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

Prevenção do dano fotooxidativo à pele por tratamento tópico
com extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq

Cristina Dislich Ropke

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Tit. Silvia Berlanga de
Moraes Barros

São Paulo
2003

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

Dislich Ropke, Cristina
D611p Prevenção do dano fotooxidativo à pele por tratamento
tópico com extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata* L.
Miq / Cristina Dislich Ropke. -- São Paulo, 2003.
98p.

Tese (doutorado) - 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 Ropke

Prevenção do dano fotooxidativo à pele por tratamento tópico
com extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata* L. Miq

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientador/presidente

1º. examinador
Profa. Tit. Valéria Petri - UNIFESP

2º. examinador
Profa. Assoc. Maria Vitória Badra Bentley – FCFRP -USP

3º. examinador
Prof. Tit. Paolo di Mascio –IQ - USP

4º. examinador
Profa. Tit. Elfriede Marianne Bacchi – FCF -USP

“O cristão é um senhor livre de tudo, a ninguém sujeito - pela fé. O cristão é um servo dedicado, a tudo sujeito – por amor.”

Martinho Lutero

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pelo exemplo, pelo incentivo e pela dedicação.

Ao meu marido e companheiro Ernani, pelo incentivo e ao meu filho Martin pelos momentos em que precisei estar ausente.

À minha família Elke, Henrique e Martina e Rogério, pelo apoio em todos os sentidos. Em especial a minha mãe Elke pela sua dedicação.

Aos meus amigos Tânia, Vanessa, Sonia, Renata, César, Clarissa, Elissa e Profa. Ligia e sua orientanda Sandra pela ajuda recebida na concretização deste trabalho.

À Profa. Telma Mary Kaneko que tornou possíveis os estudos de permeação cutânea.

À Profa. Maria Vitória Lopes Badra Bentley e à Fernanda Scarmatto, pela medida da radiação da lâmpada UVB utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Jorge Massuo Kato pelo 4-nerolidilcatecol utilizado como padrão nos ensaios realizados.

Ao Dr. Nilceo Schwery Michalany, pelos cortes histológicos e pela ajuda na interpretação das alterações visualizadas nas lâminas do estudo de fotoenvelhecimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Channel, à Profa. Elfriede Marianne Bacchi e ao Sr. Roberto pela ajuda na preparação do extrato de *Pothomorphe umbellata*.

Ao Dr. Paulo de Moraes Barros, pelo auxílio no registro das alterações provocadas pela exposição crônica a Radiação UV.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre prontos para auxiliar.

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente tornaram a realização deste trabalho possível.

À FAPESP pela bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

Introdução	1
1. Revisão da literatura	2
1.1 A pele	2
1.2 O estresse oxidativo de pele e suas consequências	6
1.2.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o sistema antioxidante da pele	6
1.2.2 Alterações na pele causadas pela exposição aguda à radiação ultravioleta	12
1.2.3 Alterações da pele pela exposição crônica à radiação ultravioleta	13
1.3 Prevenção do dano fotooxidativo à pele	16
1.4 <i>Pothomorphe umbellata</i>	19
1.5 Permeação cutânea e atividade antioxidante	22
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	26
3.1 Equipamentos	26
3.2 Reagentes	26
3.3 Coleta e processamento das raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	27
3.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico	27
3.5 Escolha e preparação das formulações de uso tópico utilizadas nos ensaios de permeação	27
3.6 Animais	29
3.7 Validação das metodologias analíticas empregadas na padronização do extrato de <i>P. umbellata</i> , nos ensaios de permeação cutânea e na avaliação dos antioxidantes não enzimáticos da pele	29
3.7.1 Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol	29
3.7.2 Validação de metodologia analítica para determinação de ácido ascórbico em pele	41

3.7.3 Validação de metodologia analítica para determinação de glutatona reduzida e oxidada em pele.....	44
3.8 Padronização do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	49
3.9 Estudos de permeação <i>in vitro</i>	50
3.10 Avaliação dos efeitos da exposição aguda à radiação ultravioleta sobre o sistema antioxidante da pele	51
3.10.1 Tratamento dos animais	51
3.10.2 Preparação do homogeneizado de pele	53
3.10.3 Determinação da concentração dos antioxidantes não enzimáticos	53
3.10.4 Determinação da atividade dos antioxidantes enzimáticos	54
3.10.4.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase	54
3.10.4.2 Determinação da atividade da glutatona peroxidase	54
3.10.4.3 Determinação da atividade da glutatona redutase	55
3.10.4.4 Determinação da atividade da catalase	55
3.11 Avaliação dos efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta	56
3.11.1 Tratamento dos animais	56
3.11.2 Observações macroscópicas	56
3.11.3 Observações microscópicas.....	57
3.12 Análise dos resultados	58
4. Resultados	59
4.1 Estudos de permeação <i>in vitro</i>	59
4.2 Ensaio de exposição aguda à radiação ultravioleta	64
4.3 Efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta	67
4.3.1 Alterações macroscópicas	67
4.3.2 Alterações microscópicas	71
5. Discussão	75
6. Conclusões.....	83
7. Referências Bibliográficas	84

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de um corte transversal de pele	3
Figura 2: Esquema das reações de fotossensibilização Tipo I e Tipo II	7
Figura 3: Enzimas antioxidantes.....	9
Figura 4: Rede de antioxidantes de baixo peso molecular	11
Figura 5: Estrutura química de antioxidantes.....	17
Figura 6: 4-nerolidilcatecol	17
Figura 7: Folha de <i>Pothomorphe umbellata</i>	21
Figura 8: Curva de calibração do 4-NC dissolvido em etanol:água	32
Figura 9: Cromatograma do padrão de 4-NC e cromatograma do homogeneizado de pele	33
Figura 10: Curva de calibração do 4-NC dissolvido em etanol	34
Figura 11: Curva de recuperação do 4-NC	35
Figura 12: Cromatogramas do padrão de 4-NC e do 4-NC recuperado da pele	36
Figura 13: Variação da concentração de 4-NC em uma solução de etanol : água, a 37° C, ao longo do tempo	37
Figura 14: Curva de calibração do α -tocoferol dissolvido em etanol	38
Figura 15: Curva de recuperação do α -tocoferol	39
Figura 16: Cromatogramas do padrão de α -tocoferol e do α -tocoferol recuperado do homogeneizado de pele	40
Figura 17: Curva de calibração do ácido ascórbico	42
Figura 18: Cromatogramas do padrão e do ácido ascórbico presente na pele	43
Figura 19: Curva de recuperação do ácido ascórbico	44
Figura 20: Curva de calibração de glutathiona reduzida	46
Figura 21: Curva de calibração de glutathiona oxidada	47
Figura 22: Curva de recuperação de glutathiona reduzida	48
Figura 22: Curva de recuperação de glutathiona oxidada	48
Figura 24: Cromatogramas do padrão de glutathiona reduzida e oxidada e das glutathionas presentes na pele	49

Figura 25: Célula de Franz	51
Figura 26: Sistema de irradiação dos camundongos sem pelo	52
Figura 27: Espectro de emissão da lâmpada UVB Philips 40W/ TI12.....	52
Figura 28: Perfil de permeação do gel de 4-nerolidilcatecol.....	60
Figura 29: Perfil de permeação do creme de 4-nerolidilcatecol	60
Figura 30: Perfil de permeação do gel-creme de 4-nerolidilcatecol	61
Figura 31: Perfil de permeação do gel de <i>Pothomorphe umbellata</i>	61
Figura 32: Perfil de permeação do gel-creme de <i>Pothomorphe umbellata</i>	62
Figura 33: Gráfico da concentração de 4-nerolidilcatecol retido na pele	64
Figura 34: Gráfico das porcentagens da atividade remanescente dos antioxidantes enzimáticos, após irradiação com UVB	65
Figura 35: Gráfico das porcentagens da concentração remanescente dos antioxidantes não-enzimáticos, após irradiação com UVB	65
Figura 36: Concentração de α -tocoferol e 4-NC na pele de camundongos não irradiados	66
Figura 37: Camundongo 4, exemplo de grau 0	69
Figura 38: Camundongo 16, exemplo de grau 1	69
Figura 39: Camundongo 10, exemplo de grau 2	69
Figura 40: Camundongo 15, exemplo de grau 3	70
Figura 41: Camundongo 8, exemplo de grau 4	70
Figura 42: Fotomicrografia de camundongo do grupo controle	73
Figura 43: Fotomicrografia de camundongo do grupo controle irradiado	73
Figura 44: Fotomicrografia de camundongo do grupo controle	74
Figura 45: Fotomicrografia de camundongo do grupo controle irradiado	74
Figura 46: Fotomicrografia de camundongo do grupo controle gel	74
Figura 47: Fotomicrografia de camundongo tratado com <i>P. umbellata</i> ..	74
Figura 48: Reações de regeneração entre os antioxidantes não enzimáticos	77
Figura 49: Proposta de um mecanismo de regeneração do α -tocoferol	80

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características da pele no envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento	15
Tabela 2: Fatores que influenciam a permeação cutânea	24
Tabela 3: Formulações empregadas no ensaio de absorção percutânea	28
Tabela 4: Valores da curva de calibração do 4-nerolidilcatecol dissolvido em etanol:água	32
Tabela 5: Valores da curva de calibração de 4-NC dissolvido em etanol	34
Tabela 6: Valores de recuperação de 4-NC adicionado ao homogeneizado de pele	35
Tabela 7: Valores da curva de calibração de α -tocoferol	38
Tabela 8: Valores da curva de recuperação do α -tocoferol	39
Tabela 9: Valores da curva de calibração de ácido ascórbico	42
Tabela 10: Valores da curva de recuperação de ácido ascórbico	43
Tabela 11: Valores da curva de calibração de glutathiona reduzida	45
Tabela 12: Valores da curva de calibração de glutathiona oxidada	46
Tabela 13: Valores da curva de recuperação de glutathiona reduzida	47
Tabela 14: Valores da curva de recuperação de glutathiona oxidada	48
Tabela 15: Escala para avaliação do grau de formação de rugas na pele de camundongos sem pêlo	57
Tabela 16: Parâmetros de difusão do 4-nerolidilcatecol	63
Tabela 17: Grau de formação de rugas na pele de camundongos irradiados e não irradiados	68
Tabela 18: Análise morfométrica dos cortes histológicos	71

Abreviaturas

Asc•.....	radical ascorbila
Ac. Asc.....	ácido ascórbico
4-NC.....	4-nerolidilcatecol
C.....	grupo controle
Cl.....	grupo controle irradiado
CG.....	grupo controle irradiado tratado com gel-base
CAT.....	catalase
CLAE.....	cromatografia líquida de alta eficiência
DNA.....	ácido desoxirribunucleico
g	unidade de aceleração
GPx.....	glutathione peroxidase
GSH.....	glutathione
GR.....	glutathione reductase
GSSG.....	glutathione oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HSP 70.....	<i>heat shock protein 70</i>
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

NO.....	óxido nítrico
¹ O ₂	oxigênio singlete
O ₂ ^{-•}	radical ânion superóxido
•OH.....	radical hidroxila
RO•.....	radical lipídico
ROO•.....	radical peroxila
ROOH.....	peróxido
rpm	rotações por minuto
Pu.....	grupo irradiado e tratado com gel de extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>
p/v.....	peso por volume
SOD.....	superóxido dismutase
α-T.....	α-tocoferol
α-T•.....	radical α-tocoferila
UV.....	radiação ultravioleta
UVA.....	radiação ultravioleta A (320-400nm)
UVB.....	radiação ultravioleta B (290-320nm)
UVC.....	radiação ultravioleta C (220-290nm)
v/v	volume por volume

RESUMO

Entre as estratégias de fotoproteção encontra-se a inibição da formação e/ou o seqüestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas em consequência da exposição à radiação UV, mediante aplicação tópica de antioxidantes. No presente trabalho avaliou-se a permeação cutânea e o efeito da aplicação tópica de um extrato de *Pothomorphe umbellata* nos efeitos da exposição aguda e crônica à radiação ultravioleta, na pele de camundongos sem pêlo. No estudo de permeação cutânea foram testadas três formulações (gel, gel-creme e creme) contendo o princípio ativo do extrato (4-nerolidilcatecol) isolado. Também foram testadas duas formulações (gel, e gel-creme) contendo o extrato hidroalcoólico liofilizado de *Pothomorphe umbellata*, quanto à permeação do princípio ativo 4-nerolidilcatecol. A formulação gel tanto para o princípio ativo isolado, quanto para o princípio ativo presente no extrato, apresentou o melhor desempenho, sendo o gel o veículo escolhido para preparação da formulação utilizada nos ensaios de exposição crônica e aguda à radiação ultravioleta. Nos estudos de exposição aguda à radiação UVB não foram observadas alterações significativas nos níveis de ácido ascórbico e na atividade enzimática, mas sim uma redução de 40% ($p < 0,01$) na concentração de α -tocoferol na pele do grupo de camundongos sem pêlo, controle irradiado. No grupo tratado com *P. umbellata*, o α -tocoferol foi totalmente preservado, quando comparado aos níveis encontrados no grupo controle não irradiado ($\approx 100\%$, $p > 0,05$). No estudo de exposição crônica dos camundongos sem pêlo à radiação ultravioleta, os grupos irradiados que não receberam tratamento com gel de *P. umbellata* apresentaram a pele fotoenvelhecida. O grupo irradiado e tratado com o gel de *Pothomorphe umbellata* não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle não irradiado, o que demonstra que o extrato de *Pothomorphe umbellata* pode ser empregado com sucesso como agente fotoprotetor tópico no fotoenvelhecimento da pele.

