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

Avaliação da atividade antioxidante de
Pothomorphe umbellata L. Miq na pele.

Cristina Dislich Röpke

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
1999

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

Dislich Röpke, Cristina
D611a Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata*
L. Miq na pele / Cristina Dislich Röpke. -- São Paulo, 1999.
83p.

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

1. Farmacognosia 2. Farmacologia 3. Patologia I. T. II
Barros, Silvia Berlanga de Moraes, orientador.

615.321 CDD

Cristina Dislich Röpke

Avaliação da atividade antioxidante de
Pothomorphe umbellata L. Miq na pele.

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador/ Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, de de 1999

**Ora, nós não temos recebido
o espírito do mundo, e sim, o
Espírito que vem de Deus, para
que conheçamos o que por Deus
nos foi dado gratuitamente.**

1 Coríntios, 2, 12

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pela oportunidade e por ser esta pessoa especial que me incentiva muito com seu exemplo de vida.

Ao meu marido e companheiro Ernani, pelo incentivo, pelo amor e pela compreensão nos momentos em que precisei estar ausente.

À minha família Henrique, Elke e Martina, pela paciência e apoio em todos os sentidos.

Aos meus amigos Tânia, Sonia, Vanessa, Leandra, Nilsa, Edanir e Lélío pela amizade e pela ajuda recebida na concretização deste trabalho.

À Profa. Maria Cristina Rosa Yamasaki, do Departamento de Aplicações Industriais da Radiação, do IPEN, pela maneira prestativa como me ajudou a medir a dose de radiação emitida pelas lâmpadas de UV utilizadas neste trabalho.

À Indústria e Comércio de Cosméticos Natura Ltda, pela gentileza de emprestar a Lâmpada Solar Ultraviolet Simulator 600, necessária para realização deste trabalho.

Ao Prof. Edanir dos Santos pela idéia e manufatura dos contentores de metal para camundongos.

À colega Kennia Rocha Rezende pela curva de padronização do 4-nerolidilcatecol em HPLC.

Ao Prof. Massuo Jorge Kato e a Kennia Rocha Rezende pelo padrão de 4-nerolidilcatecol.

Ao Paulo Chanel de Freitas pela ajuda na preparação do extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata*.

Ao Prof Jorge, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela análise estatística dos dados apresentados neste trabalho.

3.7 Medida da dose de radiação recebida pelos animais para as diferentes lâmpadas empregadas no ensaio.....	34
3.8 Tratamento dos animais.....	36
3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	36
3.8.2 Avaliação do efeito causado pela radiação UV sobre a pele dos camundongos Hairless.....	38
3.9 Avaliação da lipoperoxidação.....	39
3.10 Obtenção do homogenato de pele.....	39
3.11 Avaliação da lipoperoxidação através da medida de TBARS..	39
3.11.1 Medida espectrofotométrica.....	39
3.12.2 Medida espectrofluorimétrica.....	40
3.12 Medida da lipoperoxidação através da quimiluminescência....	41
3.13 Análise Estatística.....	42
4. Resultados.....	43
4.1 Comparação entre atividade antioxidante do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> e α -tocoferol incorporado à diadermina.....	43
4.2 Avaliação da atividade antioxidante em pele de camundongos tratados com diferentes concentrações de α -tocoferol.....	49
4.3 Avaliação da atividade antioxidante em pele de camundongos tratados com o extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> , incorporado em diferentes concentrações na diadermina.....	51

Índice

	página
Símbolos e Abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução.....	01
1.1 Espécies reativas de oxigênio.....	01
1.2 Estresse oxidativo na pele.....	03
1.3 Fotoperoxidação lipídica.....	10
1.4 Antioxidantes.....	14
1.5 Os sistemas antioxidantes da pele.....	16
1.6 Fotoenvelhecimento e Antioxidantes.....	20
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos.....	28
3.1 Equipamentos.....	28
3.2 Reagentes.....	29
3.3 Coleta e processamento das raízes de <i>Pothomorphe</i> <i>umbellata</i>	29
3.4 Obtenção de extrato hidroalcoólico.....	30
3.5 Determinação da concentração de 4-nerolidilcatecol no extrato hidroalcoólico.....	30
3.6 Preparo das formulações.....	33

4.4 Avaliação da lipoperoxidação em pele de camundongos irradiados com lâmpadas UV.....	53
5. Discussão.....	57
6. Conclusão.....	58
7. Referências Bibliográficas.....	67

Símbolos e Abreviaturas

ABAP.....	2,2-azobis(2-aminopropano)
BHT.....	hidroxitolueno butilado
CAT.....	catalase
c.p.m.....	contagens por minuto
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
EPR.....	ressonância eletrônica paramagnética
FPS.....	fator de proteção solar
GPx.....	glutathione peroxidase
G6PD.....	glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH.....	glutathione
GSHRd.....	glutathione redutase
GSSG.....	glutathione oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
MDA.....	malonildialdeído
MED.....	dose mínima indutora de eritema
MF.....	molécula fotossensível
MF*.....	molécula fotossensível excitada
MF _{ox}	molécula fotossensível oxidada
NADH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
¹ O ₂	oxigênio singlete
O ₂ ^{-•}	radical ânion superóxido
•OH.....	radical hidroxila

OMC.....	metoxicinamato de octila
p/p.....	peso por peso
4-NC.....	4-nerolidilcatecol
QL.....	quimiluminescência
r.p.m.....	rotações por minuto
S.....	estado fundamental da molécula fotossensível
¹ S.....	estado excitado singlete
³ S.....	estado excitado triplete
SOD.....	superóxido dismutase
TBA.....	ácido tiobarbitúrico
TBARS.....	reagentes do ácido tiobarbitúrico
TCA.....	ácido tricloroacético
UV.....	radiação ultravioleta
UVA.....	radiação ultravioleta A (320-400nm)
UVB.....	radiação ultravioleta B (290-320nm)
UVC.....	radiação ultravioleta C (220-290nm)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antioxidante de um extrato padronizado da raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq, incorporado em diadermina (creme óleo em água – O/A), sobre a pele de camundongos Hairless e avaliar esta atividade antioxidante em comparação à atividade antioxidante do α -tocoferol, incorporado na mesma base. A peroxidação lipídica foi avaliada como medida de TBARS e de quimiluminescência. Animais tratados com o extrato de *Pothomorphe umbellata* demonstraram um decréscimo significativo nos parâmetros de peroxidação lipídica, em concentrações de até 0,1% p/p de 4-nerolidilcatecol (o que equivale a uma concentração de 4% p/p de extrato) incorporado na diadermina. Em nosso modelo o decréscimo significativo destes indicadores, nos animais tratados com α -tocoferol, só foi observado em concentrações superiores a 5%.

Os resultados indicam uma potente atividade antioxidante do extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata*, sugerindo sua aplicação em formulações cosméticas.

Abstract

Antioxidants may play a significant role in ameliorating or preventing oxidative damage to skin. In this work antioxidant activity of *P. umbellata* root extract, with known concentration of 4-nerolidylcatechol, incorporated to a hydrophilic ointment in different concentrations, was evaluated on skin of Hairless mice. This antioxidant activity was compared with that of different concentrations of α -tocopherol (Sigma) incorporated in the same vehicle. Lipid peroxidation of skin homogenates was evaluated as thiobarbituric acid reactants (TBARS) and chemiluminescence (CL). Animals treated with *P. umbellata* root extract showed a decrease up to 90% in the lipid peroxidation parameters, for concentrations higher than 0.1%. Our model demonstrated a significant decrease in TBARS and CL only for higher concentrations of α -tocopherol (5 and 10% w/w). The results indicate a potent antioxidant activity of the *Pothomorphe umbellata* root extract, suggesting its application in cosmetic formulations.

1. Introdução

1.1 Espécies reativas de oxigênio

A ocorrência de radicais livres de oxigênio é uma consequência do metabolismo aeróbio. Um radical livre pode ser definido como qualquer molécula que contenha um ou mais elétrons, não pareados, ocupando orbitais atômicos ou moleculares. O oxigênio no estado fundamental é um radical livre, mas por ser um biradical e uma espécie triplete (possui dois elétrons livres nos orbitais π antiligantes) só pode reagir com moléculas de configuração eletrônica semelhante, ou seja, outros biradicaís, que são raros na natureza. Desta maneira o oxigênio fica impedido por restrição de spin, de reagir com a maioria das moléculas evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados (HALLIWELL & GUTTERGUIDE, 1985; ABDALLA, 1993).

A maior parte do oxigênio que respiramos (mais de 95%), é utilizada na mitocôndria para produção de energia através do processo de fosforilação oxidativa, mas uma pequena porcentagem, 1-3%, é desviada para produção de espécies reativas de oxigênio que são continuamente formadas em tecidos e células do nosso organismo (POMPELLA, 1997;

HALLIWELL, 1997b). O termo espécie reativa de oxigênio não inclui apenas radicais centrados no oxigênio como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), mas também derivados não radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), entre outros, sendo todos produzidos na pele exposta a radiação UV (SCHARFFETER-KOCHANKEK, 1997).

O oxigênio pode dar origem às suas espécies reativas por processos de absorção de energia ou por transferência de elétrons (ABDALLA, 1993; BLACK, 1987a).

Figura 1: Redução em etapas unieletrônicas do oxigênio molecular (BLACK, 1987a)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) são derivados da redução em etapas unieletrônicas do oxigênio molecular (BLACK, 1987a). A excitação do oxigênio no estado fundamental para seu estado singlete (1O_2) requer a absorção de energia fotoquímica (**Figura 1**).

Em condições normais as espécies reativas de oxigênio são mantidas em concentrações baixas dentro das células por existirem enzimas e outras substâncias não enzimáticas que as removem, ou que impedem a sua formação (BURTON & INGOLD, 1987).

1.2 Estresse oxidativo na pele

A pele é constituída de duas camadas, epiderme e derme, derivadas de folhetos germinativos diferentes. A camada mais fina e superficial, a epiderme, é um tecido epitelial derivado do ectoderma. Ela é constituída de um epitélio estratificado queratinizado, apresentando ainda, três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans (sistema imune) e as células de Merkel (células mecano-receptoras, geralmente presentes na pele espessa da palma da mão e dos pés). A espessura e estrutura da epiderme variam, sendo mais complexas na palma da mão e do pé. Nessas regiões, a pele atinge a espessura de até 1,5 mm e apresenta a partir da derme para a superfície, as seguintes camadas: camada basal, camada espinhosa., camada granulosa, camada lúcida e a camada córnea (**Figura 2**).

Figura 2: Diagrama de uma secção da pele (MYLADY'S, 1995)

A camada basal, também chamada de germinativa, apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. As células da camada espinhosa possuem muitas expansões citoplasmáticas que se aproximam e mantêm as células unidas através de desmossomos, estrutura importante na manutenção e coesão entre as células. A camada granulosa é formada por células que secretam grânulos de substância fosfolipídica e glicosaminoglicanas. Esta substância veda a camada de células granulosas, impedindo a passagem de algumas substâncias, e inclusive de água entre elas. Na camada lúcida, os núcleos e organelas das células começam a desaparecer. A camada córnea é constituída de células mortas e sem núcleo, contendo no seu interior a substância córnea queratina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1990).

