados e não tratados e que o tratamento com extrato de *P. umbellata* foi capaz de manter a concentração de α -tocoferol semelhante à concentração encontrada para o grupo não irradiado. Estes resultados demonstram que o tratamento com gel de extrato de raiz de *P. umbellata* é capaz de modular o sistema antioxidante na pele de camundongos sem pêlo, proporcionando maior proteção frente à exposição à radiação UVB.

Em um estudo avaliando o efeito da exposição aguda à radiação ultravioleta (UVB, 0,09 J/cm²) sobre o sistema antioxidante enzimático da pele

PENCE & NAYLOR (1990) observaram uma redução significativa de atividade das enzimas SOD e CAT, nos animais sacrificados 12 horas após a irradiação. Já a atividade da GPx não apresentou diferença significativa entre camundongos irradiados e não irradiados com UVB. AGARWAL e colaboradores (1993) também observaram redução da atividade da catalase após 12 horas de radiação utilizando a mesma dose de UVB.

O decréscimo significativo de atividade da enzima catalase observado por outros autores (SHINDO *et al.*, 1993; LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998; FUCHS *et al.*, 1989) após exposição aguda à radiação UV é consequência do uso de lâmpadas que emitem radiação visível. SHINDO e colaboradores (1993) e LOPEZ-TORRES e colaboradores (1998) utilizaram um simulador solar, enquanto FUCHS e colaboradores (1989) utilizaram lâmpadas que emitem radiação UV/visível. O decréscimo da atividade desta enzima pode ser explicado pela degradação causada pela radiação visível; a catalase foi caracterizada como sensível à radiação visível em hepatócitos de ratos (CHENG & PACKER, 1979). O mecanismo de degradação da enzima provavelmente está relacionado à decomposição dependente de oxigênio de um dos quatro anéis de porfirina pela radiação visível (ARONOFF, 1965).

Em um estudo de dose-resposta realizado por SHINDO e colaboradores (1994) não foi observada alteração significativa na atividade das enzimas glutathione redutase e glutathione peroxidase para doses baixas de radiação, como as empregadas neste estudo ($0,20 \text{ J/cm}^2$). No estudo realizado por SHINDO e colaboradores (1994), os animais foram sacrificados 5 minutos após a irradiação.

VAYALIL e colaboradores (2003) observaram que as atividades da GPx, CAT e GSH foram reduzidas 31%, 54% e 27%, respectivamente, em relação ao grupo controle após 24 horas de exposição única ($0,18 \text{ J/cm}^2$) ou múltipla (10 dias consecutivos, $0,18 \text{ J/cm}^2/\text{dia}$) à radiação UVB. O tratamento tópico com creme contendo epigallocatequina-3-galato ou polifenóis do chá verde purificados (86% de epicatequina) resultou na proteção contra depleção destas enzimas frente à exposição à radiação UVB.

Neste estudo foi demonstrado que a exposição à radiação UVB não alterou a atividade de glutathione peroxidase (**Figura 22**). O tratamento com veículo ou gel de extrato de raiz de *P. umbellata* reduziu os níveis de glutathione

peroxidase após 2 horas da irradiação quanto comparado com os valores encontrados para o grupo UVB, no entanto, quando comparados com o grupo não irradiado, esta diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 28**). A exposição aguda à radiação UVB aumenta a atividade da superóxido dismutase após 48 horas da irradiação mantendo este aumento até 96 horas (**Figura 23**). Os valores de atividade da superóxido dismutase mostraram-se significativamente diferentes para os grupos tratados com veículo ou com gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* quando comparados aos grupos irradiados após 2, 12 e 48 horas. No entanto, quando comparados ao grupo não irradiado, estes valores não mostraram diferença significativa exceto para os grupos tratados somente com gel ou com gel contendo extrato de raiz de *P. umbellata* após 2 horas da irradiação (**Figura 29**). Não foi observada alteração na atividade de catalase frente à exposição à radiação UVB (**Figura 24**). Nos animais tratados com veículo e com gel de extrato de raiz de *P. umbellata* houve um aumento significativo após 12 horas da irradiação quando comparados com o grupo irradiado. No entanto, quando comparados com o grupo não irradiado, o aumento foi significativo apenas para o grupo tratado com gel de extrato de raiz de *P. umbellata* (**Figura 30**). Após 2, 24 e 48 horas da irradiação houve aumento na atividade da glutathione redutase (**Figura 25**). O tratamento com gel base ou com gel de extrato de raiz de *P. umbellata* foi capaz de manter a concentração desta enzima em concentrações semelhantes aos do grupo não irradiado (**Figura 31**).

A aplicação tópica de gel base e de gel de extrato de raiz de *P. umbellata* foi capaz de proteger o sistema antioxidante enzimático das alterações induzidas pela exposição aguda à radiação UVB, possivelmente pela formação de filme causado pelo carbômero. No entanto, houve aumento significativo na atividade de catalase com o tratamento com gel de extrato de raiz de *P. umbellata*. Assim, é possível sugerir uma proteção do sistema antioxidante enzimático da pele com aplicação de gel de extrato de raiz de *P. umbellata*.

Nos ensaios de exposição crônica à radiação UVB não foi possível observar nenhuma alteração no sistema enzimático da pele em nenhum dos grupos de animais (**Figuras 34 a 37**). Isto poderia indicar uma possível adaptação deste sistema frente à radiação UVB.

Existem algumas evidências que indicam que os polifenóis do chá verde protegem contra o dano oxidativo causado pela radiação UV na pele. Um dos mecanismos propostos é pelo seqüestro das EROs pelas moléculas dos polifenóis (revisado por YUSUF *et al.*, 2007). Foi demonstrado que pequenas concentrações destes polifenóis reduzem o dano às bases e a quebra de fita do DNA causadas pelo radical hidroxil por um mecanismo de transferência de elétron das catequinas para o radical (ANDERSON *et al.*, 2001). É possível sugerir que o mecanismo de proteção induzido pelo extrato de *P. umbellata* seja semelhante ao demonstrado para os polifenóis do chá verde, devido à presença de hidroxilas adjacentes no anel benzênico presentes tanto nos polifenóis quanto no 4-NC. Estas hidroxilas contribuem para aumentar a atividade antioxidante do 4-NC, tanto por aumentar a estabilidade do radical formado, como pela propriedade deste tipo de estrutura em quelar metais de transição (LARSON, 1997). DESMARCHERLIER e colaboradores (1997) demonstraram que a adição de 4-NC isolado ou do extrato de *P. umbellata* em meio de reação contendo sais de Fe^{2+} e DNA diminuiu a produção de malonildialdeído e compostos relacionados, indicando a redução do dano oxidativo causado pelo Fe^{2+} às moléculas de ribose. Além disso, foi demonstrado que a atividade do extrato de *P. umbellata* foi superior àquela encontrada para o 4-NC isolado, sugerindo que outros compostos presentes no extrato também podem auxiliar neste mecanismo.

5.4 Avaliação dos efeitos das exposições aguda e crônica à radiação ultravioleta B e da aplicação tópica de extrato de *Pothomorphe umbellata* nas proteínas p53, PCNA, no aparecimento das células de queimadura solar e na medida da espessura da epiderme viável

A exposição aguda à radiação UV causa inúmeras alterações celulares na pele, que incluem dano ao DNA, parada do ciclo celular, células de queimadura solar, apoptose e aumento na espessura da epiderme viável (OUHTIT *et al.*, 2000). Neste estudo, investigou-se a cinética de indução de alguns destes eventos e as vias ou moléculas que regulam estes eventos.