ABSTRACT

Topical administration of antioxidants provides an efficient way to enrich the endogenous antioxidant system and thus may be a successful strategy for diminishing ultraviolet radiation-mediated oxidative damage in the skin. The Brazilian Flora is rich in medicinal plants with a high potential to provide these antioxidant substances. Crude dried root ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata*, from the piperaceae family, demonstrated a significant activity in the prevention of in vitro spontaneous brain lipid peroxidation. This activity was attributed to 4-nerolidylcathecol, a compound isolated from the hexane extracts of roots and leaves of *P. umbellata*. In this work we evaluated the influence of topical application of *P. umbellata* root extract gel, containing 0,1% of 4-nerolidylcathecol, on the antioxidant network in ultraviolet-induced oxidative damage in hairless mouse skin. In this study we evaluated the influence of three different formulations (gel, gel-emulsion and emulsion) on the percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol, an antioxidant compound isolated from *Pothomorphe umbellata* root extracts. Also the absorption of the isolated 4-nerolidylcathecol was compared with its absorption when dried *Pothomorphe umbellata* root ethanolic extract was incorporated in gel and gel-emulsion formulations. The 4-nerolidylcathecol-gel formulation presented the higher rate of penetration, leading to higher dry drug levels in the tissue. 4-nerolidylcathecol was also absorbed in biological conditions and was stable when exposed to UV-irradiation. The UV-irradiation had no influence on ascorbic acid levels, or on the antioxidant enzymes activities, but topical *P. umbellata* treatment protected α -tocopherol from depletion after UV-irradiation. After UV-irradiation α -tocopherol concentration decreased significantly ($\approx 40\%$, $p < 0.01$) in irradiated control groups, while in the *P. umbellata* treated group, α -tocopherol was totally preserved ($\approx 100\%$, $p > 0.05$). We also tested the extract activity on animals chronically exposed to UV-radiation. The extract was able to prevent photoaging of the irradiated animals skin. These data demonstrate that *P. umbellata* may successfully employed as a topical photoprotective agent.

Introdução

A busca por longevidade, associada a uma melhor qualidade de vida, tem feito com que o ser humano mude alguns hábitos, como melhora da qualidade de alimentação, aumento da prática de atividades físicas e investimento em cuidados cosméticos com o corpo e cabelos.

Nesse contexto os antioxidantes presentes nos alimentos de origem vegetal e àqueles incorporados a produtos cosméticos e farmacêuticos, tendem a contribuir para uma vida mais saudável, pois está provado que tais substâncias podem prevenir doenças como diabetes, câncer, catarata, aterosclerose e na pele, prevenir fotoenvelhecimento e câncer de pele.

A alta incidência de câncer de pele e de fotoenvelhecimento no Brasil nos motivou a busca, na flora brasileira, de alternativas de prevenção das conseqüências da excessiva exposição ao sol. A radiação ultravioleta pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio pelas reações de fotossensibilização e pode causar alterações no sistema antioxidante da pele.

A espécie vegetal *Pothomorphe umbellata*, popularmente conhecida por pariparoba, foi selecionada entre outras espécies, por ter apresentado uma atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* significativa em modelos experimentais empregados no laboratório da disciplina de Patologia Geral e Citologia Clínica. Além disto, o fato de ter o seu princípio ativo conhecido, o que não é comum em boa parte das plantas brasileiras, facilitou os estudos de atividade biológica com a pariparoba, pois possibilitou trabalhar sempre com extratos padronizados.

A pariparoba teve suas raízes registradas como droga na primeira edição da Farmacopéia Brasileira; já está botanicamente descrita em dissertação de mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e em 1941 foi descrito o emprego de suas folhas no tratamento de queimaduras e feridas pelos índios brasileiros. Este conjunto de informações já existentes sobre a planta, fizeram da pariparoba uma opção interessante, para ter sua atividade antioxidante na pele melhor elucidada, afim de que no

futuro possa ser empregada em cosméticos e fitoterápicos, na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele.

Comprovando a ação antioxidante do extrato de *Pothomorphe umbellata* na pele, pode-se contribuir com um novo insumo, de fácil obtenção e baixo custo, para a indústria farmacêutica/cosmética brasileira, assim como com um fitoterápico que possa ser empregado na diminuição da incidência de câncer de pele e de fotoenvelhecimento na população brasileira.

1. Revisão da literatura

1.1 A pele

A pele, juntamente com as mucosas do trato respiratório, digestivo e urogenital, formam uma cápsula que separa as estruturas internas do corpo do ambiente externo. Essa capa flexível defende o conjunto interno e estável de tecidos vivos de um mundo externo hostil, com variações de temperatura e umidade, radiação e poluição. Esse órgão, além de oferecer proteção física aos órgãos internos, limita a passagem de substâncias de fora para dentro e de dentro para fora do corpo e estabiliza a temperatura e a pressão sanguínea, por meio de seus sistemas de evaporação e circulação. A pele media as sensações de toque, dor, calor e frio; expressa o rubor da raiva e da vergonha; o suor da ansiedade e a palidez do temor, além de identificar indivíduos através das características de cabelo, odor, textura e colorações particulares ao ser humano (BARRY, 1983).

A pele é formada por dois tecidos diferentes, mas mutuamente dependentes. A camada mais fina e superficial, a epiderme, é um tecido epitelial derivado do ectoderma. A epiderme 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: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (**Figura 1**).

Figura 1: A ilustração superior representa o corte de toda a pele, enquanto a ilustração inferior representa a epiderme (conforme BARRY, 1983)

A camada basal, também denominada de germinativa, apresenta intensa atividade mitótica, o que a faz responsável pela constante renovação da epiderme. As células da camada espinhosa possuem muitas expansões citoplasmáticas que se aproximam e mantêm as células unidas por meio de desmossomos (**Figura 1**), estruturas importantes para a manutenção e coesão celular. A camada granulosa é formada por células poligonais com núcleo central, nitidamente achatadas, em cujo citoplasma são observados grânulos grosseiros de querato-hialina. Na camada lúcida, os núcleos e organelas das células começam a desaparecer. A camada córnea é constituída de células mortas e sem núcleo, que contêm no seu interior a

substância córnea queratina (JUNQUEIRA & 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 & CARNEIRO, 1990; ARTHUR, 1972).

Além de conter queratina, as células do estrato córneo contêm os produtos finais do metabolismo da epiderme. Em uma estrutura altamente organizada, elas acomodam secreções das glândulas sebáceas e sudoríparas (BARRY, 1983). A camada córnea é composta de um sistema bicompartimentado de células anucleadas (corneócitos) embebidas em uma matriz lipídica, formando pilhas de bicamadas ricas em ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (ELIAS, 1983). O conhecimento sobre a estrutura e função do estrato córneo avançou muito desde o conceito inicial de que se tratava de uma camada morta e sem função. Estudos mais recentes levaram a uma compreensão melhor da natureza heterogênea do estrato córneo (JASS & ELIAS, 1991). Esta camada desempenha um papel crucial no controle da absorção percutânea de substâncias (PRASCH *et al.*, 2001). A permeabilidade seletiva do estrato córneo é um tema central no estudo da absorção percutânea de produtos farmacêuticos de uso tópico (BARRY, 1983).

A derme constitui o tecido conjuntivo da pele, derivado do mesoderma, que apóia a epiderme (ARTHUR, 1972; GEORGE, ALVES & CASTRO, 1985). A superfície de contato entre a derme e a epiderme é bastante irregular, formando saliências e reentrâncias. As saliências da derme denominam-se papilas dérmicas. Estas papilas promovem um aumento de contato derme-epiderme, além de propiciar maior resistência à pele (GEORGE, ALVES & CASTRO, 1985).

A derme é formada por duas camadas de limites pouco distintos, a papilar, superficial, e a camada reticular, mais profunda. 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 de nervos. Também são encontradas na derme as seguintes estruturas: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas, e unhas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Colágeno é a denominação genérica dada à família de proteínas que constituem um terço do total de proteínas humanas. Os fibroblastos, células do tecido conjuntivo, secretam colágeno para o meio na forma de um precursor, o tropocolágeno (BARRY, 1983). A polimerização do tropocolágeno forma uma estrutura chamada fibrila colágena, visível apenas no microscópio eletrônico. Estas fibrilas, por sua vez, se associam, unidas por uma substância glicídica, para constituir as fibras colágenas. O conjunto de fibras colágenas forma os feixes colágenos. Há vários tipos diferentes de colágeno, de acordo com a composição das três cadeias peptídicas que formam o tropocolágeno (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1985). Na pele, além dos colágenos tipo I, III e V, também estão presentes o colágeno tipo IV na membrana basal, os colágenos tipo VI e VII na junção derme-epiderme, e os tipos XII, XIII e XIV na derme (ROBERT, 2001).

A derme é rica em fibras elásticas, que se esticam com facilidade e que retornam a sua forma original quando o estímulo externo cessa. As fibras elásticas formam uma rede e são constituídas por uma proteína, a elastina. Sua ultra-estrutura mostra um componente amorfo central com um componente fibrilar periférico. A elastina está presente na porção amorfa da derme (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1985).

A substância fundamental do tecido conjuntivo, na qual encontram-se mergulhadas as células e fibras, é formada por polissacarídeos unidos a proteínas formando as glicoproteínas (BARRY, 1983 GEORGE, ALVES E CASTRO, 1985).

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 à luz ultravioleta (UV). Deste modo, a pele é de máxima importância na adaptação do homem ao meio (ARTHUR, 1972).

1.2 O estresse oxidativo da pele e suas consequências

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

A célula produz radicais livres e outras espécies oxidantes durante o seu metabolismo normal. Um exemplo é a liberação de ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio da mitocôndria durante a síntese de ATP. As espécies reativas de oxigênio produzidas pela célula estão envolvidas em vias de transdução de sinal, ativação celular, controle de diferenciação e crescimento celular (SCHARFETTER-KOCHANEK, 1997a; PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001; THOMAS, 2000).

A formação de espécies reativas de oxigênio na pele, induzida pela radiação ultravioleta, é baseada na absorção de fótons por substâncias celulares, chamadas de moléculas fotossensíveis ou cromóforos. Riboflavina, porfirina, bilirrubina, NADH, triptofano e melanina são exemplos de cromóforos encontrados em células de mamíferos (PODHAISKY *et al.*, 2002, TEDESCO *et al.*, 1997). Estas reações de oxidação por fotossensibilização podem ocorrer como reações TIPO I e TIPO II. A absorção de energia por uma molécula fotossensível resulta em uma espécie eletronicamente excitada. O cromóforo excitado subsequentemente reage com outro substrato (reação TIPO I) ou com oxigênio (reação TIPO II) (FOOTE, 1991). Os produtos resultantes das reações TIPO I são radicais ou íons radicais, enquanto que as reações TIPO II produzem espécies reativas de oxigênio (**Figura 2**) (FOOTE, 1991; SCHARFETTER-KOCHANEK, 1997a; PODHAISKY *et al.*, 2002).

Figura 2: Esquema das reações de fotossensibilização Tipo I e Tipo II, (FOOTE, 1991)

MF – Molécula fotossensível

MF* - Molécula fotossensível excitada

MF_{ox} - Molécula fotossensível oxidada

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o primeiro radical formado na redução do oxigênio molecular pelo ânion radical da molécula fotossensível. Esta espécie reativa de oxigênio também pode ser formada de outras maneiras como, por exemplo, por fagócitos ativados, desempenhando um papel importante na destruição de bactérias (BABIOR & WOODMAN, 1990). A enzima superóxido dismutase converte o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que tem facilidade para atravessar membranas (TIEN *et al.*, 1982). Individualmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 reagem lentamente 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).

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

O radical $\cdot\text{OH}$ 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 à formação de um radical orgânico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985).

O oxigênio singlete, formado na reação TIPO II, pode reagir diretamente com ácidos graxos insaturados levando à formação de hidroperóxidos (GIROTTI, 1990).

Outra espécie com possíveis implicações no estresse oxidativo cutâneo é o óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é um mediador biológico implicado em uma variedade de processos biológicos de quase todos os órgãos. Na pele, além de auxiliar na manutenção da homeostase celular, pode também modificar diretamente algumas reações cutâneas. O controle da vasodilatação, a melanogênese, e proteção contra patógenos invasores, são exemplos da atividade biológica de NO na pele (BRUCH-GERHARZ, 1998). Por possuir um elétron desemparelhado, NO é um radical livre. O óxido nítrico, em geral não é reativo com a maioria das espécies não radiculares, mas reage rapidamente com outros radicais livres, como o ânion radical superóxido, radicais peroxila, e o radical hidroxila. Além disto, reage com radicais tirosina, encontrados no sítio ativo de algumas enzimas, em particular ribonucleotídeo redutase. Na presença de oxigênio NO pode levar a formação de dióxido de nitrogênio (NO_2), que é um radical muito mais reativo que o NO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A radiação ultravioleta é descrita como um possível estímulo para a liberação de NO na pele. Existem controvérsias se a liberação de NO induzida por UV faz parte do estresse oxidativo cutâneo, ou se alternativamente, é um componente do sistema antioxidante da pele (PODHAISKY *et al.*, 2002; STEENVORDEN, 1997). Foi demonstrado que o NO produzido por queratinócitos irradiados com UV, estimulou a melanogênese em melanócitos; por outro lado o tratamento tópico com inibidores de enzimas responsáveis pela liberação de NO, preveniu a

indução de eritema por radiação UVB em voluntários humanos (PODHAISKY *et al.*, 2002).