Nas outras regiões, a epiderme é mais fina e mais simples, faltando-lhe muitas vezes as camadas granulosa e lúcida, e apresentando uma camada córnea muito reduzida (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1990; ARTHUR, 1972).

A melanina, um pigmento de cor marrom escura, é produzida no melanócito, que se encontra geralmente nas camadas basal e espinhosa da epiderme. No melanócito se encontra a enzima tirosinase essencial para a síntese de melanina. Esta enzima transforma a tirosina em 3,4-diidroxi-fenilalanina (DOPA) e também é responsável pela subsequente oxidação da DOPA a dopaquinona. A dopaquinona, após sofrer uma série de reações, incluindo polimerização, leva à formação da melanina (PROTA, 1996).

A derme consiste em um tecido conjuntivo e deriva do mesoderma (ARTHUR, 1972). Ela é formada por duas camadas, de limites pouco

distintos, a papilar, superficial, e a camada reticular, mais profunda. A superfície externa da derme é extremamente irregular, observando-se saliências (papilas dérmicas) que acompanham as reentrâncias da epiderme.

A camada papilar é constituída de tecido conjuntivo frouxo e possui fibrilas especiais de colágeno, que se inserem na membrana basal e penetram profundamente na derme. Estas fibrilas têm a função de prender a derme à epiderme. A camada reticular é mais espessa, constituída de tecido conjuntivo denso e apresenta fibras colágenas mais abundantes e espessas que a camada papilar. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, além de vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. Também são encontrados na derme as seguintes estruturas: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas e unhas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

A epiderme, particularmente sua camada de queratina, é uma barreira para microorganismos patogênicos. A queratina é quase impermeável à água, o que permite a existência de um corpo fluido em uma atmosfera freqüentemente muito seca.

A pele possui ainda outras funções como proteção do corpo contra os efeitos nocivos causados pela exposição excessiva a luz ultravioleta (UV), regulação da temperatura corporal e recepção de estímulos que provocam diversos tipos de reações conscientes. Deste modo a pele é de máxima importância na adaptação do homem ao meio (ARTHUR, 1972).

A luz solar faz parte do nosso dia-a-dia e possui efeitos biológicos benéficos à nossa saúde, como síntese de vitamina D, calor, energia, sensação de bem estar e fototerapia clínica (PAULY & PAULY, 1996). Com

o avanço do conhecimento da fotoquímica, da fotobiologia e da fotomedicina nas últimas quatro décadas, a radiação solar tornou-se motivo de preocupação para dermatologistas e é considerada o fator ambiental de maior risco para nossa pele (TEDESCO et al., 1997). O espectro solar é uma banda complexa de radiação que inclui as radiações ultravioleta UVC (comprimento de onda 220-290 nm), UVB (290-320 nm), UVA (320-400 nm), assim como luz visível e radiação infravermelha. A radiação biologicamente mais deletéria é a UVC, que afortunadamente é bloqueada pela camada de ozônio na estratosfera. As radiações UVA e UVB penetram até a superfície da terra e alcançam o nosso organismo (EMERIT, 1992).

Existem muitas evidências que fundamentam a afirmação que a banda de radiação UVB da luz solar é a principal causa do dano fotobiológico à pele. (THOMSEN et al., 1994; CONNOR & WHEELER, 1987; BISSET et al., 1989). A luz solar contém significativamente mais radiação UVA (aproximadamente 100 vezes mais) do que radiação UVB, podendo este fato ser um fator relevante para o potencial deletério da radiação UVA. Talvez a maior evidência para ligar a radiação UVA a danos fotobiológicos crônicos causados à pele vem dos salões de bronzamento artificial (LAVKER & KAYDBEY, 1997). A exposição prolongada a lâmpadas de bronzamento pode levar a alterações cutâneas geralmente encontradas em associação com o dano crônico causado por radiação, como pigmentação em furta-cor, afinamento e fragilização da pele, e raramente, uma síndrome similar àquela encontrada em pacientes com porfiria (LAVKER & KADBEY, 1997; TYRREL, 1989; HAWK, 1990). Enquanto os efeitos da radiação UVB estão principalmente limitados à epiderme, a radiação UVA penetra mais

profundamente, causando danos celulares no endotélio da derme (FUCHS, 1998). A exposição da pele às radiações UVA e UVB envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem ser parcialmente responsáveis pelo dano induzido pela radiação UV (EVELSON et al., 1997; CARBONARE & PATHAK, 1992). A pele está sempre em contato com oxigênio e é constantemente exposta à radiação ultravioleta. Por causa disto o risco de um dano fotooxidativo na pele, induzido por espécies reativas de oxigênio é bastante alto (SCHARFFETER-KOCHANNEK, 1997). O primeiro passo destas reações de oxidação fotossensível, é a absorção de luz ($h\nu$) por moléculas fotossensíveis endógenas, como porfirinas, NADPH e triptofano entre outros, levando-as a um estado excitado singlete (FOOTE, 1991; CARBONARE & PATHAK, 1992). Cruzamento intersistema com inversão de spin leva ao estado excitado triplete, de energia mais baixa, mas de maior estabilidade. A maioria das fotooxidações TIPO I e TIPO II ocorre via o estado excitado triplete (GIROTTI, 1991). Na presença de oxigênio podem ocorrer duas reações competitivas com a molécula fotossensível (**Figura 3**). Estas reações são chamadas de TIPO I e TIPO II (FOOTE, 1991). No caso das reações TIPO I, uma molécula energeticamente excitada (MF^*) abstrai um átomo de hidrogênio de uma molécula disponível (substrato ou solvente) levando à formação de um radical livre. Este por sua vez pode reagir com oxigênio molecular do meio, iniciando um processo de autooxidação (RIEGER, 1989).

Nas reações TIPO II, a molécula fotossensível energeticamente excitada reage com oxigênio molecular formando oxigênio singlete.

Em alguns casos pode ocorrer a transferência de um elétron da molécula fotossensível para uma molécula de oxigênio, levando a formação do ânion radical superóxido (LEE & ROGERS, 1987). Esta reação é ocasionalmente descrita como um processo TIPO I, por levar à formação de um radical livre. Alguns autores preferem classificar as reações TIPO I como reações que envolvem uma via radicalar, e as reações TIPO II como reações que envolvem transferência de energia da molécula fotossensível para o oxigênio molecular do meio e para outras moléculas (VIDOCZY, 1992; FUCHS, 1998).

Figura 3: Esquema das reações de fotossensibilização Tipo I e Tipo II, (FOOTE, 1991)

MF – Molécula fotossensível

MF* - Molécula fotossensível excitada

MF_{ox} - Molécula fotossensível oxidada

Os radicais formados nas reações indicadas na **Figura 3** são passíveis de direta ou indiretamente danificar ácidos nucleicos, proteínas e fosfolípidios de membrana (PARAT et al., 1995). Este dano oxidativo pode ser um iniciador na patogênese do câncer de pele e do fotoenvelhecimento cutâneo (WEBER et al., 1997).

O fotoenvelhecimento é caracterizado por uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais que se manifestam, em uma pele habitualmente exposta ao sol, com o envelhecimento cronológico (CARBONARE & PATHAK, 1992). Pesquisas recentes têm demonstrado que pele fotoenvelhecida e pele cronologicamente envelhecida constituem processos distintos. Diferenças entre as duas condições foram revistas por Kligman (KLIGMAN, 1991). O aspecto básico do fotoenvelhecimento é o dano às fibras elásticas, ao colágeno e às glicosaminoglicanas da derme. A microvascularização e outros elementos estruturais da pele também podem estar alterados (KLIGMAN, 1991).

Macroscopicamente, a pele fotoenvelhecida se apresenta como uma superfície seca, nodular e com um aspecto que lembra couro, com rugas profundas, sulcos acentuados, bolsas e saliências, enquanto que o envelhecimento cronológico resulta em rugas finas, afinamento e flacidez da pele.

Microscopicamente, a principal alteração do fotoenvelhecimento é a hiperplasia do tecido elástico da derme, o que pode levar a uma desorganização completa do tecido, conhecida como elastose solar. Em contraste o envelhecimento cronológico induz apenas um modesto aumento no número e espessura das fibras elásticas. O colágeno sofre alterações

mínimas com o envelhecimento cronológico, enquanto que o fotoenvelhecimento leva a perda de feixes de colágeno. A substância que forma a matriz dérmica, composta de proteoglicanas e ácido hialurônico aumenta muito na pele fotoenvelhecida enquanto que na pele pouco exposta ao sol esta substância tende a diminuir com a idade (GILCHREST et al., 1983).

Em ambos os processos de envelhecimento existe envolvimento de radicais livres (EMERIT, 1992).

A fim de neutralizar os efeitos lesivos dos radicais livres, organismos aeróbicos desenvolveram uma variedade de mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos, que também estão presentes na pele (PELLE et al., 1990). Compostos capazes de inibir reações de radicais livres são usualmente definidos como antioxidantes (SIES, 1985).

A extensão do dano causado por radicais livres parece aumentar com a idade devido ao aumento da produção de radicais livres e/ou decréscimo da habilidade do sistema antioxidante de lidar com estas alterações (BLACK, 1987a).

O desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e os mecanismos antioxidantes é definido como estresse oxidativo (SIES, 1985).

1.3 Fotoperoxidação Lipídica

A geração de espécies reativas de oxigênio induzida por UV, requer a presença de oxigênio molecular, uma molécula fotossensível e luz em

comprimento de onda adequado para provocar a excitação da molécula fotossensível (**Figura 3**).

Um dos exemplos mais significativos de reações de radicais livres com biomoléculas é a peroxidação lipídica, termo utilizado para descrever a degradação oxidativa de fosfolipídios, colesterol e outros lipídios insaturados (com a correspondente quebra de hidroperóxidos lipídicos) (GIROTTI, 1990).

Relacionando as reações de fotossensibilização TIPO I e TIPO II descritas por Foote (FOOTE, 1991) com o processo de lipoperoxidação, Girotti (GIROTTI, 1990), propôs o seguinte esquema (**Figura 4**):

Figura 4: Processo de lipoperoxidação desencadeado por reações de fotossensibilização. A molécula fotossensível está representada por S (estado fundamental), ${}^1\text{S}$ (estado excitado singlete), ${}^3\text{S}$ (estado excitado tripleto). Lipídeos poliinsaturados estão representados por LH. A iniciação TIPO I está exemplificada pela transferência de LH para ${}^\bullet\text{OH}$ (a) ou de LH para ${}^3\text{S}$ (c). As reações TIPO II estão representadas pela adição de ${}^1\text{O}_2$ a LH (b) (GIROTTI, 1990).

Como está representado na **figura 4**, a absorção de um fóton por uma molécula fotossensível a converte do estado fundamental (S) para o estado excitado singlete (1S). Cruzamento intersistema com inversão de spin leva ao estado excitado tripleto (3S), de energia mais baixa, mas de maior estabilidade. A maioria das fotooxidações TIPO I e TIPO II ocorre via o estado excitado 3S (GIROTTI, 1991)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o primeiro radical formado na redução do oxigênio molecular pelo ânion radical da molécula fotossensível. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser formado a partir da dismutação do ânion superóxido (TIEN et al., 1982). Individualmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 reagem relativamente devagar com alvos biológicos, como aminoácidos e lipídios insaturados, mas na presença de íons de metais de transição que sofrem ciclo redox, estas espécies podem reagir para produzir o radical hidroxila ($\cdot OH$), um forte oxidante (GIROTTI & THOMAS, 1984) (**Figura 4a**).