As células de queimadura solar (CQS) exibem característica morfológica de células apoptóticas, núcleo picnótico e citoplasma condensado (**Figura 39**). Estas características são causadas por uma família de caspases que quebram

o substrato celular, assegurando a rápida desorganização da célula. A principal função das CQS é reduzir o risco de uma transformação maligna, já que a falha na indução de apoptose após dano severo ao DNA pode levar ao câncer de pele não melanoma (LAETHEM *et al.*, 2005). Neste estudo, os resultados demonstram que a exposição da pele de camundongos sem pêlo a uma dose única de radiação UVB (2,02 KJ/m²) resultou na formação de células de queimadura solar (células apoptóticas) após 4 horas da irradiação, com pico em 12 horas (**Figura 38**). Estes resultados são similares aos encontrados por LU e colaboradores (1999) e por OUHTIT e colaboradores (2000) que utilizaram doses de UVB de 1,8 KJ/m² e 2,5 KJ/m², respectivamente. Este resultado sugere que o dano ao DNA induzido pela radiação UVB foi excessivo e não foi reparado de forma efetiva, levando a ativação de via de morte por apoptose, que elimina as células com danos severos.

Os resultados deste estudo mostram que acúmulo de p53 em resposta à irradiação ocorreu após 4 horas da irradiação, com pico máximo entre 8 e 12 horas (**Figura 42**). Estes resultados são similares aos encontrados em outros estudos de cinética de aparecimento de células marcadas para p53 com doses de radiação variando entre 0,6 e 2,5 KJ/m² (LU *et al.*, 1999, OUHTIT *et al.*, 2000a, BERTON *et al.*, 2001). A cinética de indução de células de queimadura solar (apoptóticas) acompanhou a cinética de indução da proteína do gene p53. Muitos estudos demonstraram que o gene p53 está envolvido na apoptose induzida pela radiação UV (ZIEGLER *et al.*, 1994; BRASH, *et al.*, 1996; OUHTIT *et al.*, 2000a, LAETHEM *et al.*, 2005). A perda do gene ou o seu funcionamento inadequado aumenta a possibilidade de desenvolvimento de neoplasias (REBEL *et al.*, 2001; MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

Células diferenciadas da pele são constantemente repostas por células da camada basal em proliferação. O antígeno nuclear de proliferação celular, PCNA, tem papel importante na replicação e reparo do DNA e serve como biomarcador de proliferação celular (KELMAN, 1997; OUHTIT *et al.*, 2000a).

Neste estudo, o número de células marcadas para proteína PCNA reduziu após 8 horas da irradiação quando comparado com o controle. Este resultado é semelhante ao encontrado por MOORE e colaboradores (2004) e indica a capacidade da radiação UVB, no início da exposição, de impor efeitos sistêmicos deletérios à imunidade e aos mecanismos de reparo da célula. Após

12 horas da irradiação, observou-se um aumento progressivo no número de células marcadas para proteína PCNA (**Figura 41**) e estas estavam presentes tanto nas camadas basais como nas suprabasais da pele (**Figura 48**). Estes resultados são similares aos encontrados em outros estudos de cinética de aparecimento de células marcadas para PCNA com doses de radiação variando entre 0,6 e 2,5 KJ/m² (LU *et al.*, 1999, OUHTIT *et al.*, 2000, BERTON *et al.*, 2001, MOORE *et al.*, 2004). Os resultados descritos neste estudo corroboram os resultados encontrados na análise do aumento da espessura da epiderme viável, que ocorreu após 24 horas da irradiação (**Figura 40 e Figura 47**). Estes resultados sugerem que a radiação UV, além de induzir vias de reparo do dano ao DNA, também ativa a via de proliferação celular para repor as células que sofreram apoptose (OUHTIT *et al.*, 2000).

A transformação de células normais em células em estado maligno é determinado por fatores que influenciam alterações de eventos genéticos e epigenéticos. Agentes mutagênicos causam inicialmente alterações oncogênicas, incluindo aquelas em genes supressores de tumor que levam a iniciação do tumor (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002). A prevenção do dano fotoquímico têm sido considerada uma abordagem importante na redução da ocorrência de câncer de pele. Recentemente, o emprego de antioxidantes de origem natural têm recebido atenção considerável como agentes de fotoquimioprevenção. Muitos destes agentes têm sido estudados para aplicação tópica, como a epigallocatequina, o resveratrol e a silibina, presentes no chá verde, na uva e no cardo-santo, respectivamente (AFAQ *et al.*, 2005)

Utilizando uma dose de 1,8 KJ/m², AFAQ e colaboradores (2003) mostraram que a aplicação tópica de resveratrol reduziu o edema cutâneo em 55% quando comparado com o grupo irradiado, 24 horas após irradiação com UVB.

Em um estudo de exposição aguda à radiação UVB, YASUOKA e colaboradores (2005) demonstraram que o tratamento tópico prévio de camundongos sem pêlo com derivado hidrossolúvel de γ -tocoferol foi capaz de reduzir o número de células de queimadura solar e a espessura da epiderme viável quando comparado com os resultados encontrados para o grupo irradiado, 24 horas após irradiação (dose UVB = 5 KJ/m²).

GONZÁLEZ e colaboradores (2003) mostraram que o tratamento oral com os carotenóides luteína e zeaxantina de camundongos sem pêlo irradiados com diferentes doses de UVB (0,4, 0,8 e 1,2 KJ/m²) foi capaz de reduzir o edema de pele causado pela radiação UVB. Além disso, o número de células marcadas para a proteína PCNA foi reduzido após 24 e 48 horas da irradiação com o tratamento com luteína e zeaxantina.

O tratamento oral com silibina duas semanas antes da exposição aguda à radiação UVB resultou na diminuição de células marcadas para PCNA, p53 e células de queimadura solar. Estes resultados sugerem a capacidade da silibina na proteção contra os efeitos causados pela radiação UVB (MALLIKARJUNA *et al.*, 2005). No entanto, o tratamento apenas com veículo não foi mostrado.

Nos ensaios de exposição aguda à radiação UVB realizados foi observado que o tratamento com gel contendo extrato padronizado de raiz de *P. umbellata* aumentou o número de células marcadas para proteína PCNA após 12 horas quando comparado com o grupo UVB (**Figura 45**). No entanto, observou-se diminuição na espessura da epiderme viável 48 horas após a irradiação quando comparados ao grupo irradiado e não tratado (**Figura 44**). O número de células marcadas para proteína p53 diminuiu após 12 horas e aumentou em 24 e 48 horas após irradiação (**Figura 46**) no grupo tratado com gel de *P. umbellata* quando comparadas com o grupo irradiado. Foi observado também diminuição nas células de queimadura solar 12 horas após a irradiação (**Figura 43**).

Danos ao DNA causam aumento nas concentrações celulares da proteína p53 que ativa genes que induzem o reparo ao DNA ou a apoptose no caso de grande dano ao DNA (MELNIKOVA & ANANTHASWAMY, 2005). Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o tratamento com gel de *P. umbellata* mantém a indução da proteína p53 até 48 horas após a irradiação, indicando uma possível prevenção da proliferação de células com dano. O reparo do DNA dependente de PCNA é necessário para a manutenção da integridade genômica e a radiação UV é capaz de causar dano nestas vias de reparo (MOORE *et al.*, 2006). O aumento de células marcadas para proteína PCNA no grupo tratado com gel de *P. umbellata* observado neste estudo, pode estar relacionado à via reparo ou morte celular induzida pelo p53, já que houve

também diminuição significativa nas células de queimadura solar neste grupo de tratamento.

No estudo de exposição crônica à radiação UVB com dose de 55,51 KJ/m², o tratamento com gel de *P. umbellata* preveniu significativamente o aumento da espessura da epiderme viável quando comparado com o grupo irradiado e ao grupo tratado com veículo (**Figura 50**).

Os resultados encontrados para a proteína PCNA mostraram que o tratamento com gel de *P. umbellata* foi capaz de reduzir o número de células marcadas nos animais irradiados com dose de 13,17 KJ/m², em relação aos animais do grupo irradiado. No entanto, este efeito também foi encontrado para o grupo tratado com veículo. Na exposição à radiação UVB com dose de 55,51 KJ/m², o tratamento com gel de *P. umbellata* não apresentou diferença significativa em relação aos grupos não irradiado e irradiado e não tratados (**Figura 52**).