A pele está equipada com uma variedade de antioxidantes capazes de inibir o dano oxidativo (FUCHS *et al.*, 1989). Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, diminuem ou previnem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). Os antioxidantes naturalmente presentes em células são classificados em enzimáticos, ou antioxidantes de alto peso molecular, e não enzimáticos, ou antioxidantes de baixo peso molecular. Os antioxidantes de baixo peso molecular, não sintetizados pelo corpo humano, são o ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E), considerado o antioxidante lipofílico de maior importância. Além destes, estão presentes compostos antioxidantes sintetizados pelo organismo, como a ubiquinona (coenzima Q), o tripeptídeo glutathiona, o polipeptídeo tioredoxina e o ácido lipóico (PODDA & GRUNDMANN & KOLLMANN, 2001). As principais enzimas antioxidantes identificadas na pele são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona redutase (GR) e a glutathiona peroxidase (GPx) (**Figura 3**).

Figura 3 : Esquema representando as principais reações enzimáticas do sistema antioxidante da pele (FREEMAN & CRAPO, 1982)

Também estão presentes na pele enzimas auxiliares, responsáveis pelo suprimento de coenzimas como NADPH/NADH, NADPH ubiquinona redutase e o sistema tioredoxina/ tioredoxina redutase, que exerce uma importante função antioxidante (FUCHS, 1998). Desta maneira, um sistema antioxidante complexo e interativo protege a pele humana contra o estresse oxidativo. Alguns autores costumam classificar os sistemas de reparo, responsáveis pela remoção de moléculas danificadas, como defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Se todos estes mecanismos falharem, a apoptose e a renovação celular são os mecanismos de defesa derradeiros (FUCHS, 1998).

Os antioxidantes lipossolúveis tocoferol e ubiquinona encontram-se nas membranas e os antioxidantes hidrossolúveis ascorbato e glutathione estão principalmente localizados no citoplasma. Apesar da localização distinta na célula, os antioxidantes de baixo peso molecular não são independentes uns dos outros. Na verdade, como um resultado de potenciais de redução decrescentes, eles podem reduzir uns aos outros e assim restaurar as suas formas ativas. Estes antioxidantes formam uma associação, que também é descrita como rede antioxidante (**Figura 4**).

Figura 4: Rede de antioxidantes de baixo peso molecular. Um radical formado na região lipofílica da célula é reduzido pelo tocoferol localizado nas membranas, levando à formação do radical tocoferoxila. Este pode ser diretamente reduzido por um antioxidante lipossolúvel o ubiquinol. Entretanto o radical tocoferoxila também pode ser reduzido pelo ascorbato, por causa de uma mudança no limite membrana-citosol. A forma oxidada, deidroascorbato, pode ser reconvertida pela glutatona (GSH). A GSH é regenerada a partir da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona redutase, que utiliza NADPH como cofator (PODDA & GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

1.2.2 Alterações na pele causadas pela exposição aguda à radiação ultravioleta

Os primeiros efeitos da exposição aguda à radiação ultravioleta são a síntese de vitamina D, o escurecimento imediato da pele e a ação imunossupressora. Como reações tardias da exposição aguda à UV, pode-se citar a queimadura solar e a pigmentação tardia (TEDESCO *et al.*, 1997). Eritema é o componente clínico mais aparente da reação à queimadura solar, que inclui ainda dano a membranas, distúrbios transientes na síntese de DNA, de RNA e de proteínas e síntese de citocinas e outros mediadores da inflamação (TAYLOR *et al.*, 1990).

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-KOCHANKEK, 1997b). Como foi comentando no item 1.2, 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 por estas radiações (EVELSON *et al.*, 1997; CARBONARE & PATHAK, 1992). Esse dano fotooxidativo é uma consequência da supressão do sistema antioxidante da pele pelas espécies oxidantes (RANGARAJAN & ZATZ, 1999). A essa situação de desequilíbrio dá-se o nome de estresse oxidativo (SIES, 1985). Existem pelo menos três maneiras pelas quais a concentração de antioxidantes pode ser afetada pela radiação ultravioleta: (I) absorção direta de luz; (II) reação com espécies reativas de oxigênio geradas pelas reações de fotossensibilização e (III) mecanismo de recuperação no qual um antioxidante é poupado à custa de outro (LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998).

A radiação solar pode exercer efeitos opostos sobre o sistema antioxidante da pele, dependendo da dose e da seqüência de exposição. Generalizando, a exposição crônica a doses baixas de UV induz e a exposição aguda a doses elevadas de UV inibe antioxidantes distintos (FUCHS, 1998). Na pele exposta a doses que induzem eritema, de UVB ou

de radiação solar simulada, foi observada redução nas concentrações de ácido ascórbico (JURKIEWICZ & BUETTNER, 1994), alfa-tocoferol (FUCHS *et al.*, 1989; SHINDO *et al.*, 1993, LOPEZ-TORRES, 1997); ubiquinol/ubiquinona e glutathione (FUCHS *et al.*, 1989; SHINDO *et al.*, 1993) e a inativação de glutathione peroxidase (LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998), glutathione reductase (FUCHS *et al.*, 1989), superóxido dismutase e catalase (PENCE & NAYLOR, 1990). O efeito da radiação UV no sistema antioxidante da pele varia entre estudos diversos. Estas variações podem estar relacionadas ao tipo de lâmpada empregada (comprimento de onda), à dose de exposição (SHINDO *et al.*, 1994) e ao tempo entre a exposição à radiação e a observação do efeito (PENCE & NAYLOR, 1990).

Entre as primeiras alterações celulares que ocorrem após a exposição à radiação UV, estão a indução de peroxidação lipídica (SHINDO *et al.*, 1994) e o dano ao DNA (FUCHS., 1998). Para se detectar a lipoperoxidação desencadeada por UV na pele pela medida de malonildialdeído (MDA) é necessária uma dose superior à encontrada na natureza de UV (THIELE *et al.*, 1998). Não se observou aumento na produção de MDA após a radiação com UV (lâmpadas TL 40W UVA e simulador solar (Solar Light Co.))(ROPKE, 1999). Apesar disto, ainda não está claro se a peroxidação lipídica ocorre apenas após exposição a doses altas de UV ou se a técnica de medida da produção de MDA não é suficientemente sensível para detectar este tipo de alteração *in vivo* (THIELE *et al.*, 1998; ROPKE, 1999). Estudos *in vitro* com lipoproteínas de baixa densidade demonstraram que a peroxidação lipídica ocorreu quando toda a vitamina E foi consumida (ESTERBAUER *et al.*, 1993).

1.2.3 Alterações da pele pela exposição crônica à radiação ultravioleta

O DNA é o alvo primário da radiação ultravioleta que pode levar a carcinogênese. A radiação ultravioleta produz um grande número de alterações no DNA, destacando-se entre estas a formação de dímeros de

pirimidina, pela ligação covalente de duas pirimidinas adjacentes, na mesma cadeia polinucleotídica (BLACK *et al.*, 1997)

O envelhecimento é acompanhado de uma redução progressiva das funções orgânicas e um aumento da vulnerabilidade a doenças. Particularmente na pele, decréscimos funcionais e doenças associadas à idade são o resultado de insultos ambientais cumulativos com o envelhecimento intrínseco (GILCHREST & YAAR, 1992). O envelhecimento intrínseco consiste nas mudanças que ocorrem em todos os indivíduos ao longo do tempo, enquanto que o fotoenvelhecimento é uma superposição das mudanças atribuídas à exposição solar ao processo de envelhecimento intrínseco (GILCHREST & YAAR, 1998). Em contraste ao envelhecimento intrínseco, a pele fotoenvelhecida não se caracteriza apenas por uma exacerbação das mudanças causadas pelo envelhecimento cronológico, mas também pela presença de alterações qualitativamente diferentes induzidas pela exposição solar (GILCHREST, 1996).

A exposição múltipla à radiação solar, sem proteção adequada, pode produzir efeitos indesejados, como fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (TEDESCO *et al.*, 1997). Estes efeitos parecem estar associados ao impacto direto de fótons no DNA celular, e ao impacto indireto de radicais livres e espécies reativas de oxigênio gerados a partir da absorção de radiação ultravioleta por moléculas fotossensíveis (CARBONARE & PATHAK, 1992). As conseqüências destes impactos são a alteração do padrão de expressão gênica e o dano a componentes celulares. (SCHARFFETER-KOCHANEK, 1997a). Um exemplo é a indução da síntese de metaloproteinases pelos fibroblastos. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de componentes do tecido conjuntivo como colágeno, elastina, proteoglicanas e fibronectina (SCHARFFETER-KOCHANEK, 1997; ONISHI *et al.*; 2000).

As alterações degenerativas conseqüentes de exposições repetitivas à radiação solar ocorrem primeiramente em regiões expostas, como o rosto, pescoço, braços e mãos (CARBONARE & PATHAK, 1992). 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 (EMERIT, 1992; RANGARAJAN & ZATZ, 1999). Além disto, na pele fotoenvelhecida pode haver o desenvolvimento de neoplasmas premalignos e malignos (TAYLOR *et al.*, 1990). As principais alterações na pele relativas ao envelhecimento cronológico (intrínseco) e ao fotoenvelhecimento (extrínseco), encontram-se detalhadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Características da pele no envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento (adaptado de RHEIN & WOLF, 2001).

	Envelhecimento cronológico	Fotoenvelhecimento
Superfície cutânea	Manutenção do padrão geométrico normal. Vai progressivamente exibindo uma textura áspera e escamosa.	Padrão geométrico visivelmente alterado. Torna-se progressivamente áspera e escamosa, apresentando linhas finas e secas.
Estrato córneo	Espessura normal, padrão cestado	Espessura heterogênea, padrão cestado e compactado.
Epiderme viável	Mais fina que o normal. Taxa proliferativa reduzida.	Hiperplasia e atrofia. Taxa proliferativa aumentada.
Junção derme-epiderme	Perda das papilas dérmicas c/ achatamento da junção. Reduplicação modesta da lâmina basal.	Perda das papilas dérmicas c/ achatamento da junção. Reduplicação expressiva da lâmina basal.
Derme	Elastogênese seguida de elastólise. Fibras elásticas emaranhadas. Alteração modesta no tamanho e disposição dos feixes de colágeno.	Elastogênese expressiva, seguida de degeneração, apresentando acúmulo denso de fibras. Alteração moderada no tamanho dos feixes de colágeno.
Microvasculatura	Arquitetura normal.	Vasos sanguíneos dilatados, torcidos e esparsos.
Pigmentação	Produção de melanina deficiente.	Hipo e hiperpigmentação.

1.3 Prevenção do dano fotooxidativo à pele

Entre as estratégias de fotoproteção estão o aumento de absorção e/ou a dispersão de radiação solar. A natureza alcança isto promovendo o aumento da espessura do extrato córneo e da epiderme viável e estimulando a melanogênese. Uma maneira artificial de conseguir este tipo de fotoproteção é a aplicação tópica de filtros solares. Uma outra estratégia de fotoproteção é a inibição da formação e/ou o seqüestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas em consequência da exposição à radiação UV, mediante a aplicação tópica de antioxidantes (FUCHS, 1998, LOPEZ-TORREZ *et al.*, 1998).

Dados pré-clínicos consideráveis foram obtidos indicando o uso potencial de vários antioxidantes na prevenção do dano fotooxidativo à pele.

LOPEZ-TORREZ *et al.* (1998) estudaram o efeito da aplicação tópica de α -tocoferol (5 mg/cm^2) sobre o sistema antioxidante da pele exposta à radiação UV (exposição aguda a um simulador solar; Solar Light Co.), e demonstraram que esta aplicação modula os níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos da pele e inibe de maneira significativa a peroxidação lipídica induzida por radiação UV na epiderme. Uma redução significativa na peroxidação lipídica induzida por UVA em queratinócitos humanos tratados com ascorbato ($10^{-12} - 10^{-6} \text{ M}$) foi observada por TEBBE *et al.* (1997).

A aplicação tópica de α -tocoferol (5%) e ascorbato (5%) na pele de camundongos sem pêlo, antes da irradiação crônica com radiação UVB (30 mJ/cm^2 , 0,5 MED) e UVA (15 J/cm^2), foi eficaz na prevenção do fotoenvelhecimento. A aplicação tópica de palmitato de ascorbila e de acetato de α -tocoferol (**Figura 5**) (pró-fármacos mais estáveis do ponto de vista farmacotécnico) foi menos eficiente na prevenção do fotoenvelhecimento que as formas livres (BISSET *et al.*, 1990).

Figura 5: Estrutura química de antioxidantes empregados em formulações antienvhecimento.

Antioxidantes oriundos de produtos naturais oferecem novas possibilidades de tratamento para doenças mediadas por estresse oxidativo. Algumas enzimas e compostos secundários de plantas superiores foram capazes de proteger tecidos contra dano oxidativo, pela inibição ou seqüestro de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (LARSON, 1988).

Investigou-se o uso potencial de um extrato de alecrim (*Rosmarinus officinales*) no controle do dano fotooxidativo à pele. Observou-se o efeito do extrato na indução da proteína HSP 70 e no aumento de grupos carbonila em proteínas, em fibroblastos expostos a peróxido de hidrogênio. O extrato de alecrim foi capaz de prevenir as alterações no conteúdo de grupos carbonila e de manter os níveis funcionais da proteína HSP 70 (CALABRESE *et al.*, 2001).