A redução do ânion superóxido ocorre via o ciclo Haber/Weiss catalisado por metal (Eq. 1 e 2). A reação 2 é conhecida como reação de Fenton.

(BLACK, 1987a)

O radical $\cdot OH$ reage com a maioria das ligações carbono-hidrogênio com constantes de velocidades relativamente altas, e um dos mecanismos

mais comuns de reação é a abstração de um átomo de hidrogênio levando a formação de um radical orgânico

Na reação TIPO II o oxigênio singlete é gerado através da transferência de energia do estado excitado da molécula fotossensível 3S para uma molécula de oxigênio, formando oxigênio singlete. Este pode reagir diretamente com ácidos graxos insaturados levando à formação de hidroperóxidos (**Figura 4b**).

A reação de fotossensibilização TIPO I é iniciada pela transferência de um elétron ou átomo de hidrogênio do substrato para a molécula fotossensível 3S (FOOTE, 1991). Os produtos resultantes desta transferência são radicais alquila de lipídios ($L\cdot$) e o ânion radical da molécula fotossensível ($S^{\cdot-}$) (GIROTTI, 1990).

O radical alquila tende a ser estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. A reação deste dieno com oxigênio leva a formação de um radical peroxila ($LOO\cdot$). Radicais peroxila têm a capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outras moléculas de lipídios, esta é a chamada fase de propagação da peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERGUIDE, 1985). Esta reação desencadeia uma nova rodada de peroxidação similar àquela observada na autoxidação lipídica não fotoquímica. As reações seguintes são limitadas pelo oxigênio molecular disponível, substratos lipídicos reativos e antioxidantes presentes no meio (GIROTTI, 1990).

1.4 Antioxidantes

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 & GUTTERGUIDE, 1985). Constituem uma gama de substâncias diferentes, que atuam em diferentes níveis, protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos danosos de processos ou reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Os mecanismos de defesa antioxidantes incluem:

- 1) Seqüestro de espécies reativas de oxigênio e seus precursores
- 2) Ligação a íons de metais de transição, utilizados como catalisadores nas reações que levam à formação de espécies reativas de oxigênio
- 3) decomposição de peróxidos, transformando-os em produtos não radicalares, como álcool.
- 4) Reparo de macromoléculas e renovação celular (HALLIWELL,1997a; TEDESCO,1997).

Um grande número de sistemas protege os sistemas biológicos contra o estresse oxidativo, incluindo antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos polares ou apolares, como as vitaminas C e E respectivamente. Os antioxidantes também podem ser classificados como primários e secundários, segundo seu mecanismo de ação.

O sistema de defesa primário é formado por substâncias que bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar como enzimas

antioxidantes, quelantes e proteínas que transportam metais, como a transferrina, substâncias não enzimáticas que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete. O sistema de defesa secundário é formado por compostos que bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, seqüestrando radicais intermediários (ABDALLA, 1993).

Na tabela 1 estão relacionados alguns exemplos de antioxidantes do sistema de defesa antioxidante:

Tabela1: Sistema de defesa antioxidante

Tipo de antioxidante	Antioxidantes primários	Antioxidantes secundários
Enzimas antioxidantes	superóxido dismutase catalase glutathione peroxidase	
Quelantes e proteínas	EDTA transferrina ceruloplasmina	
Substâncias não enzimáticas	urato ascorbato bilirrubina carotenóides	tocoferóis tocotrienóis flavonóides antioxidantes sintéticos

O corpo humano não sintetiza seus antioxidantes em excesso. Parece haver uma espécie de equilíbrio no corpo humano entre a produção de espécies reativas e os níveis de defesa antioxidante (HALLIWELL, 1997b)

1.5 Sistemas antioxidantes da pele

A pele está equipada com uma variedade de antioxidantes como sistemas enzimáticos, antioxidantes de baixo peso molecular polares e apolares capazes de inibir o dano oxidativo (FUCHS et al., 1989a). Os constituintes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GSHRd) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD). Entre os constituintes não-enzimáticos estão as vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno e ácido ascórbico), minerais (manganês, selênio, cobre e zinco) e alguns compostos endógenos (glutathione, melanina) que neutralizam direta ou indiretamente, as espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL, 1987).

As principais enzimas antioxidantes identificadas na pele são a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione reductase e a glutathione peroxidase. Um esquema simplificado das reações enzimáticas envolvendo estas enzimas está representado na **Figura 5**:

Figura 5 : Esquema representando as principais reações enzimáticas do sistema antioxidante da pele (FREEMAN & CRAPO, 1982).

A SOD, uma metaloproteína, 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 (STEENVOORDEN et al., 1997). A glutatona peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutatona reduzida (GSH) levando à formação de glutatona oxidada (GSSG) e água. A continuidade deste ciclo catalítico depende da redução da GSSG pela enzima glutatona redutase na presença de NADPH, formado na via das pentoses (BLACK, 1987a). A catalase é outra enzima que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e comparada a GPx é considerada de menor importância como enzima antioxidante, por ter menor afinidade pelo peróxido de hidrogênio (STEENVOORDEN et al., 1987; ABDALLA, 1993).

livres, os quais são mantidos em baixas concentrações nas células (STEENVOORDEN et al., 1997).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico (ABDALLA, 1993). A GSH seqüestra radicais hidroxila e oxigênio singlete através da doação de átomos de hidrogênio levando à formação de glutathiona reduzida (GSSG) (STEENVOORDEN et al., 1997; ABDALLA, 1993). No seu papel de proteção da pele a glutathiona pode atuar como antioxidante por si, ou como um substrato para a GPx (**Figura 5**) (CONNOR & WHEELER, 1987).

Como a maioria dos radicais livres gerados na pele o são em consequência da exposição à luz, o bloqueio efetuado pelos pigmentos de melanina representa uma importante defesa à oxidação (EMERIT, 1992). A melanina absorve fótons na região UV-visível do espectro solar atuando como um filtro natural (TEDESCO et al., 1997), além de possuir atividade antioxidante seqüestrando radicais de oxigênio (EMERIT, 1992). Um trabalho recente caracterizou a melanina como um filtro solar clássico muito pobre, por demonstrar pouco ou nenhum fator de proteção solar (FPS) em concentrações que sejam biológica ou comercialmente interessantes e atribuiu a ação de proteção da melanina mais à sua capacidade de neutralizar os radicais livres produzidos na pele pela exposição à luz solar, do que à sua característica de filtro solar (CHEDECKEL, 1998). Mesmo possuindo estas características protetoras em relação à radiação ultravioleta, os precursores da melanina são geralmente considerados fototóxicos (SMITZ et al., 1995). O dano causado ao DNA por radicais derivados da melanina é limitado pela localização da melanina em vesículas

intracelulares, os melanossomos. Isto previne o alcance das espécies reativas ao DNA, fazendo com que o efeito protetor prevaleça (STEENVOORDEN et al., 1997). Como a melanina fica armazenada nos melanossomos ela provavelmente não se encontra disponível para seqüestrar radicais fora do mesmo, não protegendo contra insultos oxidativos à parede celular e ao citoplasma (EMERIT, 1992).

1.6 Fotoenvelhecimento e Antioxidantes

O estresse oxidativo crônico, como ocorre na vida moderna devido à excessiva exposição ao sol e ao aumento da poluição atmosférica, pode justificar uma suplementação com antioxidantes, a fim de retardar o processo de envelhecimento cutâneo (EMERIT, 1992). A prevenção do dano oxidativo tem sido objeto de inúmeras investigações. Uma das metas é desenvolver métodos farmacológicos e dietéticos para prevenir ou atenuar este processo (SAVOURÉ et al., 1996). Agentes capazes de intensificar os mecanismos naturais de defesa contra radiação solar, por exemplo melanização e atividade antioxidante, parecem ser a grande promessa de desenvolvimento de futuros agentes fotoprotetores sistêmicos (BLACK, 1987 b,c). A perda de antioxidantes naturais presentes na pele, como resultado da irradiação por ultravioleta, pode desencadear danos peroxidativos sob a influência de espécies reativas de oxigênio nos lipídios insaturados. Este problema vem sendo estudado repetidamente e os pesquisadores concluíram que a aplicação tópica de antioxidantes pode reduzir estes efeitos adversos (RIEGER & PLAINS, 1993). Bisset (BISSET et al., 1990)

estudou o efeito protetor de antioxidantes aplicados topicamente em camundongos Hairless expostos a doses subcrônicas de radiação UV. Dos antioxidantes testados (α - tocoferol, ác. ascórbico, galato de propila e Trolox® [6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico]) o α - tocoferol, utilizado na concentração de 5%, foi o antioxidante mais eficiente, tanto no que se refere à atividade antioxidante, como à boa estabilidade e fácil incorporação nas formulações testadas. O ácido ascórbico, também empregado na concentração de 5%, demonstrou uma boa atividade antioxidante, mas por ser bastante instável seu uso fica limitado a formulações cosméticas de maior complexidade. Além disto sua atividade antioxidante é dependente de sua concentração (WAYNER et al., 1986) e em altas concentrações o ácido ascórbico pode ser irritante para pele. Em baixas concentrações (0,5 mM) o efeito pró-oxidante do ácido ascórbico é favorecido. O ácido ascórbico e o radical ascorbila tem o potencial de gerar espécies pró-oxidantes na presença de íons de metais de transição como ferro e cobre (GIROTTI et al, 1985).

Um outro antioxidante testado foi o palmitato de ascorbila, que é menos irritante para pele que o ácido ascórbico, é estável por longos períodos de tempo e devido à sua alta lipofilicidade possui uma rápida absorção pela epiderme (FUCHS, 1998). Entretanto, seu efeito fotoprotetor não é tão eficiente quanto o do α - tocoferol e do ácido ascórbico (BISSET et al., 1990).

Apesar da melanina funcionar como um filtro solar, quando comparada aos filtros solares clássicos, como o metoxicinamato de octila (OMC), demonstrou ser um filtro solar muito fraco na prevenção de eritema

(CHEDECKEL, 1998). Além disto, a concentração de melanina necessária para que ela fosse efetiva como filtro solar teria que ser maior que 1%, o que resultaria em uma formulação muito escura, de baixa aceitação comercial. Chedeckel (CHEDECKEL, 1998) concluiu que seria mais interessante utilizar a melanina como princípio ativo antioxidante na concentração de 0,005 – 0,01% associada a outros antioxidantes em formulações com filtros solares clássicos, como OMC e dióxido de titânio.

A atenção da indústria de cosméticos também tem se voltado para o uso de enzimas antioxidantes como princípios ativos em formulações para o combate aos efeitos danosos causados por radicais livres. Apesar de existirem poucos estudos de estabilidade, eficácia e biodisponibilidade, Fox (FOX, 1994) cita o registro de uma patente japonesa para cosméticos contendo 0.0001 a 1,0% de glutathione peroxidase e 0,00001 a 0,1% de cobre e/ou selênio, para evitar a formação de peróxidos e outra patente da L'Oréal para o uso de superóxido dismutase em formulações cosméticas.