Neste estudo crônico, o tratamento com gel de *P. umbellata* mostrou resultado semelhante ao encontrado na exposição aguda na avaliação do número de células marcadas para a proteína p53 (**Figura 53**), indicando um aumento na proteção contra os danos causados pela radiação UVB.

Alguns dos efeitos encontrados para o extrato de *P. umbellata* também foi demonstrado para o veículo, sugerindo que a formação de filme causada pelo carbômero também pode proteger a pele. Alguns estudos com compostos derivados de extratos vegetais não fazem avaliação do grupo tratado somente com veículo (VAYALIL *et al.*, 2003; MALLIKARJUNA *et al.*, 2005), o que dificulta a comparação do efeito causado pelo composto com o efeito do veículo. Neste sentido, este estudo mostra a importância do grupo tratado somente com veículo nos ensaios de avaliação de atividade de extratos vegetais e derivados.

6. Conclusões

Estabilidade da formulação

As formulações contendo extrato padronizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* (contendo ou não BHT) estudadas mostraram-se estáveis por até 103 dias quando armazenadas a 5 e 25°C

Tratamento prévio com *P. umbellata* na exposição à radiação UVB

Exposição aguda

- previne a depleção de ácido ascórbico e o aumento de α -tocoferol causados pela irradiação
- mantém a atividade das enzimas nas mesmas concentrações encontradas para o grupo não irradiado, exceto pela diminuição inicial de SOD e pelo aumento na atividade de CAT
- acúmulo das proteínas p53 e PCNA, diminuindo o aparecimento de células de queimadura solar e o aumento da espessura da epiderme viável

Exposição crônica

- aumento de ácido ascórbico
- a exposição com doses baixas (8,60 e 13,17KJ/m²), causa aumento de α -tocoferol e com dose alta (55,51KJ/m²), previne a depleção causada pela irradiação
- previne o aumento da espessura da epiderme viável na exposição com dose alta de irradiação (55,51KJ/m²)
- acúmulo da proteína p53

O conjunto de resultados indica uma proteção da pele com o tratamento com gel de *Pothomorphe umbellata* contra os efeitos da exposição à radiação ultravioleta B.

7. Referências Bibliográficas

- ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CURANDI**, São Paulo, v.6, p.141-164, 1993.
- AFAQ, F., MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63, p. 61-69, 2001.
- AFAQ, F., ADHAMI, V.M. AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v., 186, p. 28-37, 2003
- AFAQ, F., ADHAMI, V.M., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, **Mutation Research**, v. 571, p.153–173, 2005
- AFAQ, F., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Experimental Dermatology**, v.15, p. 678-684, 2006
- AGARWAL, R., KATIYAR, S.K., KHAN, S.G., MUKHTAR, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 5, p. 695-700, 1993.
- ALGOHARY O.M.N., FODA N.H. Interaction of mebeverine hydrochloride and carbopol. **Pharmazeutische Industrie**, v. 55, n. 5, p. 523-527, 1993
- ANANTHASWAMY, H., ULRICH, S.E., MASCOTTO, R.E., FOURTANIER, A., LOUGHLIN, S.M., KHASKINA, P., BUCANA, C.D., KRIPKE, M.L. Inhibition of solar simulator-induced p53 mutations and protection against skin cancer development in mice by sunscreens. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, p. 763-768, 1999

- ANDERSON, R., FISHER, L., HARA, Y., HARRIS, T., MAK, W.B., MELTON, L.D., PACKER, J.E. Green tea catechins partially protect DNA from (.)OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. **Carcinogenesis**, v.22, p. 1189-1193, 2001
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resoluções/2002/475_02re.htm. Acesso em 28jul.2003
- ARONOFF, S. Catalase: Kinetics of photooxidation. **Science**, v. 150, p. 72-73, 1965.
- AZIZ, M.H., REAGAN-SHAW, S., WU, J., LONGLEY, B.J., AHMAD, N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease?. **FASEB**, v. 19, p. 1193-1195, 2005
- BARROS, S.B.M., TEIXEIRA, D.S., AZNAR, A.E., MOREIRA JR., J.A., ISHII, I., FREITAS, P.C.D.. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. **Ciênc. Cult**, v. 48, p. 114-116, 1996.
- BARROS, S., ROPKE, C.D., SAWADA, T., C. H., SILVA, V.V., PEREIRA, S.M.M., BARROS, S.B.M. Assesment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba) **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 41, (1),p. 53-61, 2005.
- BARRY, B.W.,. **Dermatological formulations**: percutaneous absorption. New York :Dekker, 1983.
- BERG, R.J., VAN KRANEN, H.J., REBEL, H.G., DE VRIES, A., VAN VLOTEN, W.A., VAN KREIJL, C.F., VAN DER LEUN, J.C., DE GRUIJL, F.R.: Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. **Proc Natl Acad Sci**, v.93, p.274-278,1996

- BERTON, T.R., CONTI, C.J., MITCHELL, D.L., ALDAZ, C.M., LUBET, R.A., FISCHER, S.M. The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 23, n. 3, p. 175-184, 1998.
- BERTON, T.R., PAVONE, A., FISCHER, S.M. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis *in vivo*. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 1171-1178, 2001
- BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. In: **Manual of Biochemical Methods**, 2 ed. New York: Grune & Stratton, 1975, p.89-90.
- BICKERS, D.R., ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, v126, p. 2565-2575, 2006.
- BISSET, D.L., HILDEBRAND, G.G., HANNON, D.P. The hairless mouse as a model of skin photoaging: its use to evaluate photoprotective materials. **Photodermatology**, Copenhagen, v.6, p.228-233, 1989.
- BISSET, D.L., CHATERJEE, R., HANNON, D.P. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in hairless mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 7, p. 56-62, 1990
- BLACK, H.S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 213-221, 1987
- BLACK, H.S., deGRUIJL, F.R., FORBES, P.D., CLEAVER, J.E., ANANTHASWAMY, H.N. deFABO, E.C., ULLRICH, S.E., TYRRELL, R.M. Photocarcinogenesis: an overview. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 29-47, 1997.

- BLANCO-FUENTE H, ESTEBAN-FERNANDEZ B, BLANCO-MENDEZ J, OTERO-ESPINAR FJ. Use of beta-cyclodextrins to prevent modifications of the properties of Carbopol hydrogels due to Carbopol-drug interactions. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.50, n.1, p. 40-46, 2002
- BOWDEN, G.T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targetting ultraviolet-B-light signaling. **Nature Reviews**, v.4, p.23-35, 2004
- BRASH, D.E., RUDOLPH, J.A., SIMON, J.A., LIN, A., McKENNA, G.J., BADEN, H.P., HALPERIN, A.J., PONTEN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced *p53* mutations in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 10124-10128, 1991
- BRASH, D.E., ZIEGLER, A., JONASON, A.S., SIMON, J.A., KUNALA, S., LEFFELL, D.J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. **Invest Dermatol Symp Proc.**, v.1, p. 136–142, 1996
- BRONAUGH, R.L., STEWARD, R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: Hydrophobic compounds. **J. Pharm. Sci.**, v.73, p. 1255-1258, 1983.
- BRUCH-GERHARZ, D., RUZICKA, T., KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide and its implication in skin homeostasis and disease - a review. **Achives of Dermatological Research**, v. 290, p. 643-651, 1998
- BURKE, K.E., CLIVE, J., COMBS JR, G.F., COMMISSO, J., KEEN, C.L., NAKAMURA, R.M. Effects of topical and oral vitamin E on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation in SKH:2 hairless mice. **Nutrition and cancer**, v. 38, p. 87-97, 2000
- BURTON, G.W., WEBB, A., INGOLD, K. U.. A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determinig vitamin E/lipid ratios. **Lipids**, v.20, p.29-39, 1985.