O uso de flavonóides (quercetina, hesperetina e apigenina) como agentes fotoprotetores foi investigado. Por inibirem a peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina expostos à UV (lâmpada UV Philips, 254 nm), e por apresentarem uma boa permeação cutânea, BONINA *et al.* (1996) sugerem que a aplicação tópica de flavonóides pode ser uma boa aliada no tratamento de doenças da pele causadas ou exacerbadas pela radiação ultravioleta. Os flavonóides hesperetina e apigenina, quando incorporados em formulações contendo promotores de absorção, foram capazes de prevenir o aparecimento de eritema induzido por UVB na pele de voluntários humanos (SAIJA *et al.*, 1998).

Um outro estudo, que empregou o mesmo modelo experimental de indução de eritema, demonstrou a capacidade do ácido cafeico e do ácido ferrúlico, dois antioxidantes encontrados em muitos vegetais, de inibir o aparecimento de eritema na pele humana, causado por exposição à radiação UVB (SAIJA *et al.*, 2000).

Neste contexto, a pariparoba, *Pothomorphe umbellata* L. Miq, vem demonstrando uma atividade antioxidante significativa nos modelos experimentais desenvolvidos no laboratório. A atividade antioxidante do extrato (hidroalcoólico 50%) liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata*, quando avaliada em ensaios “in vitro”, foi em parte atribuída à presença do 4-nerolidilcatecol (**Figura 6**) (BARROS *et al.*, 1996). Em outro ensaio *in vitro*, o extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata* mostrou um potencial antioxidante significativamente maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado, sugerindo a presença de compostos adicionais com atividade antioxidante (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

Estudos de avaliação da atividade antioxidante do extrato de raiz (hidroalcoólico 50%) liofilizado na pele de camundongos sem pêlo demonstraram que a aplicação tópica deste extrato, foi capaz de causar uma redução de 97% nos indicadores de lipoperoxidação. Foram realizadas medidas de produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e emissão quimiluminiscência, em homogeneizados de pele incubados durante 2h a 37°C. Esta atividade antioxidante foi 2,5 vezes maior que a do

α -tocoferol (utilizado como controle positivo, na concentração de 10%), aplicado nas mesmas condições, sugerindo o emprego do extrato em formulações que tenham por objetivo combater os efeitos danosos causados por radicais livres (RÖPKE, 1999).

Figura 6: 4-nerolidilcatecol (KIJJOA et al, 1980)

1.4 *Pothomorphe umbellata*

Popularmente a espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., além de pariparoba, também é conhecida como capeba, caapeba, caapeba-do-norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira e malvaíско (PANIZZA, 1998). A palavra pariparoba, aparentemente foi *periparoba* na sua grafia primitiva. *Pere*, segundo Montoya, citado por 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). Os índios denominavam as *Pothomorphes* desta maneira por terem as folhas chatas e largas (RIEDEL, 1941).

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

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 (**Figura 7**)(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 inflado e tortuoso (MORAES, 1983)

Segundo a Farmacopéia Brasileira, a raiz de pariparoba não deve deixar mais de oito por cento de cinza pela calcinação (SILVA, 1926). Os ensaios preliminares, visando detectar a presença de grupos de princípios ativos, realizados por Marlene Silva de Moraes (MORAES, 1983), não detectaram a presença de alcalóides, flavonóides e antraderivados. Os extratos de partes aéreas e de raízes de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq apresentaram reações positivas para saponinas, óleos essenciais, taninos e compostos fenólicos, esteróides e mucilagens. As reações positivas de precipitação com acetato de cobre, e de coloração com cloreto férrico, indicam a presença de compostos fenólicos ao passo que a não adstringência da droga indica a ausência de taninos.

A *Pothomorphe umbellata* é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como: insuficiência renal, males do fígado, má digestão, bronquite asmática e, externamente, no tratamento de queimaduras e feridas comuns (MORAES, 1983). A Farmacopéia Brasileira, em sua primeira edição, oficializou o uso da pariparoba, *Pothomorphe umbellata* L. Miq, no Brasil, registrando como droga as raízes secas do vegetal (SILVA, 1926). Constam 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 observação empírica da ação farmacológica dessa planta levou ao seu emprego internamente e em pequenas doses, como excitante das funções do

estômago e do fígado, por fazer aumentar o apetite, ativar a digestão, tal como um amargo aromático, e promover o escoamento da bile, como colagogo que é. Essas plantas gozam, evidentemente, um largo prestígio e aceitação que datam de tempos remotos e que vêm dos aborígenes (FREITAS 1999, PECKOLT, 1941).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926), a raiz de *Pothomorphe umbellata* apresenta-se no comércio em fragmentos muito irregulares, cujo diâmetro varia de 5 a 30 mm, sendo uns provenientes da cepa principal, cilíndricos, outros são tuberculosos, inflados, mais ou menos tortuosos ou dobrados sobre si mesmos. Sua superfície externa é de cor pardo acinzentada, estriada longitudinalmente, e contém numerosas saliências verrucosas de cor escura. Sua secção transversal apresenta uma casca relativamente delgada e que se diferencia nitidamente do cilindro lenhoso, o qual apresenta uma estrutura radiada muito nítida e envolve uma medula mais ou menos desenvolvida. Seca, a raiz de pariparoba (*Pothomorphe umbellata*) é muito fracamente aromática e possui sabor fracamente acre e aromático (RIEDEL, 1941).

Figura 7: Folha de *Pothomorphe umbellata* L. Miq.

1.5 Permeação cutânea e atividade antioxidante

A fim de exercer sua atividade antioxidante, no caso de uma aplicação externa, o fármaco deve primeiro permear a pele, que funciona como barreira de permeação para certas substâncias. Como a radiação UV penetra até as camadas mais profundas da pele, a aplicação tópica de princípios ativos com atividade antioxidante só pode trazer uma proteção satisfatória se estes princípios ativos penetrarem até as camadas cutâneas mais profundas (SAYA *et al.*, 2000). A absorção percutânea envolve três etapas: a dissolução do fármaco (permeante) no veículo, a difusão do fármaco solubilizado do veículo para a superfície da pele e a penetração do fármaco através das camadas da pele. A etapa mais lenta do processo de absorção percutânea envolve a passagem do fármaco pelo estrato córneo da pele, o que torna este passo o fator limitante deste processo (MARTIN & BUSTAMANTE, 1993).

O estrato córneo é uma barreira de permeabilidade que previne a perda de água, possibilitando assim a vida em um ambiente relativamente seco. Esta função barreira depende da presença de uma mistura única de lipídios nos espaços intercelulares do estrato córneo (WERTZ, 2000). Esta barreira lipídica é formada por pilhas de bicamadas de natureza cristalina e hidrofóbica, ricas em ceramidas, colesterol e ácidos graxos (LÓDEN, 2001). A barreira lipídica se estende de maneira contínua por todo o estrato córneo (VACATA *et al.*, 2001).

Além da composição lipídica, a estrutura lamelar na qual estes lipídios se encontram organizados desempenha um papel determinante na função barreira do estrato córneo (ACT *et al.*, 2001). O corpo das camadas bilamelares de lipídios foi descrito como domínios cristalinos/gelificados envoltos por lipídios em um estado cristalino e fluido. Mudanças no conteúdo lipídico e na organização dos lipídios intercelulares influenciam a função barreira (LÓDEN, 2001).

É a lipofilicidade do composto penetrante que determina a sua distribuição no estrato córneo. No geral, a lipofilicidade, representada por $\log P$ (logarítmo do coeficiente de partição octanol/água), é levada em conta, nas primeiras etapas da determinação da permeação percutânea de um composto. No caso de um princípio ativo que deve permanecer na pele (efeito reservatório), afim de exercer sua atividade biológica neste local, é interessante que a substância possua um coeficiente de partição octanol/água maior que 1 (ACT *et al.*, 2001). Neste sentido, o 4-nerolidilcatecol apresentou coeficiente de partição octanol/água de 6,032, em um estudo realizado por FREITAS (1999), demonstrando sua afinidade pelo estrato córneo.

Apesar da lipofilicidade ser um dado importante para prever a permeação de um fármaco, os modelos que são derivados da natureza química da substância, e que dão informações quantitativas sobre a permeabilidade de compostos, geralmente não levam em conta fatores biológicos e do veículo (ACT *et al.*, 2001).

A absorção percutânea pode ser melhorada pela escolha de um veículo apropriado (IDSON, 1983, PIROT *et al.*, 1996). A partição do fármaco entre o veículo e o estrato córneo resulta em um gradiente de concentração que se desenvolve através da pele. Este gradiente de concentração é influenciado pelas interações do permeante com o veículo e com a pele. As interações primárias relevantes ao permeante e ao veículo são governadas pela solubilidade da droga e a sua mobilidade de difusão no veículo (HILTON *et al.*, 1994). Além da solubilidade, fatores como concentração do permeante e pH podem influenciar as interações veículo - permeante - pele (WESTER e MAIBACH, 1983). A composição do veículo pode causar alterações na função de barreira do estrato córneo e desta forma influenciar o perfil de difusão do permeante (WESTER e MAIBACH, 1983; IDSON, 1983). Um exemplo é o efeito oclusivo que uma emulsão pode ter sobre a pele, condição na qual a hidratação do estrato córneo aumenta, resultando em uma maior penetração do fármaco (permeante)

(RANGARAJAN & ZATZ, 1999). Na **Tabela 2** estão descritos os principais fatores que influenciam a permeação cutânea de um composto.

Tabela 2: Fatores que influenciam a permeação cutânea (ACT *et al.*, 2001)

Fatores	Exemplos	
Biológicos	Espessura	Hidratação
	Idade	Região
	Fluxo sanguíneo	Espécie
	Metabolismo	
Do Permeante	Peso molecular	Dissociação
	Coeficiente de partição	Concentração
	Solubilidade	Tamanho
	Ligação	
Do Veículo	Promotores	Liberação
	Oclusividade	Atividade termodinâmica
	Sulfactantes	pH
Físicos	Temperatura	Tempo
	Clima	

2. Objetivos

- Estudar a influência de três formulações diferentes (gel, gel-creme, emulsão O/A) sobre a absorção percutânea do 4-nerolidilcatecol.
- Comparar a absorção do 4-nerolidilcatecol isolado com a absorção do composto a partir de duas formulações preparadas com o extrato seco da raiz de *Pothomorphe umbellata*.
- Avaliar o efeito da aplicação tópica do extrato de *Pothomorphe umbellata* sobre as alterações induzidas na pele, pelas exposições crônica e aguda à radiação ultravioleta (UVB).

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos

Liofilizador Edwards do Brasil, moinho de facas e martelo, tamis de malha 40, Lâmpada UVB Philips TL12R 40W, Centrífuga refrigerada de mesa Eppendorf 5403, Espectrofotômetro Hitashi U-3210, homogenizador Ultra Turax e homogenizador Potter-Elvehjem MARCONI, Máquina fotográfica SPF Asahi Pentax acoplada a um microscópio cirúrgico MC-M9 (BF Vasconcellos), Microscópio Olympus BX50, acoplado à uma câmara fotográfica Sony CCD-Iris.

O sistema cromatográfico utilizado para determinação da concentração de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol, foi composto de bomba Waters Model 510, injetor 7161 Rheodyne dotado de loop de 20 μ L, detector eletroquímico HP1049A, constituído de um eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products. Para determinação de ácido ascórbico e glutatona oxidada e reduzida, o sistema cromatográfico foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Waters, modelo 481-LC em comprimento de onda de 254 e 220 nm, respectivamente. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products.

3.2 Reagentes

Metanol Omnisolv[®], etanol e hexano Lichrosolv[®] e KCl foram de procedência Merck (Darmstadt, Alemanha). LiClO₄ foi obtido da Aldrich. O 4-nerolidilcatecol, utilizado como substância química de referência, foi uma doação do Prof. Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da USP (estrutura confirmada por RMN), e o α -tocoferol utilizado como padrão foi adquirido da SIGMA (SIGMA, St Louis, MO, USA).

Citocromo c, xantina oxidase, NADPH, glutathione redutase, glutathione oxidada e reduzida e hidroxitolueno butilado (BHT) foram de procedência SIGMA (SIGMA, St Louis, MO, USA). Os ingredientes utilizados para manipulação das formulações foram adquiridos da Galena Ind. e Comércio S.A e os demais reagentes de procedência Merck.

3.3 Coleta e processamento das raízes de *Pothomorphe umbellata*

As raízes de *Pothomorphe umbellata* foram coletadas no câmpus da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária. Uma amostra encontra-se depositada no Instituto de Botânica 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.

3.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico

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

3.5 Escolha e preparação das formulações de uso tópico utilizadas nos ensaios de permeação

As formulações utilizadas neste trabalho foram preparadas segundo a composição de formulações apresentadas em um estudo de penetração de vitamina A na pele (CAMPOS *et al.*, 1998).

Após realização de testes de bancada, variando-se as concentrações de alguns componentes para se alcançar a melhor consistência para aplicação das formulações no dorso dos animais, optou-se pelas formulações apresentadas na **Tabela 3**. A concentração de propilenoglicol, mesmo podendo influenciar na permeação, foi mantida como no trabalho original (10%), por poder auxiliar na estabilização do princípio ativo (4-nerolidilcatecol) nas formulações (IDSON, 1980; BARRY, 1988).