Os antioxidantes vegetais também são de grande interesse para pesquisadores por representarem uma fonte de novas moléculas antioxidantes.

A atividade antioxidante de muitas enzimas e metabólitos secundários (ácido cafeico, curcumina, canferol, entre outros) de plantas superiores foi comprovada em experimentos "in vitro", através de sua capacidade de inibir ou seqüestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (LARSON, 1988).

O Brasil possui uma flora extremamente rica em plantas medicinais com grande potencial de fornecer agentes antioxidantes.

Estudos “in vitro” demonstraram a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pothomorphe umbellata* (BARROS et al., 1996).

A *Pothomorphe umbellata*, planta que pertence à família Piperaceae, é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como: insuficiência renal hepática, má digestão, bronquite asmática e externamente no tratamento de queimaduras e feridas comuns (MORAES, 1983).

A Farmacopéia Brasileira incluiu a espécie vegetal *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq sob o nome oficial de Pariparoba (SILVA, 1926). Popularmente ela também é conhecida como capeba, caapeba, caapeba-do-norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira, malvaíscio (PANIZZA, 1998).

A palavra pariparoba, aparentemente foi *periparoba* na sua grafia primitiva. *Pere*, segundo Montoya, citado por Riedel (RIEDEL, 1941), é baço, parte do fígado; *Peré* é sinal ou mancha de sarna; *Perebí*, indistintamente sinal ou parte do fígado. *Pereb* é cicatriz, ferida. A expressão derivada do Tupi *Pa* significa acabar e *Rob* (irobá), amargo. Segundo Riedel, Periparoba poderia significar amargo que acaba com as feridas (RIEDEL, 1941). O nome caapeba significa *caa* folha e *peba* larga (PANIZZA, 1998). Nossos índios denominavam as *Pothomorphes* desta maneira por terem as folhas chatas e largas (RIEDEL, 1941).

Foto1: Folha de *Pothomorphe umbellata*

Foto 2: Inflorescência de *Pothomorphe umbellata*

Pothomorphe umbellata (sinonímia: *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Piper umbellata* L. e *Piper hilarianum* Stend.) é uma espécie arbustiva que atinge a altura de 2 a 3 m, com folhas ovais de cerca de 20 a 25 cm de largura por 18 a 20 cm de comprimento, pecioladas, arredondadas e cordiformes (KIJJOA, 1980b, MORAES, 1983). A inflorescência é uma umbela de espigas localizada nas axilas foliares. O fruto é uma baga pequena, comestível, muito procurado pelas aves. Esta planta se reproduz por sementes, de preferência em solos úmidos, sombreados e férteis e em terrenos cultivados (PECKOLT, 1941). As raízes são adventícias fasciculadas e partem de uma cepa globosa. Medem freqüentemente de 10 a 15 cm de comprimento por 5 a 10 mm de diâmetro. São irregulares subcilíndricas de coloração pardo acinzentadas apresentando com freqüência regiões com aspecto tuberculóide inflados e tortuosos (MORAES, 1983)

É de distribuição pantropical e originária da América (KIJJOA, 1980b). Ocorre com frequência nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (PANIZZA, 1998).

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). Consta, ainda, da primeira edição do Código Farmacêutico Brasileiro o extrato fluido de pariparoba, o xarope de pariparoba e o xarope desobstruente e ferruginoso de pariparoba (MORAES, 1983).

A atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* foi avaliada através de testes “in vitro”. Homogenatos de cérebro de ratos foram incubados com alíquotas crescentes de extrato hidroalcoólico bruto de raiz, ou 4-nerolidilcatecol/ α -tocoferol por uma hora em banho com agitação à 37°C. Malonildialdeído e quimiluminescência foram os parâmetros empregados para avaliar a autooxidação espontânea do homogenato de cérebro. Os resultados indicaram uma importante atividade inibidora da lipoperoxidação do extrato hidroalcoólico da raiz, atribuída a presença do 4-nerolidilcatecol (BARROS et al., 1996). Para este composto foi proposta a seguinte estrutura (**Figura 7**):

(KIJJOA, 1980a).

Figura 7: 4-nerolidilcatecol

O 4-nerolidilcatecol, quando isolado do extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata* demonstrou, num ensaio "in vitro", ter atividade antioxidante aproximadamente vinte vezes maior que a do α -tocoferol (BARROS et al., 1996).

Entretanto, em outro ensaio, o extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata* mostrou um potencial antioxidante significativamente maior que o do composto isolado. Isto foi realizado através da monitoração da intensidade de quimiluminescência de radicais peroxila derivados da termólise de 2,2'-azobis (2- amidinopropano) (ABAP), sugerindo a presença de compostos adicionais com atividade antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1997). O potencial antioxidante pode ser determinado através de medidas de tempo de indução na oxidação de uma dispersão lipídica, exposta a uma fonte geradora de radicais livres, com uma taxa constante e conhecida de produção destes radicais, em condições aeróbicas (LISSI et al., 1995).

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivos:

- a) Estudar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq na diminuição da lipoperoxidação espontânea e induzida por radiação ultravioleta em pele de camundongos Hairless.
- b) Determinar a atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* relativamente ao α -tocoferol no mesmo modelo experimental.

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos

Liofilizador Edwards do Brasil, moinho de facas e martelo, tamis de malha 40 mesh, centrífuga refrigerada Hitachi CR20-B2, agitador orbital Newbrunswick MG76, espectrofotômetro Incibrás MF-200, espectrofotômetro de fluorescência Perkin-Elmer 204, HPLC Consta Metric 3200 acoplado a uma coluna Phenomenex RP18 (4.6X250mm) 5 μ m, detector espectrofotométrico Waters 481-LC, integrador Waters 745B, homogenizadores ULtra Turax e Potter-Elvehjem, cintilador Packard 1900TR, lâmpada UVA Philips TLK 0,9 40W, lâmpada UVA Philips TLK 0,5 40W, lâmpada Solar ULtraviolet Simulator 600 (Solar Light Co.), radiômetro International Light (Newburyport, MA, USA) modelo IL390B, medidor de eritema de UV e intensidade de UVA 3D - 600 (Solar Light Co.).

3.2 Reagentes

Ácido tiobarbitúrico (TBA), α -tocoferol e hidroxitolueno butilado (BHT) foram de procedência sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). A diadermina* empregada foi produzida pela Drogaderma Farmácia de Manipulação Ltda.. Os demais reagentes foram de procedência p.a. Merck (Darmstadt, Germany).

O 4-nerolidilcatecol, utilizado como padrão de referência foi isolado pela doutoranda Kennia Rocha Rezende no laboratório de fitoquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

3.3 Coleta e processamento das raízes de *Pothomorphe umbellata*

As raízes de *Pothomorphe umbellata* foram coletadas nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e uma amostra encontra-se depositada no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, com o nome de Sonia e Cris nº01.

O material coletado foi seco em estufa com circulação de ar e temperatura de 50°C e estocado em local seco. Por ocasião do uso, as raízes foram moídas em moinho de facas e martelo e passadas por tamis de malha 40 mesh.

* Diadermina Drogaderma	
Ácido esteárico	25%
Trietanolamina	2%
Glicerina	13%
Água	q.s.p.100%
Nipagin/ Nipazol	q.s

3.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação etanol:água (1:1) até esgotamento da droga, segundo processo A da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959) e posteriormente concentrado a vácuo e o resíduo aquoso liofilizado em liofilizador Edwards do Brasil.

3.5 Determinação da concentração de 4-nerolidilcatecol no extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata*

A concentração de 4-nerolidilcatecol no extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellata* foi determinada empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho. O sistema cromatográfico foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Waters, modelo 481-LC, em comprimento de onda de 282nm, coluna Phenomenex RP18 (4.6X250mm) 5 μ m. O solvente utilizado foi metanol:água 9:1 com um fluxo 0,8 mL/min. Na **figura 8** estão representados os cromatogramas do padrão de 4-nerolidilcatecol na concentração de 0.0125 μ g/ μ L de metanol:água 9:1 e do extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0.35 μ g/ μ L no mesmo solvente.

Figura 8: Cromatogramas do padrão de 4-nerolidilcatecol na concentração de 0.0125µg/µL de metanol:água 9:1 e do extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata* na concentração de 0.35µg/µLno mesmo solvente.

3.5.1 Curva padrão de 4-nerolidilcatecol

Tabela 2: Área do pico (média de 3 determinações) de soluções de diferentes concentrações de 4-nerolidilcatecol a 282nm.

Concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Área do pico	Desvio padrão
0.0452	1544367,33	37267,26
0.0212	825180,33	12057,43
0.0116	409164,00	7572,57
0.00280*	114817,00	-----

*(uma determinação)

Curva de padronização do 4-NC

Figura 9: Gráfico da reta de regressão linear da área do pico do padrão de 4-nerolidilcatecol em função da concentração.

Através do cálculo da regressão linear dos dados da tabela 2 foi obtida a equação da reta (**figura 9**). Para o extrato seco da raiz de *Pothomorphe umbellata* a $0.35\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em metanol:água 9:1, em 282nm a área do pico (média de três determinações) foi 278568, o que no extrato equivale a uma concentração de 2,35% de 4-nerolidilcatecol.

3.6 Preparo das formulações

O veículo escolhido foi uma emulsão do tipo O/A, conhecida como diadermina. Este tipo de formulação apresenta boa penetração na pele, com grande poder emoliente e hidratante (STORPIRTIS, 1995), além de garantir uma fácil incorporação do extrato e uma boa distribuição do princípio ativo sobre a pele do camundongo. O extrato seco liofilizado foi pesado, triturado e dissolvido em volume mínimo de etanol absoluto e incorporado em uma quantidade de diadermina previamente pesada, de maneira que o creme contivesse a concentração desejada de 4-nerolidicatecol. Para o preparo da diadermina adicionada de α -tocoferol empregou-se uma solução padrão estoque de α -tocoferol a 5% em etanol:metanol de 1:1. Um volume conhecido desta solução foi evaporado com nitrogênio líquido e o resíduo incorporado a uma quantidade previamente pesada de diadermina de modo a obter-se concentrações de 0,2%, 2%, 5% e 10% de α -tocoferol no creme.

3.7 Medida da dose de radiação recebida pelos animais para as diferentes lâmpadas empregadas no ensaio.

A potência da radiação emitida pelas lâmpadas TLK 0,9 e TLK 0,5, 40W, Philips, a uma distância de 20 cm do dorso dos animais foi monitorada com um radiômetro International Light (Newburyport, MA, USA) modelo IL390B, pelo Departamento de Aplicações Industriais da Radiação, IPEN. A potência da lâmpada Solar ULtraviolet Simulator 600 (Solar Light Co.) gentilmente emprestada pela Industria e Comércio de Cosméticos Natura Ltda., foi estimada através de informações obtidas pelo fabricante e determinação da MED (minimal eritemogenic dose=dose mínima indutora de eritema) com um medidor de eritema por UV e intensidade de UVA, modelo 3D-600 (Solar Light Co.). O resultado das determinações encontra-se resumido na tabela 3:

Tabela 3: Determinação da dose emitida e características das lâmpadas utilizadas no experimento.