- CAMARGO, A.A., COSTA, F.F. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: BRENTANI, M.M., COELHO, F.R.G., KOWALSKI, L.P. ed. **Bases da oncologia**, São Paulo, 2003. 470p.
- CARLOTTI, M.E., ROSSATTO, V., GALLARATE, M. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. **Int. J. Pharm.**, 240, 85-94, 2002
- CHENG, L., Y., L.; PACKER, L. Photodamage to hepatocytes by visible light. **FEBS Lett.**, v.97, p.124-128, 1979.
- COSTA, R.M.A., MENCK, C.F.M. Genes de reparo de DNA. In: FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. ed. **Oncologia Molecular**, São Paulo, 2004. 451p.
- DHANALAKSHMI, S., MALLIKARJUNA, G., SINGH, R., AGARWAL, R. Silibin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless micew via decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1459-1465, 2004
- DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L.R.; KATO, M.; COUSSIO, J.. 4-nerolidylcathecol from *Potomorphe umbellata* Spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II) - dependent DNA damage. **Planta Med**, v.63, p.561-563, 1997
- DESMARCHELIER, C; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leave methanol extract. **Fitoterapia**, v.71, p.556-558, 2000.
- ELMETS, C.A., VARGAS, A., ORESAJO, C. Photoprotective effects of sunscreens in cosmetics on sunburns and Langerhans cell photodamage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 9, p. 113-120, 1992

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.449,660.

FOOTE, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.54, p.659, 1991.

FREITAS, P.C.D. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família *Piperaceae*: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnelli* (Miq.) C.DC. São Paulo, 115p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), 1999.

FRYER, M.J. Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.58, p.304-312, 1993.

FUCHS, J., HUFLEJT, M.S., ROTHFUSS, L.M., WILSON, D.S., CARCAMO, G., PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **The Journal Investigative Dermatology**, v.93, p.769-773, 1989.

FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.25, p.848-873, 1998.

GILCHREST, B.A., YAAR, M. Ageing and photoageing of the skin: observations at cellular and molecular level. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.127, suppl.41, p.25-30, 1992.

GILCHREST, B.A., YARR, M. Ageing versus photoageing: postulated mechanisms and effectors. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, Malden, v.3, p.47-51, 1998.

GIROTTI, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.51, n.4, p.497-509, 1990.

- GLAVAS-DODOV, M., GORACINOVA, K., MLADENOVSKA, K., FREDRO-KUMBARADZI, E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. **Int. J. Pharm.**, 242, 381-384, 2002
- GONZÁLEZ, S., ASTNER, S., AN, W., GOUKASSIAN, D., PATHAK, M.A. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, p. 399-405, 2003
- GUPTA, S., MUKHTAR.H.N Chemoprevention of skin cancer: Cuurent status and future prospects. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, p. 363-380, 2002
- HALLIWELL, B., GUTTERGUIDE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clavendon Press, 1999. p. 936.
- HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr. Rev.**, New York, v.55, n.1, p.544-552, 1997.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HUSSAIN, S.P., HOFSETH, L.J., HARRIS, C.C., Radical causes of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 276-285, 2003
- ICHIHASHI, M., UEDA, M., BUDYANTO, A., BITO, T., OKA, M., FUKUNAGA, M., TSURU, K., HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003
- IDSON, B. Dermatological emulsions. **Cosm. Toil.**,Oak Park, v. 95, p.59-62, 1980.
- IDSON, B. Vehicle effects in percutaneous absorption. **Drug Met. Rev.**, v. 14, p. 207-222., 1983.

JIMENEZ-KAIRUZ A, ALLEMANDI D, MANZO R.H. Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 1, p. 267-272, 2002

JURKIEWICZ, B.A., BUETTNER, G.R. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, p. 1-4, 1994

KAGAN, V.E., SERBINOVA, E.A., FORTE, T., SCITA, G., PACKER, L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992

KATYAR, S., PEREZ, A., MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin prevents formation of ultraviolet radiation B-induced pyrimidine-dimers in DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3864-3869, 2000

KATYAR, S., AFAQ, F., PEREZ, A., MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 287-294, 2001

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, p. 629-640, 1997.

KIJJOA, A. Estudo químico de algumas espécies da ordem magnoliales. São Paulo, 1980. 143p. (Tese de Doutorado - Instituto de Química - USP).

LAETHEM, A. CLAERHOUT, S., GARMYN, M., AGOSTINIS, P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p. 1547-1553, 2005

LANIGAN, R.S., YAMARIK, T.A. Final report on the safety assessment of BHT(1). **Int. J. Toxicol.**, v.21, s.2, p.19-94, 2002

LARSON, R.A. **Naturally occurring antioxidants**. Boca Raton: Lewis, 1997. p.1-4.

LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991

LOPEZ-TORRES, M., THIELE, J.J., SHINDO, Y., HAN, D., PACKER, L. Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. **The British Journal of Dermatology**, v.138, p.207-215, 1998.

LOU, Y.R., LU, Y.P., XIE, J.G., HUANG, M.T., CONNEY, A.H. Effects of oral administration of tea, decaffeinated tea, and caffeine on the formation and growth of tumors in high-risk SKH-1 mice previously treated with ultraviolet B light. **Nutrition and Cancer**, v. 33, p.146-153, 1999

LU, Y.P., LOU, Y.R., YEN, P., MITCHELL, D., HUANG, M.T., CONNEY, A.H. Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. **Cancer Research**, v. 59, p. 4591-4602, 1999

LU, Y.P., LOU, Y.R., LI, X.H., XIE, J.G., BRASH, D., HUANG, M.T., CONNEY, A.H. Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21 (WAF/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. **Cancer Research**, v. 60, p.4785-4791, 2000

LU, Y.P., LOU, Y.R., LI, X.H., XIE, J.G., LIN, Y., WEICHUNG, J.S., CONNEY, A.H. Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in mouse skin. **Oncology Research**, v. 13, p.61-70, 2002a

- LU, Y.P., LOU, Y.R., XIE, J.G., PENG, Q.Y., PENG, Q.Y., LIAO, J., YANG, C.S., HUANG, M.T., CONNEY, A.H. Topical application of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p.12455-12460, 2002b
- LU, Y.P., LOU, Y.R., XIE, J.G., PENG, Q.Y., ZHOU, S., LIN, Y., SHIH, W.J., CONNEY, A.H. Caffeine and caffeine sodium benzoate have a sunscreen effect, enhance UVB-induced apoptosis, inhibit UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. **Carcinogenesis**, v. 28, p.199-206, 2007
- MA, W., WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POOR, I., SCHNEIDER, L.A., NADERI, Z., RAZI-WOLF, Z., SCHULLER, J., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clinical Dermatology**, v. 26, p. 592-599, 2001
- MAEDA, K., NAGANUMA, M., FUKUDA, M. Effects of chronic exposure ultraviolet – A including 2% ultraviolet B on free radical reduction systems in hairless mice. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 737-740, 1991.
- MALUMBRES, M., BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews**, v. 1, p. 222-231, 2001.
- MANGONE, F.R.R., FEDERICO, M.H.H. Ciclo celular. In: BRENTANI, M.M., COELHO, F.R.G., KOWALSKI, L.P. ed. **Bases da oncologia**, São Paulo, 2003. 470p.
- MARTIN, A; BUSTAMANTE, P. **Physical Pharmacy** – Physical chemical Principles in the Pharmaceutical Science, 4 ed., Philadelphia:Lea & Febiger, 1993, p. 324-361.

- MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H.N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 756-783, 2002.
- MAY, P., MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v.18, p.7621-7636, 1999
- MC CORD, FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocytin). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6044-6055, 1969.
- McVEAN, M., LIEBLER, D.C. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. **Molecular Carcinogenesis**, v. 24, p. 169-176, 1999
- MALLIKARJUNA, G., DHANALAKSHMI, S., SINGH, R.P., AGARWAL, C., AGARWAL, R. Silibin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases and Akt signaling. **Cancer Research**, v. 64, p. 6349-6356, 2004
- MALLIKARJUNA, G., DHANALAKSHMI, S., SINGH, R.P., AGARWAL, R. Dietary feeding of silibin prevents early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 1344-1349, 2005
- MALLIKARJUNA, G., DHANALAKSHMI, S., MOHAN, S., SINGH, R.P., AGARWAL, R. Silibin inhibits ultraviolet B radiation-induced mitogenic and survival signaling, and associated biological responses in SKH-1 mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1404-1413, 2005
- MELNIKOVA, V.O., ANANTHASWAMY, H.N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutation Research**, 571, 91-106, 2005

- MOORE, J.O., PALEP, S.R., SALADI, R.N., GAO, D., WANG, Y., PHELPS, R.G., LEBWOHL, M.G., WEI, H. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferation cell nuclear antigen in murine skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, p. 587-595, 2004
- MOORE, J.O., WANG, Y., STEBBINS, W.G., GAO, D., ZHOU, X., PHELPS, R.G., LEBWOHL, M.G., WEI, H. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1627-2635, 2006
- MORAES, M.S. Caracterização farmacognostica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. São Paulo, 1983. 112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
- NATARAJ, A.J., TRENT II, J.C., ANANTHASWAMY, H.N. p53 gene mutations and photocarcinogenesis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, n.2, p. 218-230, 1995.
- NORIEGA-SALAZAR, P., ROPKE, C.D., CAMILO, C.M., FREITAS, P.C.D., BARROS, S.B.M. Avaliação por análise factorial das condições de extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n. 2, p.261-269, 2005.
- OUHTIT, A., MULLER, H.K., DAVIS, D.W., ULLRICH, S.E., McCONKEY, D., ANANTHASWAMY, H.N. Temporal events in skin injury and the early adaptative responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **American Journal of Pathology**, v. 156, n.1, p. 201-207, 2000a.

- PACKER, L., ROY, S., SEN.C.K. α -lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. In: SIES, H., ed. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego, London: Academic Press, 1997. 707p.
- PAUNESKU, T.; MITTAL, S.; PROCTIC, M.; ORYHON, J.; KOROLEV, S.V.; JOACHIMIAK, A., WOLOSCHAK, G.E. et al. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. **Int. J. Radiat. Biol**, v.77, n.10, p. 1007-1021, 2001
- PENCE, B.C., NAYLOR, M.F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.95, p.213-216, 1990.
- PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; LOPES, W.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, J.C.T.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **J. Ethnopharmacol.** v.99, p.215-220, 2005.
- PERCHELLET, J.P., PERCHELLET, E.M. Antioxidants and multistage carcinogenesis in mouse skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, p. 377-408, 1989
- PODDA, M., GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clin. Exp. Dermatol.**, Oxford, v.26, p.578-582, 2001.
- RANGARAJAN, E., ZATZ, J.L. Skin delivery of vitamin E. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.50, p.249-279, 1999.

- REAGAN-SHAW, S., AFAQ, F., AZIZ, M.H., AHMAD, N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. **Oncogene**, v. 23, p. 5151-5160, 2004
- REBEL, H., MOSNIER, L.O., BERG, R.J.W., deVRIES, A.W., STEEG, H. KRANEN, H.J., deGRUIJL, F.R. Early p53-positive foci as indicator of tumor risk in ultraviolet exposed hairless mice: kinetics of induction, effects of DNA repair deficiency and p53 heterozygosity. **Cancer Research**, v. 61, p. 977-983, 2001.
- RIBEIRO, A.M., KHURY, E., GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. Congresso Nacional de Cosmetologia. **Anais do 10º encontro Brasileiro de Químicos Cosmética (ABC)**, p.349-375, 1996
- ROPKE, C.D. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* na pele, São Paulo 83p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), 1998.
- ROPKE, C.D., KANEKO, T.M., RODRIGUES, R.M., SILVA, V.V., BARROS, S., SAWADA, T.C.H., KATO, M.J., BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidilcatecol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 107-114, 2002.
- ROPKE, C. D., MEIRELLES, R.R., DA SILVA, V.V., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.78, n.5, p.436-439, 2003a
- ROPKE, C.D., OSTROSKY, E.A., KANEKO, T.M. CAMILO, C.M., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.2, p. 209-217, 2003b

- ROPKE, C.D. Prevenção do dano fotooxidativo à pele por tratamento tópico com extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. , São Paulo 98p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), 2003c
- ROPKE, C.D., SAWADA, T.C. H., DA SILVA, V.V., MICHALANY, N.S., BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clinical and Experimental Dermatology**. v.30, p.272-276, 2005
- ROPKE, C.D., SILVA, V.V., KERA, C.K., MIRANDA, D.V., ALMEIDA, R.L., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p. 439-442, 2006
- ROSS, M.A. Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical and Applications**, v.657, p. 197-200, 1994
- SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., DE PASQUALE, A., UCCELLA, N., BARBUZZI, T., PAOLINO, D., BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.199, p.39-47, 2000.
- SANDER, C.S. CHANG, H., HAMM, F., ELSNER, P. THIELE, J.J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 43, p. 326-335, 2004
- SCHARFFETTER-KOCHANKE, K., WLASCHEK, M., BRENNISEN, P., SCHAUEN, M., BLAUDSCHUN, R., WENK, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 1247-1257, 1997.

SEITE, S., COLIGE, A., DEROANNE, C., LAMBERT, C., PIQUEMAL-VIVENOT, P., MONTASTIER, C., FOURTANIER, A., LAPIERE, C., NUSGENS, B. Changes in matrix gene and protein expressions after single or repeated exposure to one minimal erythemal dose of solar-simulated radiation in human skin *in vivo*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, p. 265-271, 2004

SHAH, J.C. Analyses of permeation data: evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.** v. 90, p. 161-169, 1993.

SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. 453p.

SHAH, J.C., KAKA, I., TENJARLA, S., LAU, S.W.J., CHOW, D. Analyses of permeation data: II. Evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.** v. 109, p. 283-290, 1994.

SHINDO, Y., WITT, E., PACKER, L. Antioxidant defense mechanism in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.100, p.260-265, 1993.

SHINDO, Y., WITT, E., HAN, E., PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.102, p.470-475, 1994.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Lett.**, v.103, p. 287-290, 1979.

SIES, H. **Oxidative stress**. New York: Academic Press, 1985. p.507.

- SINGH, R., AGARWAL, R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibin in preventing skin cancer. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1969-1979, 2005
- SILVA, R.A.D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1926. p.649.
- SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. ed. **Oncologia Molecular**, São Paulo, 2004. 451p.
- SILVA, V.V., ROPKE, C.D., ALMEIDA, R.L., MIRANDA, D.V., KERA, C.Z., RIVELLI, D.P., SAWADA, T.C., BARROS, S.B.M. Chemical stability and SPF determination of Pothomorphe umbellata extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **Int J Pharm.**, 303, p.125-31, 2005.
- STEENVOORDEN, D.P.T., BEIJERSBERGEN van ENEGOUVWEN, G.M.J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **J. Photochem. Photobiol.**, B, Lausanne, v.41, p.1-10, 1997.
- TAYLOR, C.R., STERN, R.S., LEYDEN, J.J., GILCHREST, B.A. Photoaging/photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.22, n.1, p.1-15, 1990.
- TEDESCO, A. C., MARTINÉZ, L., GONZALEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defense and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.30, n.5, p. 561-575, 1997.
- TOUITOU, E., FABIN, B. Altered skin permeation of a highly lipophilic molecule: tetrahydrocannabinol. **Int. J. Pharm.**, v.43, p.17-22, 1988.