Tabela 3: Formulações empregadas no ensaio de absorção percutânea

	<i>Creme O/A</i>	<i>Gel-Creme</i>	<i>Gel</i>	<i>Gel de P. umbellata</i>	<i>Gel-Creme de P. umbellata</i>
Carbômero 940		0,30	0,60	0,60	0,30
Propilenoglicol	10	10	10	10	10
Trietanolamina		0,25	0,50	0,50	0,25
Vaselina líquida	6,0				
Cetiol V®	3,0	1,5			1,5
Lanette N®	5,0	2,5			2,5
Nipagin®	0,15	0,15	0,25	0,25	0,15
Nipazol®	0,05	0,05			0,05
4-nerolidilcatecol	0,10	0,10	0,10		
Extrato seco da raiz de <i>P. umbellata</i>				0,42*	0,42*
Água destilada q.s.p.	100%	100%	100%	100%	100%

* porcentagem estabelecida após determinação da concentração de 4-nerolidilcatecol no extrato seco (23,7%) (item 3.8).

3.6 Animais

Foram utilizados camundongos sem pêlo do laboratório Medlab (São Paulo), com aproximadamente 10 semanas de idade.

3.7 Validação das metodologias analíticas empregadas na padronização do extrato de *P. umbellata*, nos ensaios de permeação cutânea e na avaliação dos antioxidantes não enzimáticos da pele

Antes dos ensaios de permeação cutânea e avaliação dos efeitos da exposição aguda à radiação ultravioleta, a metodologia analítica empregada para determinação de 4-nerolidilcatecol, α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatona oxidada e reduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi validada conforme o “GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS” publicado pela ANVISA por meio da resolução – RE nº 475, de 19 de março de 2002.

3.7.1 Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol

- A curva de calibração foi construída a partir das sextuplicatas de 5 concentrações diferentes, sendo o cálculo de regressão linear realizado pelo método dos mínimos quadrados.
- A precisão (intra e inter-corrida) foi expressa como coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula: $CV = DP / CMD$, onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.
- A exatidão (inter e intra-dia) foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

- O limite de detecção (LD) foi expresso pela equação: $LD = (DP \times 3,3) / ic$, onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas de calibração e ic é a inclinação da curva de calibração.
- O limite de quantificação (LQ) foi expresso pela equação: $LQ = (DP \times 10) / ic$.
- A avaliação da estabilidade do 4-NC em solução etanol: água (1:1) a 37 °C em cinco tempos diferentes (0; 8; 10; 11,5 e 24 hs), informação importante para o estudo de permeação cutânea (item 3.9).
- As curvas de recuperação para o α -tocoferol e o 4-NC foram construídas a partir dos homogeneizados de pele. As substâncias foram adicionadas ao tubo de homogeneização, antes da homogeneização, levando em consideração as diluições do processo de extração. Para os ensaios de recuperação utilizou-se uma adaptação do método proposto por Burton (BURTON & INGOLD, 1985) para extração de α -tocoferol de tecidos. 100 mg de tecido (pele) foram homogeneizados em um homogeneizador Ultra-Turax, em 1mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0. Adicionou-se 300 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 600 μ L de metanol a 300 μ L deste homogeneizado e agitou-se em vórtex durante 20 s. Ao tubo foram então adicionados 6 mL de hexano e a mistura foi agitada no vórtex durante 3 min. Após breve centrifugação (3 min, 1000 rpm) a fração hexânica foi retirada (3mL) e evaporada em atmosfera de nitrogênio. As amostras foram então ressuspensas em 500 μ L de etanol Lichrosolv. Para construção da curva de recuperação de 4-NC foram adicionadas ao homogeneizado de pele as concentrações de 2,5 μ g/mL, 0,625 μ g/mL e 0,156 μ g/mL. Para construção da curva de recuperação de α -tocoferol foram escolhidas as concentrações de 0,5 μ g/mL, 0,1 μ g/mL e 0,025 μ g/mL.

Sistema cromatográfico e condições do detector

O sistema cromatográfico foi composto de bomba Waters Model 510, injetor 7161 Rheodyne dotado de loop de 20 μ L, detector eletroquímico HP1049A, constituído de um eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products. A fase móvel utilizada foi metanol:água 90:10, contendo KCl 2 mM e LiClO₄ 20mM para o 4-NC e metanol:água 95:5, contendo KCl 2 mM e LiClO₄ 20mM para o α -tocoferol, com um fluxo 1.0 mL/min. Coluna Supelcosil LC-8, 3 μ m, 75X4,6mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). O detector eletroquímico foi programado da seguinte forma: potencial = 0,600 V; polaridade = oxidação; modo = amperometria.

Linearidade do método analítico para análise de 4-NC

A completa dissolução do princípio ativo 4-NC foi obtida empregando-se a solução etanol: água (1: 1). O tempo de retenção do 4-NC no sistema cromatográfico proposto foi de 2,14 minutos (**Figura 9**). A **Figura 8** mostra a relação linear entre as concentrações de 4-NC e as áreas dos picos, tendo sido obtido o coeficiente de correlação (R^2) de 0,998.

Os limites de detecção e de quantificação para o 4-NC foram 0,05 μ g/mL e 0,1767 μ g/mL.

As concentrações de 2,5, 1,25, 0,625, 0,313 e 0,156 foram as escolhidas para a construção da curva padrão do 4-NC (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores da curva de calibração de 4-NC dissolvido em etanol: água (1:1) e avaliação da precisão e exatidão da determinação quantitativa por CLAE

Concentração μg/mL	Média da área do pico*	Desvio- Padrão	CV% inter- corrida	CV% intra- corrida	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia
2,5	795876	58312	7,3	2,4	103,32	99,98
1,25	392632	17989				
0,625	202265	28458	14	3,5	106,34	101,10
0,313	94598	13126				
0,156	38911	10727	27	18	93,11	91,61

*média de no mínimo 6 injeções

CV – coeficiente de variação

Figura 8: Curva de calibração para análise do 4 –NC no intervalo de concentrações de 0,156 a 2,5 μg/mL, de 4-NC dissolvido em etanol:água referente à linearidade do método

Figura 9: (A) Cromatograma do padrão de 4-NC em ETOH:H₂O, na concentração de 0,625 µg/mL, (B) cromatograma da extração do homogeneizado de pele. (detector eletroquímico, fase móvel metanol:água, 9:1, fluxo 1,0 mL/min)

A curva de calibração do 4-NC dissolvido em etanol: água foi feita para analisar as amostras retiradas do compartimento receptor da célula de Franz. Construiu-se uma outra curva de calibração do 4-NC dissolvido em etanol, para determinação de 4-NC retido na pele, que após sofrer processo de extração foi ressuspendido em etanol. A **Figura 10** mostra a curva de calibração do 4-NC (**Tabela 5**), no intervalo de concentração de 0,156 a 2,5 µg/mL, dissolvido em etanol. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,998, indicando a linearidade do método analítico. O limite de detecção foi de 0,057 µg/mL e o limite de quantificação foi de 0,175 µg/mL para o 4-NC dissolvido em etanol.

Tabela 5: Valores da curva de calibração de 4-NC, dissolvido em etanol Lichrosolv® e avaliação da precisão e exatidão da determinação quantitativa por CLAE.

Concentração µg/mL	Média da área do pico*	Desvio- Padrão	CV% inter- corrida	CV% intra- corrida	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia
2,5	8183886	26104	3,2	1,3	102,87	100,30
1,25	367053	13287				
0,625	180395	4769	2,6	1,0	98,59	100,51
0,313	72341	5506				
0,156	36630	7488	20	18	121,42	130,59

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

Figura 10: Curva de calibração do 4-NC no intervalo de concentração de 0,156 a 2,5 µg/mL de 4-NC dissolvido em etanol, referente à linearidade do método.

Recuperação de 4-NC em homogeneizado de pele

O 4-NC, nas concentrações de 0,156, 0,625 e 2,5 µg/mL, foi adicionado ao homogeneizado de pele (antes da homogeneização) e submetido ao processo de extração. A **Tabela 6** mostra as porcentagens de

recuperação para as diferentes concentrações de 4-NC adicionado aos homogeneizados.

Tabela 6: Valores de recuperação de 4-NC adicionado ao homogeneizado de pele

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Área do pico *	Desvio-padrão	Porcentagem de recuperação
2,5	8487395	85824	103,7%
0,625	165573	20920	91,7%
0,156	33609	8587	91,7%

*média de no mínimo três extrações

A **Figura 11** mostra a curva de recuperação e a **Figura 12** os cromatogramas do padrão de 4-NC e do 4-NC recuperado do homogeneizado de pele.

Figura 11: Curva de calibração do padrão de 4-NC em função da concentração, para o 4-NC recuperado do homogeneizado de pele

Figura 12: Cromatogramas do padrão de 4-NC na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ em etanol (A) e cromatograma do 4-NC recuperado do homogeneizado de pele na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (B) (detector eletroquímico, fase móvel metanol:água 9:1, fluxo 1 mL/min)

Ensaio de estabilidade do 4-NC no meio receptor do ensaio de permeação

O 4-NC se mostrou estável no líquido receptor da célula de Franz, durante o período do experimento (24 horas), como foi comprovado pela análise estatística (**Figura 13**).

Figura 13: Variação da concentração de 4-NC numa solução etanol:água 1:1 a 37°C nos tempos 8, 10, 11,5 e 24h, em relação ao tempo 0. A variação não foi considerada estatisticamente significativa (ANOVA, $F=1,272$ e $p=0,3434$)

Validação do método analítico para α -tocoferol

A precisão e estabilidade (intra e inter-dia) foram avaliados empregando o α -tocoferol nas concentrações de 0,5; 0,1 e 0,025 $\mu\text{g/mL}$ em etanol (**Tabela 7**). O limite de detecção foi de 0,015 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação foi de 0,045 $\mu\text{g/mL}$. A **Figura 14** mostra a relação linear entre as concentrações do α -tocoferol e a área dos picos, obtendo-se o coeficiente de correlação de 0,999.

Tabela 7: Valores da curva de calibração e avaliação da precisão e exatidão da análise do α -tocoferol para determinação por CLAE

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Média da área do pico*	Desvio-Padrão	CV% inter-corrida	CV% intra-corrida	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dia
0,5	644243	21855	3,4	3,8	100,63	101,44
0,25	307003	8585				
0,1	104814	3825	3,6	3,4	100,96	102,89
0,05	53074	2416				
0,025	26666	2779	10,4	10,3	134,29	129,09

*média de no mínimo dez injeções

Figura 14: Curva de calibração do α -tocoferol em etanol no intervalo de concentração de 0,025 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, referente à linearidade do método.

O α -tocoferol, foi adicionado ao homogeneizado de pele (antes da homogeneização) nas concentrações de 0,5, 0,1 e 0,025 $\mu\text{g/mL}$, e submetido ao processo de extração. A **Tabela 8** mostra as porcentagens de recuperação para as diferentes concentrações de α -tocoferol adicionado aos homogeneizados, descontando-se a área referente ao α -tocoferol, presente na pele não adicionada.

A **Figura 15** mostra a curva de recuperação do α -tocoferol adicionado ao homogeneizado. Na **Figura 16**, estão os cromatogramas do padrão de α -tocoferol e do α -tocoferol recuperado do homogeneizado de pele.

Tabela 8: Valores de recuperação do α -tocoferol adicionado ao homogeneizado de pele

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Área do pico*	Desvio Padrão	Porcentagem de recuperação
0,5	605788	51178	94,03%
0,1	116555	6941	111,20%
0,025	18800	985	80,70%

*média de no mínimo três extrações, descontando-se a área do α -tocoferol presente na pele não adicionada (71545).

Figura 15: Curva de calibração do α -tocoferol recuperado do homogeneizado de pele

Figura 16: Cromatogramas do padrão de α -tocoferol na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ em etanol (A) e do α -tocoferol extraído do homogeneizado de pele não adicionado (controle) (B). Tempo de retenção 3,33. (detector eletroquímico, fase móvel metanol:água 95:5, fluxo 1,0 mL/min)

3.7.2 Validação da metodologia analítica para determinação de ácido ascórbico em pele

Para determinação do ácido ascórbico foi empregada a metodologia proposta por WAYNER *et al.* (1989). Para construção da curva de recuperação o princípio ativo foi adicionado ao tubo de homogeneização, antes da homogeneização, levando-se em consideração as diluições do processo de extração. 100 mg de tecido (pele) foram homogeneizados em um homogeneizador Ultra-Turax, em 1mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0. Este homogeneizado foi centrifugado a 13000 g, durante 10 min a 4°C, em uma centrífuga refrigerada de mesa Eppendorf 5403. O sobrenadante foi utilizado como amostra. Antes da injeção no sistema cromatográfico, o sobrenadante foi diluído 1:2 (v/v) em ácido metafosfórico 10% em água e centrifugado por 4 minutos. O sobrenadante foi novamente diluído 1:2 (v/v) em ácido metafosfórico 0,2% e filtrado, em filtro de acetado de celulose, 0,22 μ m.

Sistema cromatográfico e condições do detector

O sistema cromatográfico foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Waters, modelo 481-LC em comprimento de onda de 254 nm, coluna Waters C18 (3,9X300mm), 10 μ m. A fase móvel utilizada foi ácido metafosfórico 0,2% em água com fluxo 0,7 mL/min.