Lâmpada	Comprimento de onda (nm)	Distância do dorso dos animais	Dose	MED
TLK 0,9 40W (Philips)	320-390	20cm	5J/cm ² em 2h de irradiação	não provocou eritema
TLK 0,5 40W (Philips)	300-460	20cm	4,05J/cm ² em 2h de irradiação	não provocou eritema
Solar ULtraviolet Simulator (Solar Light Co.) 150W	290-420	0cm	25J/cm ² em 30 min de irradiação	10 MED
Solar ULtraviolet Simulator (Solar Light Co.) 150W	290-420	0cm	8,3J/cm ² em 10 min de irradiação	3,5MED

3.8 Tratamento dos animais

3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante

Foram utilizados, em grupos separados, camundongos Hairless fêmeas e machos HRS/J, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, Me, oriundos de matrizes doadas pela Johnson e Johnson ao biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Foto 3: Camundongo Hairless tratado com creme de *Pothomorphe umbellata* (0,1% de 4-nerolidilcatecol), no lado esquerdo do dorso, utilizando-se a cauda como referencial.

Os animais com 10 semanas de idade receberam tratamento tópico 18h antes do sacrifício. A quantidade de creme aplicada no dorso dos animais foi de $0,08\text{g/cm}^2$ e um contentor de metal (**foto 3**) foi utilizado para evitar que os animais lambessem o creme aplicado.

Em todos os experimentos os animais foram divididos em quatro grupos:

- a) grupo controle (sem tratamento)
- b) grupo controle diadermina (tratado somente com a diadermina)
- c) grupo α -tocoferol (tratado com α -tocoferol em diferentes concentrações)
- d) grupo *Pothomorphe umbellata* (tratado com extrato seco liofilizado incorporado em diferentes concentrações na diadermina)

Um primeiro experimento foi realizado para avaliar a atividade antioxidante do extrato de *Pothomorphe umbellata* relativamente ao α -tocoferol. Para tanto foram preparados cremes contendo 0,2% de 4-nerolidilcatecol (8% de extrato seco liofilizado) e 0,2% de α -tocoferol.

Neste experimento avaliou-se também a influência do fator sexo na resposta ao tratamento, uma vez que foram empregados camundongos machos e fêmeas. Isto foi feito devido à dificuldade de se obter animais sem pêlo e do mesmo sexo por ninhada, já que se tratam de camundongos isogênicos que podem nascer com ou sem pêlo.

Outro grupo de experimentos foi realizado empregando-se animais de ambos os sexos que foram tratados com α -tocoferol incorporado em diadermina em concentrações de 0,2%, 2%, 5% e 10%.

Um terceiro experimento avaliou a atividade antioxidante de cinco concentrações diferentes de extrato de *P. umbellata*, incorporado na diadermina de maneira que o creme contivesse as seguintes concentrações de 4-nerolidilcatecol 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2% e 2%.

3.8.2 Avaliação do efeito causado pela radiação UV sobre a pele dos camundongos Hairless.

Os camundongos foram anestesiados com uma dose única de Nembutal® (50mg/kg de peso) e tratados conforme descrito na **tabela 3**.

Os animais irradiados com as lâmpadas TLK0.9, TLK 0.5 (EVELSON et al., 1997) e Ultraviolet Simulator (SHINDO et al., 1994), foram sacrificados imediatamente após o período de irradiação.

Um outro grupo de animais foi irradiado durante 10 minutos com a lâmpada Solar Ultraviolet Simulator e sacrificado 24 horas após o período de irradiação. Este ensaio foi realizado, por existirem dados na literatura demonstrando um pico na produção de TBARS 24h após o período de irradiação (KOBAYASHI et al., 1996 a,b; HASEGAWA et al., 1992).

3.9 Avaliação da lipoperoxidação

A lipoperoxidação do homogenato de pele foi avaliada pela produção de malonildialdeído, através da medida de TBARS (thiobarbituric acid reactants substance=reagentes do ácido tiobarbitúrico), e de quimiluminescência (QL) espontânea.

No caso de algumas patologias, como fotoenvelhecimento cutâneo, múltiplos alvos, incluindo as proteínas, podem estar envolvidos. Por isto ambas as medidas (TBARS e QL) foram expressas por grama de tecido,

pois esta base de referência reflete todos os constituintes celulares (SHINDO et al., 1993).

3.10 Obtenção do homogenato de pele

Os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. A pele foi separada e lavada com tampão 140 mM NaCl 40 mM fosfato de sódio, pH 7,4 (4°C). Depois de remover a subcutis e a fascia com uma gaze, a superfície da pele foi cortada em pedaços pequenos e homogeneizadas no tampão 140 mM NaCl 40 mM fosfato de sódio, pH 7,4 (4°C), na proporção 1:4, em um homogenizador ULtra Turax e em seguida no homogenizador Potter-Elvehjem. O homogenato foi então centrifugado durante 20 min a 1000g, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a avaliação da lipoperoxidação.

3.11 Avaliação da lipoperoxidação através da medida de TBARS

3.11.1 Medida espectrofotométrica

Esta medida foi feita incubando-se erlenmeyers de 25 mL contendo 1,5 mL do sobrenadante do homogenato com 3,5 mL de tampão 0.1M fosfato de potássio pH 7,0 durante duas horas a 37°C em um agitador orbital Newbrunswick . Após este tempo, transferiu-se 1mL do incubado para tubos de centrifuga e adicionou-se 1 mL de TCA 5%. Imediatamente antes da

incubação retirou-se 1mL do homogenato diluído que foi também adicionado de 1mL de TCA 5% (tempo zero). Após centrifugação a 1000g durante 20min, 1mL do sobrenadante foi adicionado a tubos contendo 1mL de TBA 0,67%. Foi preparado um branco adicionando-se 1 mL de água destilada a 1mL de TBA 0,67%. Estes tubos de ensaio permaneceram 20 min em banho-maria fervente. Após este período os tubos foram colocados 20 min em banho de gelo e a absorbância foi lida em Espectrofotômetro Incibrás UV/VIS MF-200, em 535nm (JUNQUEIRA et al., 1986). A concentração de TBARS na amostra (tempo 2 horas) foi obtido descontando-se da leitura da amostra incubada o valor da absorbância da amostra não incubada e dividindo-se este valor pelo coeficiente de absorção molar 156 L/ mmol*cm considerando-se os fatores de diluição.

3.11.2 Medida espectrofluorimétrica

Homogenato de pele (1mL) foi adicionado a 1mL de HCl 0,1N, 0,3mL de ácido fosfotúngstico 10% e 1mL de TBA 0,67%. BHT foi adicionado a uma concentração final de 0,1%. A mistura foi aquecida por 60 min em banho-maria fevente. TBARS foram extraídos em 5mL de n-butanol. Depois de uma centrifugação a 300g por 10 min a fluorescência da fase n-butanol foi medida em espectrofotômetro de fluorescência a 515nm (emissão) e 553nm (extinção). Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (EVELSON et al., 1997).

3.12 Medida da lipoperoxidação através da quimiluminescência

Os ensaios de quimiluminescência do homogenato de pele foram realizados incubando-se 1 mL do sobrenadante do homogenato com 3,5mL de tampão 140mM NaCl 40mM fosfato de sódio pH 7,4 por trinta minutos. Deste incubado foram retirados 3 mL para a medida de quimiluminescência efetuada em um contador de cintilação no canal fora de coincidência a 25°C (BOVERIS et al., 1983). A amostra permaneceu 50 min no aparelho e as medidas foram expressas em cpm/g de pele. Um exemplo do padrão de emissão dos homogenatos de pele está representado na **figura 10**:

Figura 10: Perfil de emissão de quimiluminescência de homogenatos de pele de um animal controle (C), dois animais tratados com α -tocoferol 2% (a-T e a-T2) e um animal tratado com o extrato de *Pothomorphe umbellata* (P.u.), incorporado em uma concentração de 0,2% de 4-nerolidilcatecol.

3.13 Análise Estatística

Empregamos a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para Múltiplas Comparações, para a localização dos contrastes. Para os ensaios de irradiação foi utilizado o teste t de Student. Estes testes foram realizados através do programa GraphPad InStat (Software V2.01,1993)

Para avaliação da interação sexo versus tratamento foi utilizada a ANOVA de duas vias, utilizando-se o programa PRISMA.

4. Resultados

4.1 Comparação entre atividade antioxidante do extrato de *Pothomorphe umbellata* e α -tocoferol incorporado à diadermina

Tabela 4: Produção de TBARS na pele de camundongos machos submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Número de animais	Média e desvio padrão (nmols de TBARS/ g de pele)
controle (sem tratamento)	10	71,63±20,66
diadermina	9	80,37±19,46
α -tocoferol, incorporado a 0,2% na diadermina	9	74,25±22,27
extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> incorporado a 0,2% de 4-nerolidilcatecol na diadermina	7	2,71±2,59

A análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias dos grupos controle, diadermina e α -tocoferol 0,2%, apresentados na tabela 4. A análise também indicou que houve diferença significativa entre as médias dos grupos controle, diadermina e α -tocoferol e

a média do grupo tratado com o extrato de *Pothomorphe umbellata* ($p < 0,0001$), $F = 20,084$ e $df = 3/30$.

Tabela 5: Produção de TBARS na pele de camundongos fêmeas submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Número de animais	Média e desvio padrão (nmols de TBARS/ g de pele)
controle (sem tratamento)	9	77,94±21,94
diadermina	8	88,19±18,18
α -tocoferol, incorporado a 0,2% na diadermina	7	68,69±17,91
extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> incorporado a 0,2% de 4-nerolidilcatecol na diadermina	7	2,61±2,01

A análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre as médias dos grupos controle, diadermina e α -tocoferol 0,2%, apresentados na tabela 5. A análise também indicou que houve diferença significativa entre as médias dos três grupos citados anteriormente e a média do grupo tratado com o extrato de *Pothomorphe umbellata*: $p < 0,0001$, $F = 36,69$ e $df = 3/26$.

Figura 11: Representação gráfica dos dados apresentados nas tabelas 4 e 5. Produção de TBARS na pele de camundongos machos e fêmeas submetidos a diferentes tratamentos. Os valores estão expressos em média (colunas) e desvio padrão (barras de erro y) para C (grupo controle), D (grupo diadermina) a-T (grupo base contendo 0,2% de α -tocoferol e P u (grupo base contendo o extrato padronizado de *Pothomorphe umbellata*, na concentração de 0,2% de 4-nerolidilcatecol).

A análise estatística revelou não existir influência do sexo no resultado do ensaio de TBARS: $p=0,3090$, $F=1,05$ e $df=1/58$.