- VAYALIL, P.K., ELMETS, C.A., KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 927-936, 2003
- VAYALIL, P.K., MITTAL, A., HARA, Y., ELMETS, C.A. Green tea polyphenols prevents ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 1480-1487, 2004
- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN, Z.N. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, p. 131-149, 2003
- VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. p53 function and dysfunction. **Cell**, v.70, p. 523-526, 1992
- VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.L. Surfing the p53 network. **Nature**, v.408, p. 307-310, 2000.
- WEBER, C., PODDA, M., RAALIS, M., THIELE, J.J., TRABER, G., PACKER, L. Efficacy of topically applied tocopherols and tocotrienol in protection of murine skin from oxidative damage induced by UV-irradiation. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.22, n.4, p.761-769, 1997.
- WILLIAMS, M., OUHTIT, A. Towards a better understanding of the molecular mechanisms involved in sunlight-induced melanoma. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.1, p. 57-61, 2005.

- WOODS, D.B., VOUSDEN, K.H. Regulation of p53 function. **Experimental Cell Research**, v. 264, p. 56-66, 2001.
- YASUOKA, S., TAKATA, J., KARUBE, Y., KATOH, E., TSUZUKI, T., KIZU, J., TSUCHIYA, M., KOBAYASHI, S. Topical application of a novel, water-soluble γ -tocopherol derivative prevents UV-induced skin damage in mice, **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p., 908-913, 2005
- YUSUF, N., IRBY, C., KATIYAR, S.K., ELMETS, C.A. Photoprotective effects of green tea polyphenols. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 23, p., 48-56, 2007
- ZIEGLER, A. JONANSON, A.S., LEFFELL, D.J., SIMON, J.A., SHARMA, H.W., KLIMMELMANN, J., REMINGTON, L., JACKS, T., BRASH, D.E. Sunburn and p53 on the onset of skin cancer. **Nature**, v. 372, p. 773-776, 1994
- ZHOU, B.B.S., BARTEK, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. **Nature Reviews**, v.4, p.1-10, 2004.

9. Anexos

9.1 Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP

9.2 Artigo Publicado

Silva, V.V., Ropke, C.D., Almeida, R.L., Miranda, D.V., Kera, C.Z., Rivelli, D.P., Sawada, T.C.H., Barros, S.B.M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcathecol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, n. 1-2, p. 125-131, 2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Emprego do extrato de Pothomorphe umbellata na prevenção do câncer de pele induzido por radiação UVB” (Protocolo nº03), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Vanessa Vitoriano da Silva e do orientador(a) Silvia Berlanga de Moraes Barros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 02/12/2002.

São Paulo, 03 de dezembro de 2002.

Prof. Tit. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Pharmaceutics 303 (2005) 125–131

**international
journal of
pharmaceutics**
www.elsevier.com/locate/ijpharm

Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol

Vanessa V. da Silva*, Cristina D. Ropke, Rebeca L. de Almeida,
Denise V. Miranda, Clarissa Z. Kera, Diogo P. Rivelli,
Tânia C.H. Sawada, Silvia B.M. Barros

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

Received 13 June 2005; received in revised form 7 July 2005; accepted 11 July 2005
Available online 29 August 2005

Abstract

Due to its antioxidant and photoprotective properties, *Pothomorphe umbellata* is a promising candidate for use in cosmetic and pharmaceutical formulations. These properties arise from the presence of 4-nerolidylcatechol (4-NC), a polyphenolic compound isolated from *P. umbellata* roots. This study investigates its photostability properties, as well as the chemical and the in vitro sun protection factor (SPF) of *P. umbellata* root extract in a gel formulation. A high performance liquid chromatography method was used to evaluate the chemical stability using 4-NC as marker at 5, 25 and 45 °C for 103 days. The photostability and the sun protection factor were analyzed by ultraviolet (UV) spectrophotometry using samples irradiated with UVB lamp. No significant difference of the 4-NC concentration was found in formulations stored at 5 and 25 °C. All samples stored at 45 °C, however, showed degradation of gel structure. After 2 h of UVB exposure, there was no change in the absorption profile of 4-NC. The sun protection factor of *P. umbellata* root extract gel to final concentration of 0.1% 4-NC was not expressive (SPF = 3.35 ± 0.02), suggesting the predominance of its antioxidant activity.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Pothomorphe umbellata*; 4-Nerolidylcatechol; Stability; Photostability; Sun protection factor

1. Introduction

Chronic exposure of human skin to solar ultraviolet (UV) radiation may cause several skin damages. These

damages include sunburn, skin cancer, oxidative stress as well as photoaging depending on the amount and form of the UV radiation and on the type of the individual exposed (Ichihashi et al., 2003; Melnikova and Ananthaswamy, 2005).

There has been an increasing interest in the use of antioxidants in sunscreens to provide supplemental photoprotective action activity. Antioxidants from

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3631;
fax: +55 11 3813 2197.

E-mail address: vavitoria@usp.br (V.V. da Silva).

Fig. 1. 4-Nerolidylcatechol (Kijjoa et al., 1980).

natural sources may provide new possibilities for the treatment and prevention of UV-mediated diseases (Bonina et al., 1996; Saija et al., 1998; F'guyer et al., 2003). The Brazilian flora is rich in medicinal plants with a high potential for providing these antioxidants. Among them, the Piperaceae family, and in particular, the “pariparoba”, is widely used in Brazilian folk medicine for the treatment of liver diseases. The root of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq was included in the first edition of the *Brazilian Pharmacopeia* (Silva, 1926).

Different experimental models displayed a significant activity of crude root ethanolic extracts of *P. umbellata* as antioxidant and photoprotective agent (Barros et al., 1996; Desmarchelier et al., 1997; Ropke et al., 2000). This activity was attributed to 4-nerolidylcatechol (4-NC) (Fig. 1), a compound isolated from the roots and leaves of *P. umbellata* (Kijjoa et al., 1980). In our previous study, skin alpha-tocopherol concentrations diminished ($\approx 40\%$) in irradiated hairless mice control groups, but were totally preserved in the *P. umbellata* treated group ($\approx 100\%$) (Ropke et al., 2003). Further, a cutaneous absorption study using four topical formulations (4-NC gel, 4-NC gel emulsion, 4-NC emulsion and crude root extract *P. umbellata* gel) showed that a higher concentration of 4-NC in the skin was found in the 4-NC gel formulation (Ropke et al., 2002). Even at a lower rate of percutaneous absorption of crude root extract *P. umbellata* gel, a total reactive antioxidant potential study showed that it has a higher antioxidant potential than the isolated 4-NC, suggesting the presence of additional compounds with antioxidant activity (Desmarchelier et al., 1997). An in vivo study showed that *P. umbellata* root extract gel was able to effectively reduce the incidence of visible and histological skin alterations in chronically UVB irradiated mice (Ropke et al., 2005).

Despite the promise of the *P. umbellata* root extract in cosmetic formulations, there are no data available about several aspects of the formulation. The goals of this research are to evaluate: (1) its stability at 0, 1, 3, 7, 37, 44, 81 and 103 days stored at 5, 25 and 45 °C; (2) the in vitro sun protection factor; (3) the photostability of isolated 4-NC over UVB exposure for 30, 60, 90 and 120 min. These experiments were carried out using a carbomer 940 (1.5%, w/w) gel of the *P. umbellata* root extract to final concentration of 0.1% 4-NC (w/w).

2. Material and methods

2.1. Test materials

Methanol, ethanol, hexane lierosolv grade, methanol UVsolv, KCl p.a., homosalate (Eusolex[®] HMS) were from Merck (Darmstadt, Germany). LiClO₄ was from Aldrich (Milwaukee, WI). 4-Nerolidylcatechol was isolated as described previously from dried powdered roots of *P. umbellata* (Gustafson et al., 1992). Carbomer 940 (Carbopol[®] 940), propylene glycol, trietanolamine and methyl paraben were from Galena (Campinas, Brazil). Butylated hydroxytoluene (BHT) was from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Sundown[®] SPF 15 was from Johnson & Johnson (batch number: lot 04, Brazil) and Helioblock[®] SPF 30 was from (batch number: bB080, La Roche Posay, France).