Linearidade do método analítico para análise de ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi diluído na fase móvel (ácido metafosfórico em água 0,2%), obtendo-se as concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125 μ g/mL (**Tabela 9**). O tempo de retenção do ácido ascórbico no sistema cromatográfico foi de 6,24 minutos (**Figura 18**). A **Figura 17** mostra a relação linear entre as concentrações de ácido ascórbico e as áreas dos

picos, tendo sido obtido o coeficiente de correlação (R^2) de 0,996. O limite de detecção foi de 0,26 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação de 0,79 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 9 : Valores da curva de calibração de ácido ascórbico dissolvido em fase móvel (ácido metafosfórico em água, 0,2%)

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Média da área do pico*	Desvio-Padrão	CV% inter-corrida	CV% intra-corrida	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia
10	749733	101904	13,6	9,3	102,8	107,0
5	403462	43375				
2,5	236599	25955	10,9	6,1	115,2	114,1
1,25	119251	8198				
0,625	58849	6121	10,4	2,1	75,2	81,7
0,3125	28229	4259				

*média de no mínimo seis injeções

Figura 17: Curva de calibração para análise do ácido ascórbico no intervalo de concentrações de 0,3215 a 10 $\mu\text{g/mL}$, referente à linearidade do método

Figura 18: (A) Cromatograma do padrão de ácido ascórbico (↓) e (B) cromatograma do homogeneizado de pele mostrando o pico do ácido ascórbico (↓) (detector ultravioleta, fase móvel ácido metafosfórico em água 0,2%, fluxo 0,7 mL/min)

Recuperação do ácido ascórbico de homogeneizados de pele

O ácido ascórbico nas concentrações de 10; 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado ao homogeneizado de pele (antes da homogeneização) e submetido ao processo de extração. A **Tabela 10** mostra as porcentagens de recuperação para as diferentes concentrações de ácido ascórbico adicionado aos homogeneizados. Na **Figura 19**, está representada a curva de recuperação.

Tabela 10: Valores da curva de recuperação de ácido ascórbico adicionado ao homogeneizado de pele

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Área do pico*	Desvio-Padrão	Porcentagem de recuperação
10	1022074	99506	135%
5	406080	40277	103,4 %
2,5	281339	24973	114,8%

*média de duas determinações menos a área do controle (288460)

Figura 19: Curva de calibração do padrão de ácido ascórbico em função da concentração, para o ácido ascórbico recuperado do homogeneizado de pele

3.7.3 Validação da metodologia analítica para determinação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em pele

A metodologia empregada foi modificada a partir das propostas por Speisky *et al.* (1985) e Lauterburg *et al.* (1980). Para construção da curva de recuperação, os princípios ativos foram adicionados ao tubo de homogeneização, antes da homogeneização, levando-se em consideração as diluições do processo de extração. 100 mg de tecido (pele) foram homogeneizados em um homogeneizador Ultra-Turax, em 1mL ácido perclórico 5% contendo EDTA 2mM. Este homogeneizado foi centrifugado a 13000 g, durante 10 min a 4°C, em uma centrífuga refrigerada de mesa Eppendorf 5403. O sobrenadante foi utilizado como amostra. Antes da injeção no sistema cromatográfico, as amostras foram diluídas 1:4 (v/v) em ácido metafosfórico 0,05% em água e filtradas em um filtro de acetado de celulose 0,22 µm.

Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Waters, modelo 481-LC em comprimento de onda de 220 nm, coluna Waters C18 (3,9X300mm), 10 μ m. A fase móvel utilizada foi composta de ácido metafosfórico 0,05% em água com fluxo 0,7mL/min.

Linearidade do método

A glutathiona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) foram diluídas na fase móvel (ácido metafosfórico 0,05% em água). O tempo de retenção da GSH no sistema cromatográfico foi de 6,38 e da GSSG 13,73 minutos, respectivamente. As **Figuras 20 e 21** mostram a relação linear entre as concentrações de glutathiona e as áreas dos picos, tendo sido obtido o coeficiente de correlação (R^2) de 0,999 para GSH e 0,999 para GSSG. Nas **Tabelas 11 e 12** encontram-se os valores escolhidos para a construção das curvas-padrão. O limite de detecção e o limite de quantificação para GSH foram 0,0375 μ g/mL e 0,11 μ g/mL, respectivamente. Para GSSG o limite de detecção foi de 0,107 μ g/mL e o limite de quantificação de 0,32 μ g/mL.

Tabela 11: Valores da curva de calibração de glutathiona reduzida (GSH) dissolvida em fase móvel (0,05% de ácido metafosfórico em água).

Concentração μ g/mL	Média da área do pico*	Desvio-Padrão	CV% inter-corrida	CV% intra-corrida	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia
4,8	978592	17206	1,75	1,78	99,51	99,02
2,4	497639	9545				
1,2	252114	5680	2,25	2,56	102,99	103,20
0,6	121948	12450				
0,3	55496	4128	7,44	3,1	92,56	96,15
0,15	25183	2684				
0.075	13000	1149	8,83	1,10	94,12	101,43

*média de no mínimo 6 injeções

Figura 20: Curva de calibração para análise de GSH no intervalo de concentrações de 0,075 a 4,8 $\mu\text{g/mL}$, referente à linearidade do método

Tabela 12: Valores da curva de calibração de glutathiona oxidada (GSSG) dissolvida em fase móvel (0,05% de ácido metafosfórico em água).

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Média da área pico*	Desvio-Padrão	CV% inter-dia	CV% intra-dia	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia
9,6	1784213	34024	1,9	1,7	99,63	98,93
4,8	901767	10759	1,19			
2,4	456998	5571	1,22	1,03	102,87	103,36
1,2	216696	4385	2,02			
0,6	101036	5130	5,07	5,75	94,32	96,90
0,3	43032	1870	4,34			
0,15	25744	1918	7,4	7,4	108,96	108,95

*média de no mínimo 6 injeções

Figura 21: Curva de calibração para análise de GSSG no intervalo de concentrações de 0,15 a 9,6 µg/mL, referente à linearidade do método

Recuperação de GSH e GSSG de homogeneizados de pele

A glutathiona reduzida e a glutathiona oxidada foram adicionadas ao homogeneizado de pele (antes da homogeneização), nas concentrações de 4,8; 1,2 e 0,3 µg/mL e submetidas ao processo de extração. As **Tabelas 13** e **14** mostram as porcentagens de recuperação para as diferentes concentrações de GSH e GSSG, respectivamente. Nas **Figuras 22** e **23** estão representadas as curvas de recuperação para GSH e GSSG, respectivamente. A **Figura 24** mostra os cromatogramas do padrão de GSH e GSSG e da glutathiona oxidada e reduzida recuperadas do homogeneizado de pele.

Tabela 13: Valores da curva de recuperação de GSH

Concentração (µg/mL)	Média da área do pico*	Desvio-Padrão	Porcentagem de recuperação
4,8	1424743	102387	100,7%
1,2	335494	40729	92,2%
0,3	92813	1041	107,2%

*média de três determinações menos a área do controle (972043)

Figura 22: Curva de calibração do padrão de GSH em função da concentração, para o GSH recuperado do homogeneizado de pele

Tabela 14: Dados da curva de recuperação de GSSG

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média da área do pico*	Desvio-Padrão	Porcentagem de recuperação
4,8	2318075	26325	101,6%
1,2	595532	28429	104,2%
0,3	141502	27683	103,4%

*média de três determinações menos a área do controle (70221)

Figura 23: Curva de calibração do padrão de GSSG em função da concentração, para o GSSG recuperado do homogeneizado de pele

Figura 24: (A) Cromatograma do padrão de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e (B) cromatograma do homogenato de pele com os picos de GSH e GSSG (detector UV, fase móvel ácido metafosfórico 0,05% em água, fluxo 0,7%)

3.8 Padronização do extrato de *Pothomorphe umbellata*

Seis amostras do extrato seco da raiz de *P. umbellata* foram pesadas em balança analítica e diluídas em balões volumétricos até a concentração de 2,5 µg/mL.

Para o extrato seco da raiz de *P. umbellata* na concentração de 2,5 µg/mL em etanol:água 1:1 (v/v), média de seis determinações, a média das concentrações de 4-nerolidilcatecol para 6 determinações foi de $0,63 \pm 0,06$ µg/mL, o que equivale a uma concentração de 23,7% de 4-nerolidilcatecol no extrato.

3.9 Estudos de permeação *in vitro*

A permeabilidade de uma membrana pode ser estudada *in vitro* através do uso de uma célula de difusão. No nosso ensaio trabalhamos com uma célula de Franz modificada.

Após o sacrifício com éter de camundongos sem pêlo (10 semanas de idade), a pele dorsal foi retirada e a fáscia e a cútis foram removidas com gaze e tampão fosfato de sódio pH 7,4. Os cortes de pele foram então montados em células de Franz modificadas (1,61 cm² de área de superfície) (**Figura 25**). Seiscentos miligramas das formulações testadas (um gel, um gel-creme e um creme O/A contendo 0,1% de 4-NC e um gel e um gel-creme contendo extrato de *P. umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC – dose infinita) foram aplicados à superfície epidérmica da pele, cobrindo completamente a área de pele exposta. A solução receptora utilizada foi etanol:água (1:1, v/v) (TOUITOU & FABIN, 1988), para garantir a total dissolução do 4-NC, possibilitando a criação de um fluxo de ordem zero, necessário para aplicação do modelo matemático (SHAH, 1993). Uma vez que compostos insolúveis em água podem não ter uma partição adequada em um meio receptor, dificultando a criação de condições adequadas ao estudo de permeação (BRONAUGH & STEWARD, 1983). O meio receptor foi mantido a 37°C e sob agitação durante a realização dos experimentos. Foram retiradas amostras (600 µL) em tempos predeterminados (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 11,5; e 24h) durante o processo de absorção. A cada coleta, o volume de amostra retirado era repostado com solução receptora. Cada ensaio de permeação teve uma duração de 24 horas. As amostras coletadas foram analisadas no sistema cromatográfico descrito no item 3.7.1.

Figura 25: Célula de Franz

Terminados os ensaios de permeação *in vitro*, a pele foi removida da célula de Franz e lavada com tampão fosfato 140 mM NaCl 40 mM pH 7,4. Os cortes de pele foram reduzidos a fragmentos menores, homogenizados (1:10 p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, em um homogenizador Ultra-Turax e, subsequente em um homogenizador Potter-Eveljem. Para extração do 4-nerolidilcatecol do homogenado de pele utilizou-se uma adaptação do método descrito por Burton e Ingold, para extração de α -tocoferol de homogenatos de tecido (BURTON & INGOLD, 1985), descrita no item 3.7.1.

3.10 Avaliação dos efeitos da exposição aguda à radiação ultravioleta sobre o sistema antioxidante da pele

3.10.1 Tratamento dos animais

Camundongos sem pêlo foram separados em 4 grupos de tratamento: controle, controle irradiado, controle irradiado tratado com gel

base, e grupo irradiado tratado com gel contendo extrato de *P. umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC. Os animais receberam tratamento tópico duas horas antes da irradiação, conforme protocolo proposto por BISSET (1989). A formulação gel foi escolhida para este ensaio, com base nos resultados obtidos a partir dos ensaios de permeação.

Os animais foram colocados em cubas cromatográficas e irradiados, com uma lâmpada UVB Philips TL12 RS, durante 30 minutos (2MED), com uma dose de 230 mJ/cm^2 (Figura 26). A dose foi medida em um radiômetro International Light IL 1700, com um sensor UVB SED 240, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O espectro de emissão da lâmpada está representado graficamente na Figura 27. A distância entre a lâmpada e o dorso dos animais foi de 21 cm. Os camundongos foram sacrificados através de deslocamento cervical logo após a irradiação.

Figura 26: Sistema de irradiação dos camundongos sem pêlo

Figura 27: Espectro de emissão da lâmpada UVB Philips 40 W/TL12 RS

3.10.2 Preparação do homogeneizado de pele

A pele foi separada, lavada com tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e reduzida a pequenos fragmentos (0,75 –1 g) com auxílio de tesoura. O homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foi obtido em homogeneizador Ultra Turax, seguido de homogeneizador Potter-Elvehjem, e centrifugado a 13000 g durante 10 minutos, em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf 5403. O sobrenadante foi empregado como amostra para determinação de ácido ascórbico e das enzimas do sistema antioxidante da pele. Para determinação da concentração de glutathiona oxidada e reduzida foi feito um homogeneizado de pele 1:10 (p/v) em ácido perclórico 5%, EDTA 2mM. Para determinação do α -tocoferol e da concentração de 4-nerolidilcatecol foi utilizado o homogeneizado 1:10 (p/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

3.10.3 Determinação da concentração dos antioxidantes não enzimáticos

Foi determinada a concentração de α -tocoferol, ácido ascórbico, glutathiona oxidada e reduzida na pele dos camundongos dos 4 grupos do estudo. Também foi determinada a concentração de 4-nerolidilcatecol na pele dos camundongos do grupo tratado com o gel de *P. umbellata* e irradiado e de um grupo tratado com gel de *P. umbellata* e não irradiado.

Os detalhes metodológicos de cada determinação, como sistema cromatográfico e tratamento das amostras, encontram-se descritos no item 3.7.

3.10. 4 Determinação da atividade dos antioxidantes enzimáticos da pele

3.10.4.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase

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

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

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

Os resultados foram expressos em U/g de pele. Uma unidade (U) é definida como a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina a 25°C, em pH 7,8.

3.10.4.2 Determinação da atividade da glutathione peroxidase

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

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

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

Os resultados foram expressos em U/g de pele. Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto a 30°C em pH 7,0.

3.10.4.3 Determinação da atividade da glutathiona redutase

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

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

Os resultados foram expressos em U/g de pele. Uma unidade de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto a 30°C em pH 7,0.

3.10.4.4 Determinação da atividade da catalase

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

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

Os valores de atividade da catalase foram expressos em U/g de pele.

Uma unidade (U) de catalase corresponde a atividade da enzima que hidrolisa 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 30 °C, em pH 8.