Tabela 6: Quimiluminescência (QL) espontânea na pele de camundongos machos submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Número de animais	Média e desvio padrão (cpm/ g de pele)
controle (sem tratamento)	7	53758±8544
diadermina	7	62212±18168
α-tocoferol, incorporado a 0,2% na diadermina	7	54848±6136
extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> incorporado a 0,2% de 4-nerolidilcatecol na diadermina	7	1432±1305

Como nos ensaios de TBARS, a análise estatística demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas ao comparar as médias do grupo *Pothomorphe umbellata* com a média dos demais grupos: $p < 0,0001$, $F = 49,63$ e df 3/24.

Tabela 7: Quimiluminescência (QL) espontânea na pele de camundongos fêmeas submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Número de animais	Média e desvio padrão (cpm/ g de pele)
controle (sem tratamento)	7	66954±17226
diadermina	7	83193±16379
α-tocoferol, incorporado a 0,2% na diadermina	7	60709±14632
extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> incorporado a 0,2% de 4-nerolidilcatecol na diadermina	7	1335±1370

No caso do ensaio de QL em camundongos fêmeas, apresentado na tabela 7 a única média significativamente diferente ($p \leq 0,05$) foi a do grupo tratado com extrato de *Pothomorphe umbellata*, quando comparada à dos demais grupos : $p < 0,0001$, $F = 50.61$ e $df = 3/25$.

Figura12: Representação gráfica dos dados apresentados nas tabelas 6 e 7. QL espontânea na pele de camundongos machos e fêmeas submetidos a diferentes tratamentos. No gráfico acima estão representados os valores de média (colunas) e desvio padrão (barras de erro y) para C (grupo controle), D (grupo diadermina), a-T (grupo base contendo 0,2% de α -tocoferol) e P u (grupo base contendo o extrato padronizado de *Pothomorphe umbellata*, na concentração de 0,2% de 4-nerolidilcatecol).

A análise estatística revelou não existir influência do sexo no resultado do ensaio de QL: $p=0,1548$, $F=2,09$ e $df=1/48$.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante em pele de camundongos tratados com diferentes concentrações de α -tocoferol.

Figura 13: Produção de TBARS em camundongos submetidos a tratamento com diferentes concentrações de α -tocoferol. Este gráfico representa a média (colunas) e o desvio padrão (barras de erro y) para o grupo controle (C): $71,62 \pm 20,66$, para o grupo diadermina (D): $80,37 \pm 19,46$; e para os grupos tratados com α -tocoferol incorporado à diadermina nas seguintes concentrações (p/p): (0,2%): $74,24 \pm 22,27$; (2%): $63,76 \pm 21,37$; (5%): $41,48 \pm 17,77$ e (10%): $7,6 \pm 3,9$. Os números entre parênteses no gráfico representam o número de animais por grupo.

Através da análise estatística ficou demonstrado que os grupos tratados com as concentrações de 5% e 10% de α -tocoferol tiveram média significativamente diferente ($p \leq 0,05$), quando comparados à média do grupo controle diadermina: $p < 0,0001$, $F = 15,807$ e $df = 5/43$.

Figura14: Quimiluminescência espontânea na pele de camundongos tratados com diferentes concentrações de α -tocoferol. Este gráfico representa a média (colunas) e o desvio padrão (barras de erro y) para o grupo controle (C): 70217 ± 19046 , para o grupo diadermina (D): 62212 ± 18168 e para os grupos tratados com α -tocoferol incorporado à diadermina nas seguintes concentrações (p/p): (a-T 0,2%): 60675 ± 10952 ; (a-T 2%): 65304 ± 23746 ; (a-T 5%): 76886 ± 14938 e (a-T 10%): 13078 ± 8961 . Para cada grupo de experimentos foram utilizados 7 animais.

Através da análise estatística ficou demonstrado que apenas o grupo tratado com a concentração de 10% de α -tocoferol teve média significativamente diferente ($p \leq 0,05$) quando comparado à média do grupo controle diadermina: $p < 0,0001$, $F = 13,203$ e $df = 5/40$.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante em pele de camundongos tratados com o extrato de *Pothomorphe umbellata*, incorporado em diferentes concentrações de 4-nerolidilcatecol na diadermina.

Figura 15: Produção de TBARS na pele de camundongos tratados com diferentes concentrações do extrato de *P. umbellata*. Esta figura representa a média (colunas) e o desvio padrão (barras de erro y) para o grupo controle(C): $133,38 \pm 15,58$, para o grupo diadermina (D): $101,48 \pm 20,42$ e para os grupos tratados com extrato de *P. umbellata* incorporado à diadermina nas seguintes concentrações de 4-nerolidilcatecol (p/p): (P u 0,02%): $111,25 \pm 33,56$; (P u 0,05%): $88,07 \pm 26,97$; (P u 0,1%): $4,18 \pm 3,14$, (P u 0,2%): $2,71 \pm 2,59$ e (P u 2%): $2,41 \pm 1,96$. Para cada grupo de experimentos foram utilizados 7 animais.

A análise estatística dos resultados apresentados na figura 14 demonstrou que os grupos tratados com as concentrações de 0,1; 0,2 e 2%

tiveram média significativamente diferente ($p \leq 0,05$) quando comparados às médias dos demais grupos: $p < 0,0001$, $F = 79,53$ e $df = 6/43$.

Figura 16: QL espontânea na pele de camundongos tratados com diferentes concentrações do extrato de *P. umbellata*. Esta Figura representa a média (colunas) e o desvio padrão (barras de erro y) para o grupo controle (C): 110992 ± 33859 , para o grupo diadermina (D): 93818 ± 16644 , e para os grupos tratados com extrato de *P. umbellata* incorporado à diadermina nas seguintes concentrações de 4-nerolidilcatecol (p/p): (P u 0,02%): 100723 ± 25073 ; (P u 0,05%): 72092 ± 25333 ; (P u 0,1%): 2872 ± 622 , (P u 0,2%): 1432 ± 1305 e (P u 2%): 1562 ± 825 . Cada grupo possui um $n = 7$.

A análise estatística dos resultados apresentados na figura 15, demonstrou que os grupos tratados com as concentrações de 0,1; 0,2 e 2% tiveram média significativamente diferente ($p \leq 0,05$) quando comparados às médias dos demais grupos: $p < 0,0001$, $F = 46,84$ e $df = 6/42$.

4.4 Avaliação da lipoperoxidação em pele de camundongos irradiados com lâmpadas de UV

Tabela 8: Produção de TBARS em pele de camundongos irradiados com lâmpadas de ultravioleta

Tratamento			TBARS (nmols/g de pele)		Estatística
Lâmpada	Tempo de irradiação	Sacrifício	Controle	Irradiado	
TLK 0.9 40W Philips	2 horas	imediatamente após período de irradiação	n=12 71,5±20,3	n=9 82,1±21,2	p=0,26 t=1,41 df=19
TLK 0.5 40W Philips a)	2 horas	imediatamente após período de irradiação	n=7 90,22±22,81	n=6 86,80±18,11	p=0,77 t=0,29 df=11
TLK 0.5 40W Philips b)	2 horas	imediatamente após período de irradiação	n=7 4,85±1,7	n=7 4,3±1,15	p=0,5061 t=0,6855 df=12
Solar Ultraviolet Simulator 150W	30 min	imediatamente após período de irradiação	n=8 55,19±24,54	n=8 56,72±18,62	p=0,2443 t=0,1398 df=14
Solar Ultraviolet Simulator 150W	10min	24 horas após período de irradiação	n=5 46,2±21,3	n=5 53,5±19,3	p=0,6637 t=0,4480 df=10

n= número de animais

Os valores representam a média e o desvio padrão

a) análise espectrofotométrica

b) análise espectrofluorimétrica

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo de camundongos irradiados e o grupo de camundongos controle.

Figura 17: Representação gráfica dos dados apresentados na tabela 8. Produção de TBARS na pele de camundongos irradiados e não irradiados. Na figura estão representadas as médias (colunas) e os desvios padrão (barras de erro y) dos grupos controle e irradiados. No eixo x estão representadas as lâmpadas TLK 0,9, TLK 0,5 (a: ensaio espectrofotométrico e b: ensaio espectrofluorimétrico) e SUS (Solar Ultraviolet Simulator) e os tempos de irradiação.

Tabela 9: QL espontânea de homogenatos de pele de camundongos irradiados com lâmpada de UV

Tratamento			QL (cpm/g de pele)		Estadística
Lâmpada	Tempo de irradiação	Sacrifício	Controle	Irradiado	
TLK 0.9 40W Philips	2 horas	imediatamente após período de irradiação	n=10 99352±20916	n=6 121483±20503	p=0,26 t=1,41 df=19
TLK 0.5 40W Philips	2 horas	imediatamente após período de irradiação	n=7 101092±17557	n=7 100172±21985	p=0,77 t=0,29 df=11
Solar Ultraviolet Simulator 150W	30 min	imediatamente após período de irradiação	n=5 41116±11412	n=5 44770±7983	p=0,2443 t=0,1398 df=14
Solar Ultraviolet Simulator 150W	10min	24 horas após período de irradiação	n=5 74461±27170	n=5 51722±24148	p=0,6637 t=0,4480 df=10

n= número de animais

Os valores representam a média e o desvio padrão

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o grupo de camundongos irradiados e o grupo de camundongos controle.

Figura 18: Representação gráfica dos dados apresentados na tabela 9.

Produção de QL na pele de camundongos irradiados e não irradiados. Na figura estão representadas as médias (colunas) e os desvios padrão (barras de erro y) dos grupos controle e irradiados. No eixo x estão representadas as lâmpadas TLK 0,9, TLK 0,5 e SUS (Solar Ultraviolet Simulator) e os tempos de irradiação.

5. Discussão

É amplamente proposto que a radiação UV induz a formação de radicais livres na pele (BLACK, 1987a). Experimentos “in vitro” demonstraram de maneira indireta, através da produção de TBARS (MORLIÈRE et al., 1991; LECCIA et al., 1993) e oxidação de grupos sulfidríla (VILE & TYRREL, 1995) em fibroblastos irradiados com UVA, a participação de espécies reativas de oxigênio nos efeitos deletérios induzidos por UV sobre lipídios e proteínas de células da pele humana. Outra maneira de se avaliar os efeitos da radiação UV na pele é o estudo da resposta dos sistemas antioxidantes da pele frente à irradiação (SMITZ et al., 1995; SHINDO et al., 1993; SHINDO et al., 1994; PENCE & NAYLOR, 1990).

Apesar de existirem evidências circunstanciais sugerindo que o dano causado por radiação UV envolve a geração de radicais livres (FUCHS et al., 1989c, CARBONAE & PATHAK, 1992, PELLE et al., 1990) a detecção direta destes radicais é difícil devido a sua natureza transiente que faz com que dificilmente alcancem concentrações mensuráveis “in vivo” (BLACK, 1987a). Jurkiewicz (JURKIEWICS & BUETTNER, 1994), através de técnicas de

ressonância paramagnética eletrônica (EPR), isolou um radical livre centrado no carbono, possivelmente gerado a partir de lipídios de membrana como resultado da cisão β de radicais lipídicos alcóxila, produzidos por radiação UV na pele intacta “ex vivo”. A técnica utilizada consiste na reação do radical de curta duração com uma molécula diamagnética (α -[4-piridil 1-óxido]-N-*tert*-butil nitrona), levando à formação de um radical mais estável, detectável pelo aparelho de EPR (JUERKIEWICZ & BUETTNER, 1994).