2.2. Extract preparation

The plant material was identified and a sample was deposited in the Herbarium of the Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil. Powdered roots were percolated according to the *Brazilian Pharmacopeia* (Silva, 1926), with ethanol–water (1:1) (100 ml/g of dried powdered root) and the extract was freeze-dried. The final concentration of the 4-NC in the crude extract was 7.1% (w/w), as evaluated by HPLC with electrochemical detection as previously described (Ropke et al., 2002).

2.3. Formulations

For the chemical stability study, gel formulation containing *P. umbellata* root extract with final concentration of 0.1% (w/w) for the 4-NC and 1.5% (w/w)

Table 1
Composition (% w/w) of gel formulations used for the chemical stability study (F1 and F2) and for the determination of SPF (F1)

	F1	F2
Carbomer 940	1.5	1.5
Propylene glycol	10	10
Trietanolamine	0.5	0.5
Methyl paraben	0.25	0.25
Butylated hydroxytoluene	–	0.05
<i>P. umbellata</i> root extract	1.41	1.41
Distilled water qs	100	100

of carbomer 940 was prepared. This concentration of 4-NC was chosen because it was the minimal active antioxidant concentration found in our previous study (Ropke, 1999; Ropke et al., 2000). A second formulation was prepared with the addition of 0.05% (w/w) of BHT (Table 1).

Two series of 1.5% (w/w) carbomer 940 hydrogels, with and without 0.05% (w/w), were prepared by neutralizing an aqueous dispersion of the carbomer with trietanolamine under constant stirring. The hydrogels were kept at room temperature. Then, the *P. umbellata* root extract was weighted and small amounts of the gel formulation were added until total gel weight was added under constant stirring. The gel was once more neutralized with trietanolamine under constant stirring. The final pH of the formulation was 5.0. All formulations were stored in well-closed dark glass flasks and were compounded fresh for all studies.

Determination of the sun protection factor (SPF) was carried out using the first gel formulation described above (without BHT) as well as the crude *P. umbellata* root extract. The isolated 4-NC was used for the photostability study.

2.4. Chemical stability study

The stability of 4-NC over time and the influence of temperature on the degradation of *P. umbellata* root extract gel without and in the presence of antioxidant were investigated. Gel formulations (with and without BHT) were stored in well-closed 10 g dark glass flasks under different conditions: 5, 25 and 45 °C (± 1 °C). The amount of 4-NC in samples was quantitatively determined at 0, 1, 3, 7, 37, 44, 81 and 103 days (Ribeiro et al., 1996; Carlotti et al., 2002). The 4-NC was extracted from the gel formulation using a mod-

ification of the procedure described by Burton et al. (1985). Briefly, 1.0 ml of distilled water and 10 ml of hexane were added to 50 mg of the samples. A fraction of the hexane layer was evaporated under nitrogen, dissolved in ethanol and analyzed by HPLC with electrochemical detection as described previously (Ropke et al., 2002).

2.5. Determination of the in vitro sun protection factor

The crude *P. umbellata* root extract, the gel formulation (1.5% carbomer 940) containing *P. umbellata* root extract with final concentration of 0.1% (w/w) of 4-NC and the isolated 4-NC were analyzed for the in vitro SPF. The crude *P. umbellata* root extract and the gel formulation were dissolved in methanol UVsolv:water (6:4) and the isolated 4-NC was dissolved in methanol UVsolv to 0.2 µg/ml. Scans of the samples in solution were run from 320 to 290 nm using 1 cm quartz cuvettes in a Hitachi DU-3210 spectrophotometer (Sayre et al., 1979). Two commercial sunscreens, Sundown[®] SPF 15 and Helioblock[®] SPF 30, were used for the calculation of the correction factor and a solution of 8% homosalate (v/v) diluted to 0.2 µg/ml was used as standard.

The SPF model used in this study was based on the following equation proposed by Mansur et al. (1986):

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{abs}(\lambda) \quad (1)$$

where CF is correction factor, determined by two sunscreens with known SPF, so that a solution containing 8% of homosalate gives SPF=8; EE(λ) the erythemal efficiency spectrum; $I(\lambda)$ the solar simulator spectrum as measured with a calibrated spectroradiometer; $\sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times I(\lambda) = 290\text{--}320$ nm in 5 nm increments; abs(λ) is the spectroradiometer measure of sunscreen product absorbance.

Table 2 shows the normalized values of the product function used in these studies and were calculated by Sayre et al. (1979).

2.6. Photostability of 4-nerolidylcatechol

A methanol solution of 30 µg/ml 4-NC, in a 1 cm quartz cuvette perfectly stoppered, was irradiated with a Philips TL12rs 40W UVB lamp at a fixed distance (26 cm). UV irradiation was performed just after the

Table 2
The normalized product function used in the calculation of SPF data

λ (nm)	EE $\times$ I (normalized)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
	=1.000

EE: erythral efficiency spectrum; I: solar simulator intensity spectrum (Sayre et al., 1979).

preparation ($t=0$) and at the following times: 30, 60, 90 and 120 min, with doses of 206, 412, 618 and 824 mJ/cm², respectively (Iocle et al., 2005). The total energy output of the lamp was measured using an International Light radiometer 1700 IL equipped with a UVB SED sensor. The content of 4-NC in each solution was determined quantitatively by HPLC with UV detection. The HPLC equipment consisted of a Consta Metric 3200 pump and a Linear Instruments model 525 spectrophotometric detector ($\lambda=282$ nm) with a 7161 Rheodyne injector equipped with a 20 μ l loop. Integration of the chromatographic peaks was achieved with an SP 4600 Thermostepparation Products integrator. Chromatography was performed on a Phenomenex C18 (3.9 mm $\times$ 300 mm) 10 μ m column with a mobile phase of methanol–water (9:1). The flow rate was set at 1.0 ml/min. Each sample was filtered through 0.22 μ m cellulose acetate filters (Costar®) and an aliquot of 20 μ l was injected into the HPLC. UV spectra were performed in a Hitachi DU-3210 spectrophotometer.

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by factorial analysis of variance (ANOVA). The Tukey–Kramer test was then used to determine significant differences between groups.

3. Results and discussion

3.1. Chemical stability of the *P. umbellata* extract gel formulation

The chemical stability of the *P. umbellata* root extract gel was determined according to the concen-

Fig. 2. Concentration of 4-NC (μ g/g gel) in both formulations: without BHT and with BHT stored at 5 and 25 °C for 103 days. Data are the mean of three samples. Error bars were omitted to improve clarity. The difference between times was considered not significant.

tration of 4-NC at different storage temperatures (5, 25 and 45 °C) for 103 days. The final concentration was expressed as micrograms of 4-NC per gram of gel formulation. The results, plotted in Fig. 2, show the mean values of three samples for each time and temperature of storage.

Carbomer frequently interacts with cationic drugs and excipients due to its numerous carboxylic acid groups (Blanco-Fuente et al., 2002). In vitro studies using carbomers 934 and 940 showed that its interaction with substances commonly used in the pharmaceutical industry, such as lidocaine and mebeverine hydrochloride, was a function of pH, drug, polymer concentration and electrolytes (Al-Gohary and Foda, 1993; Jimenez-Kairuz et al., 2002; Glavas-Dodov et al., 2002). The 4-NC recovery, using water to break the carbomer 940 gel structures, was 60%. In order to improve the recovery, we used other solutions with different pH and amount of electrolytes, and higher volumes of hexane on the 4-NC extraction but none of these conditions showed better results.

All samples stored at 5 and 25 °C were stable over the time of experiment (103 days). All of them showed an initial decrease (20%) between days 0 and 1 and then remain constant over time. Addition of 0.05% (w/w) of BHT did not influence the stability. The samples stored at 45 °C were stable for 7 days (data not shown) but then a degradation of gel structure was observed. Data are the mean of three samples for each day and each formulation. The difference between concentrations of 4-NC over time was considered not significant in the statistical analysis.