3.11 Avaliação dos efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta

3.11.1 Tratamento dos animais

Utilizou-se uma lâmpada UVB Philips TL12rs 40W para irradiação dos camundongos sem pêlo. Os animais foram irradiados quatro vezes por semana, durante 10 min, por um período de 22 semanas. A dose utilizada foi de 76,5 mJ/cm^2 (aproximadamente 0,7 vezes a dose mínima necessária para causar eritema nos animais). A dose foi medida em um radiômetro International Light IL 1700, com um sensor UVB SED 240, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Duas horas antes da irradiação os camundongos foram tratados com gel contendo o extrato de *Pothomorphe umbellata*, na concentração de 0,1% de 4-NC. Ao mesmo tempo foram irradiados camundongos sem tratamento e tratados com gel sem princípio ativo como grupos controle. Um terceiro grupo controle não foi irradiado.

3.11.2 Observações macroscópicas

As observações macroscópicas foram realizadas três dias após o término do período de irradiação. A exposição crônica a radiação UVB está associada à formação de rugas na pele (KLIGMAN, 1989) e a observação visual desta alteração é utilizada para avaliação de substâncias fotoprotetoras (BISSET *et al.*, 1989). A formação de rugas foi classificada segundo uma escala proposta no modelo experimental de fotoenvelhecimento apresentado por BISSET *et al.* (1987) (**Tabela 15**).

Tabela 15: Escala para avaliação do grau de formação de rugas na pele de camundongos sem pêlo.

Grau	Descrição da pele
0	Numerosas estriações finas cobrindo o dorso e os lados do corpo, que aparecem e desaparecem com o movimento.
1	Todas as estriações finas no dorso e ao longo da espinha desaparecem. Poucas rugas superficiais e grosseiras perpendiculares à direção cabeça-rabo, que aparecem e desaparecem com o movimento.
2	Rugas grosseiras e permanentes através do corpo.
3	Rugas profundas e permanentes. Pele com aspecto de couro e sem elasticidade.
4	Pele com aspecto coreáceo apresentando lesões de coloração escura no dorso.

3.11.3 Observações microscópicas

Análise histológica foi realizada na 22^a semana de irradiação. Os animais foram sacrificados 4 dias após a última irradiação para permitir que a pele se recuperasse de efeitos agudos da irradiação. Para observação destes efeitos também foi retirada a pele de animais que foram expostos a uma irradiação aguda. Fragmentos de pele fixados em formaldeído 4% tamponado foram incluídos em parafina e submetidos a cortes de 5 μ m de espessura em micrótomo rotatório. Para estes cortes utilizou-se a coloração pelo método de hematoxilina-eosina.

De cada lâmina foram selecionados três campos, dos quais a imagem foi capturada em um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital. Utilizou-se a altura da epiderme viável como parâmetro de comparação entre os diferentes grupos de tratamento. A análise de imagem foi feita com o auxílio do programa Image Tool 3.00, com o qual foi possível fazer 45 medidas (em μ m) de altura da epiderme viável para cada corte.

3.12 Análise dos Resultados

Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para Múltiplas Comparações, para a localização dos contrastes.

4. Resultados

4.1 Estudos de permeação *in vitro*

Os processos de difusão através de membranas geralmente podem ser explicados matematicamente através das leis de Fick. Fick definiu a difusão como sendo o fluxo (J) através de uma membrana, ou seja, a quantidade de soluto que passa através de uma unidade de área de membrana em determinada unidade de tempo (MARTIN & BUSTAMANTE, 1993).

As concentrações de soluto nas amostras colhidas em uma célula de difusão, em função do tempo, apresentam um curto período, no qual o fluxo do soluto através da membrana é variável. Em seguida podemos notar que o fluxo se torna constante (*steady-state*). À primeira fase damos o nome de período de latência (*lag time*), que pode ser definido como o período requerido para que o soluto estabeleça um gradiente de concentração uniforme na membrana, que separa o compartimento doador e o compartimento receptor (AGACHE, 1994).

O tempo de comportamento não linear dos perfis de permeação mostrados nas **Figuras 28 29, 30, 31 e 32** é o período de latência *lag time*. O cálculo do *lag time* utiliza os pontos da porção linear dos perfis de permeação, ou seja, depois que foi atingido o equilíbrio (*steady-state*). A partir destes pontos pós *steady-state*, é possível determinar o fluxo, utilizando-se a inclinação da reta da parte linear do perfil de permeação, sendo que o intercepto no eixo x desta mesma reta fornece o tempo de latência do processo de difusão (BARRY, 1983; SHAH, 1993).

Figura 30: Perfil de permeação do gel-creme, contendo 0,1% de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*).

Figura 31: Perfil de permeação do gel de *P. umbellata*, contendo 0,1% de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

Figura 32: Perfil de permeação do gel-creme do extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata*, contendo 0,1% de 4-nerolidilcatecol e reta de regressão linear da porção linear do perfil de permeação (■ *steady-state*)

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

- Fluxo $J (\mu\text{g/cm}^2 \text{ h}^{-1})$ = inclinação da reta da porção linear do perfil de permeação
- Coeficiente de permeabilidade $P (\text{cm h}^{-1}) = J/C$
- Tempo de latência $T_{\text{lag}} (\text{h})$ = intercepto- x do perfil de permeação linear
- Coeficiente de difusão $D (\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}) = 1/6 e^2 T_{\text{lag}}^{-1}$
- Coeficiente de partição $K = e P D^{-1}$.

Os parâmetros de permeação acima descritos foram calculados para cada ensaio, e os resultados mostrados na **Tabela 16** apresentam a média e o desvio-padrão para três ensaios.

Tabela 16: Parâmetros de difusão para o 4-nerolidilcatecol (4-NC) em diferentes formulações

	Fluxo (J) $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$	Permeabilidade (P) $10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$	Lag time (T_{lag}) h	Coeficiente de Difusão (D) $10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$	Coeficiente de Partição (K)
creme de 4-NC	0,3935±0,0963**	0,3935±0,0963**	4,11±1,04	0,42±0,09	0,09±0,02 ^{EE}
gel-creme de 4-NC	1,350±0,515*	1,50±0,515*	4,48±2,57	0,46±0,25	0,31±0,07
gel de 4-NC	3,799±0,984	3,799±0,984	3,52±1,41	0,56±0,030	0,64±0,28
gel da raiz de <i>P. umbellata</i>	1,516±0,644*	1,516±0,644*	3,26±1,98	0,56±0,39	0,25±0,11 ^E
Gel-creme da raiz de <i>P. umbellata</i>	0,237±0,79**	0,237±0,79**	3,55±2,46	0,81±0,45	0,003±0,001 ^E

** p<0,001; *p<0,01 em comparação ao gel de 4-NC 0,1%

^{EE}p<0,01; ^E p<0,05 em comparação ao gel de 4-NC 0,1%

Após o término do experimento avaliou-se a quantidade de 4-nerolidilcatecol retido na pele. Empregando o método descrito no item 3.10, obteve-se uma diferença significativa entre a quantidade de 4-NC, retida na pele após 24 h, da formulação gel de 4-NC em relação às demais formulações.

*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001 em comparação ao gel de 4-NC 0,1%.

Figura 33: Concentração de 4-NC na pele utilizada nos ensaios de permeação *in vitro*. As colunas e barras representam a média e o desvio padrão de três ensaios

4.2 Ensaios de exposição aguda à radiação ultravioleta

Para estes ensaios empregou-se o gel, por ter tido melhor desempenho no estudo de permeação (**Figura 33**). Os animais foram separados em 4 grupos de tratamento: controle (C.), controle irradiado (C. irradiado), controle irradiado tratado com gel base (C. gel) e tratados com gel contendo extrato de *P. umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiados (P.u.). Os resultados foram expressos em porcentagens remanescentes (de concentração e atividade), após irradiação com UVB, considerando-se 100% o controle de cada experimento, totalizando um número de 6 animais para cada grupo de tratamento (**Figuras 34 e 35**).

Figura 34: Porcentagens das concentrações remanescentes dos antioxidantes enzimáticos após irradiação com UVB, em relação ao grupo controle. Controle irradiado (I.); controle gel irradiado (G.) e *P. umbellata* irradiado (P.u.). Atividade no grupo controle (U/g de pele, média de 6 animais), CAT $247,07 \pm 61,77$; SOD $223,53 \pm 127,94$; GPx $3,39 \pm 0,60$; GR $1,30 \pm 0,25$. Não houve diferença significativa entre os tipos de tratamento na atividade enzimática de cada antioxidante

Figura 35: Porcentagens das concentrações remanescentes dos antioxidantes não enzimáticos após irradiação com UVB, em relação ao grupo controle. Controle irradiado (I.); controle gel irradiado (G.) e *P. umbellata* irradiado (P.u.). Concentração no grupo controle ($\mu\text{g/g}$ de pele, média de 6 animais), GSH $238,07 \pm 29,54$; GSSG $17,88 \pm 2,61$; vit. C $93,26 \pm 9,51$; vit. E $7,43 \pm 5,47$; * $p < 0,001$

Quando comparada a concentração de 4-nerolidilcatecol em camundongos tratados com o gel contendo o extrato de *P. umbellata* irradiados com UVB, com a concentração de 4-nerolidilcatecol na pele de camundongos que receberam o mesmo tratamento tópico, mas não foram irradiados, não se obteve diferença estatisticamente significativa (**Figura 36**) entre ambas as concentrações. Apesar disto, o tratamento com *P. umbellata* foi capaz de restaurar a concentração de α -tocoferol nos animais irradiados (os resultados de α -tocoferol foram apresentados novamente em $\mu\text{g/g}$ de pele para ilustrar o efeito da radiação sobre ambos os antioxidantes).

Figura 36: Concentração de 4-NC e de α -tocoferol na pele de camundongos não irradiados (■ C - controle tratado com extrato e não irradiado, $14,14 \pm 3,09 \mu\text{g/g}$ de 4-NC e controle não tratado e não irradiado, $7,43 \pm 4,47 \mu\text{g/g}$ de α -tocoferol), concentração de 4-nerolidilcatecol e de α -tocoferol na pele de camundongos irradiados e tratados com o extrato de *P. umbellata* (■ P.u. – $16,00 \pm 2,38 \mu\text{g/g}$ de 4-NC e $6,77 \pm 3,2 \mu\text{g/g}$ de α -tocoferol) e concentração de α -tocoferol (□ C.I.; $2,75 \pm 2,05 \mu\text{g/g}$) na pele de camundongos não tratados e irradiados. * $p < 0,001$

4.3 Efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta

4.3.1 Alterações macroscópicas

Na análise macroscópica, os camundongos utilizados no ensaio foram numerados e classificados de acordo com a escala para avaliação do grau de formação de rugas na pele de camundongos, proposta por BISSET (1987). Os resultados estão resumidos na **Tabela 16**, enquanto as **Figuras 37 a 41** mostram os diferentes graus de formação de rugas descritos na **Tabela 15**, no dorso de camundongos irradiados e não irradiados. Não foi possível realizar um estudo estatístico das alterações macroscópicas apresentadas pelos camundongos expostos cronicamente à radiação ultravioleta, porque a atribuição de valores numéricos a diferentes intensidades de efeito exige um ensaio estatístico do tipo não paramétrico e para isto precisaria-se de um número de animais muito grande para cada grupo de tratamento.

Tabela 17: Grau de formação de rugas na pele de camundongos irradiados e não irradiados (avaliação visual)

Tratamento	Camundongo	Grau
C.	1	1
C.	2	1
C.	3	0
C.	4	0
C.	5	0
C. I.	6	3
C. I.	7	3
C. I.	8	4
C. I.	9	3
C. I.	10	2
C.G.	11	3
C.G.	12	2
C.G.	13	3
C.G.	14	4
C.G.	15	3
P.u.	16	1
P.u.	17	1
P.u.	18	2
P.u.	19	2
P.u.	20	1

C. - grupo controle não tratado e não irradiado

C.I. - grupo controle não tratado e irradiado

C.G. - grupo controle tratado com gel base e irradiado

P.u. - grupo tratado com gel de *p. umbellata* e irradiado

O grupo controle irradiado não recebeu nenhum tratamento tópico e foi irradiado durante 22 semanas (4 vezes por semana, durante 10 minutos) com a lâmpada de UVB. O grupo controle gel foi tratado com a base gel e o grupo *P. umbellata* foi tratado com o gel contendo o extrato padronizado de

P. umbellata e ambos os grupos foram irradiados duas horas após o tratamento. O grupo controle não recebeu tratamento, nem foi irradiado durante as 22 semanas do experimento.

Figura 37: Foto do dorso do camundongo 4 (grupo controle não irradiado) , exemplo de grau 0

Figura 38: Foto do dorso 16 (tratado com extrato de *P. umbellata*), exemplo de grau 1

Figura 39: Camundongo 10, exemplo de grau 2

Figura 40: dorso do camundongo 15 (grupo tratado com gel e irradiado): exemplo de **grau 3**

Figura 41: dorso do camundongo 8 (grupo controle irradiado), exemplo de **grau 4**

4.3.2 Alterações microscópicas

A análise morfométrica dos cortes histológicos (**Figuras 42 a 47**) da pele dos camundongos expostos cronicamente à radiação ultravioleta veio confirmar estatisticamente a diferença observada entre os animais irradiados que receberam e os que não receberam o tratamento tópico com o gel contendo o extrato de *P. umbellata*. Na **Tabela 18** estão representadas as médias de 5 lâminas, nas quais foram realizadas 45 medidas de altura da epiderme viável.