O radical ascorbato é estabilizado por ressonância, e é diretamente detectável na pele, a temperatura ambiente, por EPR, servindo de marcador para formação de radicais induzida por radiação UV (JUERKIEWICZ & BUETTNER, 1996).

O emprego da técnica de EPR trouxe evidências convincentes que apontam para participação de radicais livres nos efeitos lesivos causados pela exposição da pele à radiação UV.

Um dos efeitos deletérios produzidos pela radiação UV sobre biomoléculas é a lipoperoxidação. Alguns autores demonstraram aumento na concentração de TBARS em homogenato de pele de camundongos sacrificados imediatamente após irradiação por UV (EVELSON et al., 1997; MORLIÈRE et al., 1991), ou algumas horas após a irradiação (KOBAYASHI et al., 1996 a,b; HASEGAWA et al., 1992).

Em nosso modelo experimental os ensaios de TBARS e quimiluminescência não se mostraram marcadores eficientes do dano causado por radiação UV. Estes resultados estão de acordo com dados publicados por outros autores (FUCHS et al., 1989b; PODDA et al., 1998;

WEBER et al., 1997; SAVOURÉ, 1996), que também não detectaram aumento de TBARS e hidroperóxidos lipídicos em homogenatos de pele de camundongos, após exposição a UV. Entre os argumentos utilizados por estes autores estão a falta de sensibilidade do método analítico empregado (PODDA et al., 1998), a capacidade do sistema antioxidante da pele dos camundongos Hairless de prevenir o dano oxidativo aos lipídios nas condições experimentais (FUCHS et al., 1989c) e a possibilidade do dano oxidativo à pele não ocorrer imediatamente após a exposição à UV (WEBER et al., 1997). Outro argumento utilizado é que os peróxidos lipídicos produzidos durante o processo de irradiação estariam sendo metabolizados e excretados (SAVOURÉ et al., 1996).

Analisando trabalhos mais recentes a explicação mais coerente para não termos conseguido detectar o efeito pró-oxidante da radiação UV é a falta de sensibilidade do método. Shindo (SHINDO et al., 1994), utilizando o Solar UV Simulator (Solar Light Co.), conseguiu demonstrar um aumento da concentração de hidroperóxidos com o aumento da dose de irradiação (2,5-10J/cm²). Os autores empregaram a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por quimiluminescência, cujo limite de detecção foi de 1 pmol de hidroperóxido. Esta técnica foi empregada com sucesso por outros autores (NOGUCHI et al., 1997).

Quanto ao ensaio de quimiluminescência a maneira mais apropriada de se medir efeito pró-oxidante de UV, parece ser a quimiluminescência “in situ”, ou seja, não invasiva (BOVERIS et al., 1983). A vantagem deste método é o fato de ser um ensaio não destrutivo que permite a realização de

leituras de emissão de quimiluminescência imediatamente após a exposição à radiação UV. A preparação de homogenatos, apesar de se adequar melhor ao nosso modelo experimental, sofre maior influência de fatores externos durante o período experimental, além de poder levar a uma diminuição da concentração de espécies reativas produzidas mais superficialmente na pele pela irradiação.

Uma grande dificuldade na comparação entre os dados publicados na literatura é a diversidade de lâmpadas utilizadas nos ensaios. As fontes de radiação ultravioleta diferem bastante, produzindo espectros diferentes. Também os numerosos equipamentos utilizados para monitorar as lâmpadas dificultam a comparação entre os laboratórios. A lâmpada TLK 0,5 Phillips foi empregada em um ensaio similar ao nosso e a dose emitida pela lâmpada em 2h, descrita pelo autor (EVELSON et al., 1997), foi de $28\text{J}/\text{cm}^2$, sendo que o radiômetro empregado para medida da dose não especificado. A lâmpada TLK 0,5 Phillips utilizada em nossos experimentos, nas mesmas condições daquele descrito por Evelson (EVELSON et al., 1997), não emitiu mais que $4,05\text{ J}/\text{cm}^2$. Talvez seja esta a razão por não termos conseguido repetir os resultados publicados pelo autor, que obteve um aumento de 130% na produção de TBARS, no ensaio de fluorimetria descrito neste trabalho.

A quimiluminescência de baixa intensidade de sistemas sofrendo peroxidação lipídica, reflete reações de oxidação envolvendo oxigênio molecular, especialmente a geração de radicais livres de curta duração ou espécies excitadas produzidas nas reações de terminação do processo de peroxidação lipídica (CADENAS et al., 1981). Este tipo de ensaio geralmente apresenta uma boa correlação com outros ensaios de peroxidação lipídica como acúmulo de TBARS, e pode ser utilizada com sucesso para monitorar estes ensaios (LISSI et al., 1986). Os resultados obtidos com o nosso modelo experimental demonstram grande coerência ao compararmos os resultados de TBARS e quimiluminescência, servindo ambos de modelo eficaz para avaliação da atividade antioxidante dos compostos estudados neste trabalho.

Apesar de existirem na literatura citações sobre a ação antioxidante de preparações contendo 0,2% de α -tocoferol (EMERIT, 1982; FURUSE, 1987) não obtivemos diferença significativa na produção de indicadores de lipoperoxidação quando esta concentração foi empregada em nosso modelo experimental. Furuse cita em seu trabalho (FURUSE, 1987), que o α -tocoferol é utilizado, como ingrediente ativo em cosméticos na faixa de concentração de 0,2 a 2%.

A penetração dérmica e a distribuição sistêmica de vitamina E radioativa em pele humana, enxertada em camundongos nude mostrou que a vitamina E penetra através do extrato córneo e dos folículos pilosos, e é encontrada após 4h na epiderme e na porção superior da derme, mas que após 24h o máximo é detectado na porção inferior da derme, que funciona

como uma barreira ou reservatório para este antioxidante altamente lipofílico (KLAIN, 1989). O caráter cumulativo conferido ao α -tocoferol por sua lipofilicidade pode justificar sua baixa concentração em cosméticos que geralmente são produtos de uso diário.

Em nosso modelo uma única aplicação de creme contendo 0,2% de α -tocoferol foi insuficiente para promover diminuição nos parâmetros de lipoperoxidação. Foi possível demonstrar uma diminuição significativa em ambos os indicadores de lipoperoxidação (TBARS e QL) apenas para a concentração de 10% de α -tocoferol, e uma tendência de diminuição destes indicadores para a concentração de 5%. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, empregando concentrações de 5% e 10% de α -tocoferol para avaliar atividade antioxidante do composto mediante uma única aplicação (EVELSON et al, 1997; WEBER et al., 1997, BISSET et al., 1990; MAYER, 1993).

Os resultados obtidos para os animais tratados com extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata* permitiram demonstrar uma redução de aproximadamente 97% nos indicadores de lipoperoxidação (TBARS e QL) nas concentrações maiores ou iguais a 0,1% de 4-nerolidilcatecol (4% de extrato incorporado na diadermina), quando comparadas ao grupo controle. Isto aponta para uma potente atividade antioxidante do extrato, quando comparada à atividade antioxidante do α -tocoferol. Estes resultados vêm a confirmar os ensaios "in vitro" realizados em nosso laboratório, que atribuem a maior atividade antioxidante do extrato à presença do 4-nerolidilcatecol (BARROS et al., 1996).

A maior atividade antioxidante do extrato de *Pothomorphe umbellata* relativamente ao α -tocoferol pode ser conseqüência da diferença de tamanho e solubilidade entre as moléculas de 4-nerolidilcatecol e do α -tocoferol. A estrutura molecular do 4-nerolidilcatecol também contribui bastante para sua potente atividade antioxidante.

Figura 19: 4-nerolidilcatecol

O potencial antioxidante de um composto é determinado por uma série de fatores como: reatividade química intrínseca do antioxidante para com o radical, localização do antioxidante, concentração e mobilidade no microambiente, estabilidade do radical formado a partir do antioxidante, absorção, distribuição, retenção, metabolismo e toxicidade “in vivo” (NOGUCHI et al., 1997).

A presença de substituintes doadores de elétrons nas posições *orto* e/ou *para* em relação ao grupamento OH fenólico, aumenta a densidade eletrônica dos centros ativos facilitando a fissão homolítica da ligação O-H fenólica, aumentando assim a estabilidade do radical fenoxila e melhorando a reatividade com radicais peroxila (KAMAL-EDIN & APPELQVIST, 1996). A alta reatividade com radicais hidroxila está relacionada à energia de dissociação da ligação O-H fenólica, que é determinada, em parte, pela estabilização por ressonância do radical formado. Estes fatores favorecem muito a atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol (**Figura 19**, I ell).

Figura 20: α -tocoferol

Outro fator relevante é a cadeia lateral. A longa cadeia lateral do α -tocoferol é importante para sua incorporação e retenção nas membranas. Por outro lado, quanto maior a cadeia lateral, menor a mobilidade entre e intermembranas (NOGUCHI et al., 1997; NIKI et al., 1985). O fato de possuir uma cadeia lateral menor que a do α -tocoferol pode conferir ao 4-nerolidilcatecol uma maior mobilidade. Além disto a cadeia lateral insaturada do 4-nerolidilcatecol pode contribuir para uma maior atividade antioxidante,

como ocorre com tocotrienóis, que apresentam uma maior atividade antioxidante que tocoferóis (WEBER et al., 1997).

6. Conclusões

Em nosso modelo experimental os ensaios de TBARS e quimiluminescência não se mostraram marcadores eficientes do dano causado por radiação UV.

O α -tocoferol causou uma diminuição nos indicadores de lipoperoxidação (TBARS e QL), após uma única aplicação, na concentração de 10% incorporado na diadermina e uma tendência de diminuição destes mesmos indicadores, na concentração de 5%.

O extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata* promoveu uma redução de aproximadamente 97% nos indicadores de lipoperoxidação (TBARS e QL) a partir da concentração de 0,1% de 4-nerolidilcatecol (4% de extrato incorporado na diadermina), em relação ao grupo controle.

A atividade antioxidante do extrato bruto foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a do α -tocoferol, sugerindo seu emprego em formulações cosméticas que têm o objetivo de combater os efeitos danosos causados por radicais livres.

7. Referências Bibliográficas

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CURANDI**, São Paulo, v.6, p.141-164,1993.

ARTHUR, W.H. **Histologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.
p.: 595-625.

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.**, São Paulo, v.48, p.114-116, 1996.

BECH-THOMSEN, N., POULSEN,T., CHRISTENSEN,F.G., LUNDGREN,K., WULF, H.C.Near-visible UV radiation delays UVB tumorigenesis. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.22, p.119-123,1994.

BISSET, D.L., CHATERJEE, R., HANNON, D.P. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in hairless mouse. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, Copenhagen, v.7, p.56-62, 1990.

BLACK, H.S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light - mediated cutaneous damage. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.46, n.2, p.213-221, 1987a.

BLACK, H.S. Systemic photoprotective agents. **Photodermatology**, Copenhagen, v.4, p.187-195, 1987b.

BLACK, H.S. Photocarcinogenesis and diet. **Fed. Proc.**, Washington, v.46, p.1901-1905, 1987c.