Table 3
SPF calculated for two commercial sunscreens (Sundown[®] SPF 15 and Helioblock[®] SPF 30) using Eq. (1) (Section 2.5) and data given in Table 2

λ (nm)	EE $\times$ I (normalized)	Sundown [®] SPF 15		Helioblock [®] SPF 30	
		Absorbance	SPF	Absorbance	SPF
290	0.0150	0.4413	0.0066	0.7940	0.0119
295	0.0817	0.4197	0.0343	0.7758	0.0634
300	0.2874	0.4068	0.1169	0.7648	0.2198
305	0.3278	0.3816	0.1251	0.7468	0.2448
310	0.1864	0.3672	0.0684	0.7190	0.1340
315	0.0839	0.3429	0.0288	0.6934	0.0582
320	0.0180	0.3130	0.0056	0.6690	0.0120
Total			0.3858		0.7441

EE: erythral efficiency spectrum; I: solar simulator intensity spectrum (Sayre et al., 1979).

3.2. In vitro sun protection factor in the *P. umbellata* extract and of its gel formulation

3.2.1. Determination of the correction factor

The correction factor was calculated for each commercial sunscreen (Sundown[®] SPF 15 and Helioblock[®] SPF 30) using Eq. (1) (Section 2.5), data given in Table 2 and the total SPF given in Table 3. The final average correction factor is 39.60.

3.2.2. Determination of SPF in the *P. umbellata* extract and of its gel formulation

Table 4 summarizes the SPF values determined for each solution described. All values are means of three replicated determinations. As expected, the SPF observed for the 8% homosalate solution was approximately 8 (7.86 ± 0.12). Thus, in vitro SPF value for the crude *P. umbellata* root extract (7.1% of 4-NC) was 21.53 ± 0.04 . When 1.41% *P. umbellata* root extract

Table 4

Results expressed as the average and S.D. of three determinations replicated of the SPF values

Sample	SPF
Homosalate 8%	7.86 ± 0.12
<i>P. umbellata</i> extract gel 1.41%	3.35 ± 0.02
Isolated 4-nerolidylcatechol	4.00 ± 0.59
Crude <i>P. umbellata</i> root extract	21.53 ± 0.04

was added to the carbomer gel formulation, the SPF value was 3.35 ± 0.02 . The SPF of the isolated 4-NC was 4.00 ± 0.59 , suggesting the presence of additional compounds with sunscreen activity in the extract.

3.3. Photostability of the isolated 4-nerolidylcatechol

A methanol solution of 30 $\mu\text{g/ml}$ 4-NC was irradiated with a UVB lamp. Absorbance spectra of the 4-NC

Fig. 3. Absorbance spectra of a methanol solution of 30 $\mu\text{g/ml}$ 4-NC: (A) just after preparation and (B) after 60 min of UVB irradiation.

Fig. 4. Concentration of 4-NC in an irradiated methanol solution as a function of irradiation time. All values are means of three replicated experiments. The concentration difference between times was considered not significant.

solution were stable over time of irradiation (Fig. 3) as well as its concentration determined by HPLC with UV detection (Fig. 4). All values are means of three replicated experiments. The concentration difference between times was considered not significant in the statistical analysis.

4. Conclusions

This study has shown that the *P. umbellata* root extract gel is stable for at least 3 months when stored at 5 and 25 °C and that addition of BHT does not affect the stability. Heat is a possible factor responsible for the gel degradation over time. Further, 4-NC, the major antioxidant of *P. umbellata*, is also stable when exposed to UVB irradiation. Moreover, the low sun protection factor value observed for the *P. umbellata* root extract gel used in these experiments supports that the alpha-tocopherol preservation and photoprotective effects of the *P. umbellata* observed in our previous studies (Ropke et al., 2003, 2005) are due to its antioxidant activity.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Paolo Di Mascio for the radiometry measurements and Prof. Erika Maria Rosa Kedor for the advice with the SPF methodology. This research was supported by fellowships from

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) awarded to Vanessa Vitoriano da Silva (Ph.D. graduated student) and to Rebeca Leite de Almeida (under graduated student) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) awarded to Diogo Pineda Rivelli (under graduated student).

References

- Al-Gohary, O.M., Foda, N.H., 1993. Interaction of mebeverine hydrochloride and carbopol. *Pharm. Ind.* 55, 523–527.
- Barros, S.B.M., Teixeira, D.S., Aznar, A.E., Moreira Jr., J.A., Ishii, I., Freitas, P.C.D., 1996. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. *Miq. Ciênc. Cult.* 48, 114–116.
- Blanco-Fuente, H., Esteban-Fernandez, B., Blanco-Mendez, J., Otero-Espinar, F.J., 2002. Use of beta-cyclodextrins to prevent modifications of the properties of carbopol hydrogels due to carbopol–drug interactions. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 40–46.
- Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Castelli, F., Saija, A., 1996. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharm.* 145, 87–94.
- Burton, G.W., Webb, A., Ingold, K.U., 1985. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining Vitamin E/lipid ratios. *Lipids* 20, 29–39.
- Carlotti, M.E., Rossatto, V., Gallarate, M., 2002. Vitamin A and Vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *Int. J. Pharm.* 240, 85–94.
- Desmarchelier, C., Barros, S., Repetto, M., Latorre, L.R., Kato, M., Coussio, J., Ciccia, G., 1997. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxyl radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med.* 63, 561–563.
- F'guyer, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2003. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19, 56–72.
- Glavas-Dodov, M., Goracinova, K., Mladenovska, K., Fredro-Kumbaradzi, E., 2002. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int. J. Pharm.* 242, 381–384.
- Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., Mc Mahon, J.B., Pannell, K.P., Cragg, G.M., Boyd, M.R., 1992. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J. Org. Chem.* 57, 2809–2811.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21–39.
- Ioele, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G., Ragno, G., 2005. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *Int. J. Pharm.* 293, 251–260.
- Jimenez-Kairuz, A., Allemanni, D., Manzo, R.H., 2002. Mechanism of lidocaine release from carbomer–lidocaine hydrogels. *J. Pharm. Sci.* 91, 267–272.
- Kijjoa, A., Giesbrecht, A.M., Akissue, M.K., Gottlieb, O.R., Gottlieb, H.E., 1980. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Med.* 39, 85–87.

- Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D., 1986. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anal. Bras. Dermatol.* 61, 167–172.
- Melnikova, V.O., Ananthaswamy, H.N., 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat. Res.* 571, 91–106.
- Ribeiro, A.M., Khury, E., Gottardi, D., 1996. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: *Annals of the 10th National Cosmetology Congress of the Brazilian Cosmetology Association*, pp. 349–375.
- Ropke, C.D., 1999. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. na pele. Master's Thesis. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil.
- Ropke, C.D., Barros, S., Sawada, T.C.H., Bernusso, L.C., da Silva, V.V., Barros, S.B.M., 2000. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. na pele. In: *Annals of the 14th National Cosmetology Congress of the Brazilian Cosmetology Association*, pp. 483–500.
- Ropke, C.D., Kaneko, T.M., Rodrigues, R.M., da Silva, V.V., Barros, S., Sawada, T.C., Kato, M.J., Barros, S.B.M., 2002. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int. J. Pharm.* 249, 109–116.
- Ropke, C.D., Meirelles, R.R., da Silva, V.V., Sawada, T.C., Barros, S.B.M., 2003. *Pothomorphe umbellata* extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. *Photochem. Photobiol.* 78, 436–439.
- Ropke, C.D., Sawada, T.C., da Silva, V.V., Michalany, N.S., Barros, S.B.M., 2005. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 272–276.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., De Pasquale, A., Bonina, F., 1998. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.* 175, 85–94.
- Sayre, R.M., Agin, P.P., LeVee, G.J., Marlowe, E., 1979. A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochem. Photobiol.* 29, 559–566.
- Silva, R.A.D., 1926. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*, first ed. Nacional, São Paulo, p. 649.