BOVERIS, A., FRAGA, C.G., VARSVSKY, A.I., KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.227, p.534-541, 1983.

BURTON, M.G.W., INGOLD, K.V. Mechanism of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants. In: **CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**. New York: CRC Press, 1987. p.969-978.

CADENAS, E., VARSAVSKY, A.I., BOVERIS, A., CHANCE, B. Oxygen- or organic hidroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. **Biochem. J.**, London, v.198, p.645-654, 1981.

CARBONARE, M.D., PATHAK, M.A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.14, p.105-124, 1992.

CHEDECKEL, M.R. A melanina pode melhorar os filtros solares. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.10, p.60-62, 1998.

CONNOR, M.J., WHEELER, L.A. Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.46, n.2, p.239-245, 1987.

CZAPSKI, G. Reaction of $\cdot\text{OH}$. **Methods Enzymol.**, New York, v.105, p.209-215, 1984.

DESMARCHELIER, C., BARROS, S., REPETTO, M, LATORRE, L.R., KATO, M.J., COUSSIO, J. 4-nerolidylcathecol from *Pothomorphe umbellata* Spp. scavenges peroxyl radicals and inhibits Fe(II) - dependent DNA damage. **Planta Med.**, Stuttgart, v.63, p.561-563, 1997.

EMERIT, I. Free radicals and aging of the skin. In: **EXS: Free radicals and aging**. Basel: Birkhauser Verlag, 1992. v.62, p.328-341.

EVELSON, P., ORDÓÑEZ, C.P., LLESUY, S., BOVERIS, A. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.38, p.215-219, 1997.

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.

FOX, C. Advances in cosmetic science and technology. II. Topical bioactive materials. **Cosmet. Toiletries.**, Oak Park, v.109, p.83-114, 1994.

FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.47, n.5, p.412-426, 1982.

FRYER, M.J. Evidence for the photoprotective effects of vitamin E.

Photochem. Photobiol., Oxford, v.58, p.304-312, 1993.

FUCHS, J., HUFLEJT, M.E., ROTHFUSS, L.M., WILSON, D.S., CARCAMO,

G., PACKER L. Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.50, p.739-744, 1989a.

FUCHS, J., MEHLHORN, R., PACKER, L. Free radical reduction mechanism

in mouse epidermis skin homogenates. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.93, p.633-640, 1989b.

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. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.93, p.769-773, 1989c.

FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR- α -

tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection.

Free Radical Biol. Med., New York, v.25, n.7, p.848-873, 1998.

FURUSE, K. Vitamin E: Biological and clinical aspects of topical treatment.

Cosmet. Toiletries., Oak Park, v.102, p.99-116, 1987.

GILCHREST, B.A., SZABO, G., FLYNN, E., GOLDYNE, R.M. Chronologic and actinically induced aging in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.80s, suppl., p.81-85, 1983.

GIROTTI, A.W., THOMAS, J.P. Superoxide and hydrogen peroxide-dependent lipid peroxidation in intact and triton-dispersed erythrocyte membranes. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, Amsterdam, v.118, p.474-480, 1984.

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

GIROTTI, A.W., THOMAS, J.P., JORDAN, J.E. Prooxidant and antioxidant effect of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipids in erythrocyte membranes. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.41, n.3, p.267-276, 1985.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, Bethesda, v.1, p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B., GUTTERGUIDE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1985. p. 12

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics. What they are and how to evaluate them. In: SIES, H. **Antioxidants in disease mechanism and therapy**. London: Academic Press, 1997a. p.1-17.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr. Rev.**, New York, v.55, n.1, p.544-552, 1997b.

HAWK, J.L.M. UVA hazards in skin associated with the use of tanning equipment: a comment. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.5, p.267-271, 1990.

HASEGAWA, T., KANEKO, F., NIWA, Y. Changes in lipid peroxide level and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice, **Life Sci.**, Elmsford, v.50, p.1893-1903, 1992.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p.272-280.

JUNQUEIRA, V.B.C., SIMIZU, K., VIDELA, L.A., BARROS, S.B.M. Dose dependent study of effects of acute lindane administration of rat liver superoxyde anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. **Toxicology**, Shannon, v.41, p.193-204, 1986.

JUERKIEWICZ, B.A., BUETTNER, G.R. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.59, p.1-4, 1994.

JUERKIEWICZ, B.A., BUETTNER, G.R. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.64, p.918-922, 1996.

KAMAL-ELDIN, A., APPELQVIST, L. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, Champaign, v.31, n.7, p.671-701, 1996.

KIJJOA, A., GIESBRECHT, A.M., AKISUE, M.K., GOTTLIEB, O.R., GOTTLIEB, H.E. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.39, p.85-87, 1980a.

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

KITASAWA, M., PODDA, M., THIELE, J., TRABER, M.G., IWASAKI, K., SAKAMOTO, K., PAKER, L. Interactions between vitamine E homologues and ascorbate free radicals in murine skin homogenates irradiated with ultraviolet light. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.65, p.355-365, 1997.

KLAIN, G.H. Dermal penetration and systemic distribution of 14-C labeled vitamin E in human skin grafted athymic nude mice. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.59, p.333-337, 1989.

KLIGMAN, H.L. Yearly review: the hairless mouse and photoaging. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, 54, p.1109-1118, 1991.

KOBAYASHI, S., TAKEHANA, M., TOHYAMA, C. Glutathione isopropyl ester reduces UVB-induced skin damage in hairless mice. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.63, p.106-110, 1996a.

KOBAYASHI, S., TAKEHANA, M., ITOH, S., OGATA, E. Protective effect of magnesium-L-ascorbyl-2 phosphate against skin damage induced by UVB irradiation. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.64, p.224-228, 1996b.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, p.969-978, 1988.

LAVKER, R., KAIDBEY, K. The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.108, p.17-21, 1997.

LECCIA, M.T., RICHARD, M.J., BEANI, J.C., FAURE, H., MONJO, A.M., CADET, J., AMLARD, P., FAVIER, A. Protective effect of selenium and zinc on UVA damage in human skin fibroblast. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.58, p.548-553, 1993.

LEE, P.C.C., RODGERS, Laser flash photokinetic studies of Rose Bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.45, p.40-43, 1987.

LISSI, E.A., CÁCERES, T., VIDELA, L.A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. **J. Free Radicals Biol. Med.**, New York, v.2, p.63-69, 1986.

LISSI, E., SALIM-HANNA, M., PASCUAL, C., DEL CASTILLO, M. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and antioxidant reactivity from luminol enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.18, n.2, p.153-158, 1995.

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. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.138, p.207-215, 1998.

- MAYER, P. The effect of vitamin E on the skin. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.108, p.99-109, 1993.
- MYLADY'S standard: textbook of cosmetology. New York: Delmar, 1994. 474p.
- 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 - USP).
- MORLIÈRE, P., MOYSAN, A., SANTUS, R., HÜPPE, G., MAZIÈRE, J.C., DUBERTRET, L. UVA induced lipid peroxidation in cultured human fibroblast. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1084, p.261-268, 1991.
- NIKI, E., KAWAKAMI, A., SAITO, M., YAMAMOTO, Y., TSUCHIYA, J., KAMYA, Y. Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.260, p.2191-2196, 1985.

NOGUCHI, N., YOSHIHIDE, I., TAKAHASHI, M., KOMURO, E., KATO, Y., TAMURA, K., CYNCHI, O., KODAMA, T., NIKI, E. 2,3-Dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*tert*-butylbenzofuran: design and evaluation as a novel radical-scavenging antioxidant against lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.342, n.2, p.236-243, 1997.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. 15.ed., São Paulo: Ibrasa, 1998. p.159-160.

PALOZZA, P., KRINSKY, N.I. β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants? **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.297, n.1, p.184-187, 1992.

PARAT, M.O., RICHARD, M.J., LECCIA, M.T., PIERRE, A., BÉANI J.C. Does manganese protect cultured human skin fibroblast against oxidative injury by UVA, dithranol and hydrogen peroxide? **Free Radical Res. Commun.**, London, v.23, p.339-351, 1995.

PAULY, G., PAULY, M. Immunoprotection in daily-use cosmetics. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.111, p.47-65, 1996.

PECKOLT, V. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata*(L.) Kunth. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v.15, p.1-13, 1941.

PELLE, E., MAES, D., PADULO, A., KIM, E.K., SMITH, P.S. An in vitro model to test relative antioxidant potential: ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.283, n.2, p.234-240, 1990.

PENCE, B.C., NAYLOR, M.F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xantine oxidase in hairless mice. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.95, p.213-216, 1990.

PODDA, M., TRABER, M.G., WEBER, C., YAN, L.J., PACKER, L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.24, n.1, p.55-65, 1998.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.67, p.289-297, 1997.

PROTA, G. Melanins and melanogenesis, **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.111, p.43-50, 1996.

RECORD, I.R., DREOSTI, I.E., KONSTANTINOPOULOS, M., BUCKLEY, R.A. The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in Hairless mice. **Nutr. Cancer**, Hillsdale, v.16, p.219-225, 1991.

RIEDEL, O.O. Subsídios para estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) – Kunth. **Trib. Farm.**, Curitiba, v.9, n.12, p.269-263, 1941.

RIEGER, M.M. Reactions of oxigen affecting skin products. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.104, p.83-90, 1989.

RIEGER, M., PLAINS, M. Oxidative reactios in and on skin: mechanism and prevention. **Cosmet. Toiletries**, v.108, p.43-56, 1993.

SAVOURÉ, N., MAUDET, M., NICOL, M., PÉLISSIER, M.A., ALBRECHT, R., BRIAND, G., COMBRE, A. Modulation of ultraviolet light-induced oxidative stress in mice skin related to dietary vitamin A and selenium intake. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Bern, v.66, p.306-315, 1996.

SCHARFFETER-KOCHANNEK, K. Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy. In: SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. London: Academic Press, 1997. p.639-655.

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

SILVA, R.A.D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1926. p.649.

SMITZ, S., PANAKKEZHUM, D.T., ALLEN, T.M. Dual role of melanin and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.61, p.650-655, 1995.

STEENVOORDEN, D.P.T., BEIJERSBERGEN van ENEGOUWEN, G.M.J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.41, p.1-10, 1997.

STORPIRTIS, S., VELASCO, M.V.R., CONSIGLIERI, V.O. **Práticas de farmacotécnica**. São Paulo: FCF, 1995. 51p. [Apostila].

TEDESCO, A.C., MARTÍNEZ, L., GONZÁLES, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanism. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.30, p.561-575, 1997.

TIEN, M., SVINGEN, B.A., AUST, S.D. An investigation into the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.216, p.142-151, 1982.

TYRREL, R.M. UVA hazards in skin associated with the use of tanning equipment: a comment. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.4, p.227-232, 1989.

VIDÓCZY, T. Type I and Type II photosensitized reactions: reasons for dispute. **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.14, p.139-150, 1992.

VILE, G.F., TYRREL, R.M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.18, p.721-793, 1995.

WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.V. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.884, p.119-123, 1986.

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.

YUEN, K.S., HALLIDAY, G.M. α -Tocopherol, an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, prevents ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.65, n.3 p.587-592, 1997.