Tabela 18: Análise morfométrica da altura da epiderme viável dos cortes histológicos de animais expostos e não expostos cronicamente à radiação ultravioleta

Tratamento	Altura da epiderme viável em μm (média do grupo)
Controle	24,88 $\pm$ 8,58
Controle Irradiado	58,11 $\pm$ 12,92*
Controle gel (Irradiado)	59,71 $\pm$ 15,41**
<i>P. umbellata</i> (Irradiado)	32,96 $\pm$ 4.36

*p < 0,05 em relação a *P. umbellata*;

**p<0,01 em relação a *P.umbellata*

Entre as principais alterações microscópicas observadas nos camundongos irradiados em relação ao grupo controle está o aumento de espessura e a compactação do estrato córneo. Observou-se, também, aumento da espessura da camada granulosa de 2 para 6 camadas aproximadamente, com células contendo grânulos de querato-hialina mais densos e mais grosseiros. Observou-se um aumento de celularidade na epiderme, podendo-se identificar multinucleação e apoptose dos queratinócitos. Nos camundongos irradiados pode-se observar uma ordenação dos fibroblastos na derme (paralelismo), tornando-se estes mais alongados e apresentando-se em maior número. Nos camundongos tratados

com extrato de *P. umbellata*, os efeitos da radiação UVB não se fizeram presentes de maneira tão acentuada quanto nos demais camundongos irradiados. Pode-se observar um pequeno aumento da camada granulosa, mas sem aumento nos grãos de querato-hialina. O estrato córneo do grupo P.u., apresentou-se histologicamente semelhante ao estrato córneo do grupo não irradiado. A derme também apresentou semelhança com a do grupo controle.

Figura 42: Fotomicrografia – Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo controle. (Coloração HE. Aumento 400X)

Figura 43: Fotomicrografia – Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo controle irradiado. Observa-se um aumento da celularidade da epiderme e células contendo grânulos de querato-hialina mais densos, o estrato córneo encontra-se mais espesso e compactado. Na derme observa-se uma ordenação dos fibroblastos, tornando-se estes mais alongados e apresentando-se em maior número. (Coloração HE. Aumento 400X)

Figura 44: Fotomicrografia - Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo controle. A seta dupla indica a altura da epiderme viável. A média de 45 medidas para esta lâmina foi $22,71 \pm 4,64 \mu\text{m}$ (Coloração HE. Aumento 400X)

Figura 45: Fotomicrografia - Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo controle irradiado. A seta dupla indica a altura da epiderme viável. A média de 45 medidas para esta lâmina foi $49,98 \pm 12,18 \mu\text{m}$ (Coloração HE. Aumento 400X)

Figura 46: Fotomicrografia - Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo controle gel irradiado. A seta dupla indica a altura da epiderme viável. A média de 45 medidas para esta lâmina foi $64,65 \pm 11,68 \mu\text{m}$ (Coloração HE. Aumento 400X)

Figura 47: Fotomicrografia - Aspecto microscópico da pele de camundongo sem pêlo do grupo *P. umbellata* irradiado. A seta dupla indica a altura da epiderme viável. A média de 45 medidas para esta lâmina foi $26,12 \pm 8,18 \mu\text{m}$ (Coloração HE. Aumento 400X)

5. Discussão

Muitos fatores têm influência sobre a permeação cutânea de um determinado fármaco. A partição do fármaco entre o veículo e o estrato córneo tem como resultado um gradiente de concentração que se desenvolve através da pele e é influenciado pelas interações fármaco-veículo-pele (HILTON *et al.*, 1994). Não há dúvidas que a liberação de uma substância de uma preparação farmacêutica tópica pode ser influenciada pela natureza do veículo utilizado nesta preparação. A formulação correta de uma preparação de uso tópico pode garantir que o fármaco exerça sua atividade máxima na pele (IDSON, 1980).

O primeiro requisito para um tratamento tópico eficaz é que o fármaco incorporado em um veículo alcance a superfície cutânea em concentração adequada, para iniciar o processo de difusão através da membrana. A afinidade relativa do fármaco pela pele e pelo veículo no qual se encontra é representada pelo coeficiente de partição K (IDSON, 1983). No presente ensaio foi possível observar uma diferença significativa entre os valores de K, das formulações gel e creme de 4-nerolidilcatecol 0,1% (**Tabela 16**). Isto pode ser explicado pela natureza química diferente de ambos os veículos. Um valor alto de K indica uma baixa afinidade do veículo pelo fármaco. Valores baixos de K indicam um alto grau de interação mútua, refletindo a tendência do fármaco de permanecer no veículo. Segundo este raciocínio, a liberação do fármaco será favorecida pela escolha de veículos que possuam baixa afinidade por este fármaco (IDSON, 1983). No caso deste ensaio, o gel de 4-nerolidilcatecol apresentou o mais alto valor de coeficiente de partição K. O fato do gel do extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata*, incorporado na concentração de 0,1% de 4-nerolidilcatecol, não ter apresentado um valor de K tão alto quanto o do 4-nerolidilcatecol isolado, provavelmente está relacionado à presença de outras substâncias no extrato bruto, que podem influenciar a afinidade do 4-nerolidilcatecol pelo gel. O ensaio de permeação realizado com a formulação gel-creme contendo o extrato de *P. umbellata*, na concentração de 0,1% de 4-NC, deu mais uma

indicação de que o extrato de alguma forma diminui a permeação do princípio ativo através da pele. Quando comparou-se a permeabilidade do 4-NC isolado com a permeabilidade do 4-NC no extrato, verificou-se que a permeabilidade do 4-NC foi menor para o extrato, tanto na formulação gel, como na formulação gel-creme. A diferença significativa entre os valores de K (coeficiente de partição) para as formulações contendo o princípio ativo isolado, em relação àquelas contendo o extrato, demonstra uma mudança na afinidade relativa do 4-NC pela pele e veículo, que pode estar sendo causada pelos demais componentes do extrato.

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

O coeficiente de difusão (D) reflete a facilidade com a qual as moléculas se movem através da membrana (IDSON, 1983, SHAH & MAIBACH, 1993). A difusibilidade é uma função da estrutura molecular do fármaco, que é constante ao longo deste experimento. O coeficiente de difusão também é uma função do material que constitui a membrana (SHAH *et al.*, 1994). No nosso ensaio a membrana (pele de camundongo sem pêlo) não parece ter sido afetada pelo veículo. Por esta razão, não foi possível observar diferenças significativas entre os valores de coeficiente de difusão obtidos para as diferentes formulações.

Todas as formulações apresentaram aproximadamente o mesmo tempo de latência (T_{lag}). O tempo necessário para que o processo de difusão atinja um fluxo constante através da membrana (*steady-state*) é

proporcional à concentração do fármaco no compartimento doador, que foi a mesma para todas as formulações.

Os dados de permeabilidade obtidos nos ensaios com a célula de Franz têm boa correlação com os resultados obtidos no ensaio de quantificação de 4-nerolidilcatecol absorvido pela pele (**Figura 33**). A concentração mais alta de 4-nerolidilcatecol foi encontrada nas membranas das células que receberam aplicação do gel de 4-nerolidilcatecol 0,1%. As demais formulações apresentaram taxas de absorção percutânea intermediárias, quando comparadas ao gel de 4-nerolidilcatecol. Isto não descarta a possibilidade de empregar-se o extrato da raiz de *Pothomorphe umbellata* em formulações fotoprotetoras, no lugar do princípio ativo isolado. Mesmo apresentando uma taxa de absorção percutânea mais baixa, um estudo de potencial antioxidante demonstrou que o extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* possui um potencial antioxidante maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado, sugerindo a presença de compostos adicionais com atividade antioxidante no extrato (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

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

Figura 48: Reações de regeneração entre os antioxidantes não enzimáticos do sistema antioxidante (PACKER *et al.*, 1997)

Teoricamente, a redução na concentração de α -tocoferol pode ser causada diretamente pela absorção de radiação UV, e/ou indiretamente pela reação com espécies reativas de oxigênio, geradas a partir da absorção de radiação UV por moléculas fotossensíveis (THIELE *et al.*, 1998). A degradação direta do α -tocoferol (α -TOH) pela radiação UVB (290-320) está relacionada com a quebra da ligação O-H do cromanol, e subsequente formação de dímeros e outros produtos resultantes da autooxidação do α -tocoferol (KRAMER-STICKLAND & LIEBLER, 1997).

KRAMER-STICKLAND *et al.* (1999) não obtiveram uma degradação significativa de α -tocoferol na pele de camundongos C3/HeN Tac, tratados com radiação UVB ($1\text{J}/\text{cm}^2$), e explicam este fato argumentando que provavelmente, apesar do α -tocoferol endógeno sofrer reação de fotossensibilização, com formação do radical α -tocoferila e outros produtos, estes radicais teriam acesso a antioxidantes capazes de levar a uma regeneração do α -tocoferol. Os antioxidantes capazes de regenerar o α -tocoferol são o ácido ascórbico, ubiquinol e tiols, e estes por sua vez, podem ser regenerados pelo ácido α -lipóico (**Figura 48**) (PACKER *et al.*, 1997). THIELE *et al.* (1998), por sua vez obtiveram uma redução significativa de α -tocoferol no estrato córneo da pele de camundongos sem pêlo SKH-1, após irradiação com radiação solar, proveniente de um simulador solar Oriel 1000 W ($25\text{ J}/\text{cm}^2$). Estes autores não observaram uma alteração significativa na concentração de ácido ascórbico na pele dos animais irradiados, que apresentaram um decréscimo de 36% na concentração de glutatona. Segundo MARTENSON *et al.* (1992) a glutatona poderia estar sendo utilizada para regenerar o ácido ascórbico. Da mesma forma, no presente trabalho, encontrou-se uma redução de aproximadamente 60% na concentração de α -tocoferol na pele dos animais irradiados com UVB ($0,23\text{ J}/\text{cm}^2$). Apesar de estar comprovado através de ressonância paramagnética eletrônica, que o ácido ascórbico regenera o α -tocoferol do seu radical α -tocoferila em homogeneizados de pele irradiados

com um Simulador Solar (KITASAWA *et al.*, 1997) e de ser oxidado pela radiação UV (JURKIEWITZ & BUETTNER, 1994), não foi possível, nos experimentos deste trabalho demonstrar uma redução significativa nos níveis de ácido ascórbico e glutathione reduzida e oxidada na pele de animais irradiados.

O tratamento tópico com *P. umbellata* protegeu o α -tocoferol da degradação pela radiação UV. No grupo tratado com o extrato a concentração de α -tocoferol foi totalmente preservada. ($\approx 100\%$, $p > 0.05$). Um dos primeiros eventos na célula exposta à radiação ultravioleta é a indução da peroxidação lipídica. Estudos *in vitro*, examinando a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre quando a vitamina E está quase toda degradada. (ESTERBAUER *et al.*, 1993, THIELE *et al.*, 1998). Como foi mencionado, a degradação indireta do α -tocoferol se dá pela reação com radicais peroxila e formação de produtos oxidados do α -tocoferol (KRAMER-STICKLAND *et al.*, 1998). Estas reações ocorrem predominantemente no meio lipídico da célula, ou seja, nas membranas. Os coeficientes de partição octanol/água $>$ que 1, do α -tocoferol e do 4-nerolidilcatecol (FREITAS, 1999) podem indicar uma interação entre estas moléculas, o que explicaria a preservação dos níveis de α -tocoferol nos camundongos tratados com o extrato de *P. umbellata*. Além disto, o fato possuir duas hidroxilas adjacentes no anel benzênico (**Figura 6**), contribui para aumentar a atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol, tanto por aumentar a estabilidade do radical formado, como pela propriedade deste tipo de estrutura de quelar metais de transição (LARSON, 1997). Frações do extrato de *Pothomorphe umbellata* tem absorção na região do UV (FREITAS, 1999), o que também pode contribuir para a proteção do α -tocoferol. Uma possibilidade, ainda não elucidada, que explicaria o fato de não ter sido observada uma redução significativa na concentração de 4-nerolidilcatecol nos camundongos irradiados, nem alteração na concentração de ácido ascórbico, seria uma via de regeneração, como a proposta na **Figura 49**.

Figura 49: Proposta de um mecanismo de regeneração do α -tocoferol de seu radical, pelo 4-nerolidilcatecol e ubiquinol

Em um estudo avaliando o efeito da exposição aguda à radiação ultravioleta (UVB, 0,09 J/cm²) sobre o sistema antioxidante enzimático da pele PENCE & NAYLOR (1990) observaram uma redução significativa de atividade das enzimas SOD e CAT, entre camundongos irradiados e não irradiados 12 h após o período de irradiação. Esta resposta tardia à radiação pode ser uma justificativa para não ter sido observada diferença significativa para a atividade destas enzimas, entre camundongos irradiados e não irradiados, já que em nos experimentos os animais foram sacrificados imediatamente após o período de irradiação. O fato de outros autores (SHINDO *et al.*, 1993; LOPEZ-TORRES *et al.*, 1998; FUCHS *et al.*, 1989) terem observado um decréscimo significativo de atividade da enzima catalase após uma exposição aguda à radiação UV é consequência do tipo de lâmpada empregada nestes estudos. SHINDO *et al.* (1993) e LOPEZ-TORRES *et al.* (1998) utilizaram um simulador solar, enquanto FUCHS *et al.* (1989) utilizou lâmpadas que emitem radiação UV/visível, ou seja, em ambos os trabalhos foram utilizadas lâmpadas que emitem radiação visível. A

catalase foi caracterizada como sensível à radiação visível em hepatócitos de ratos (CHENG & PACKER, 1979). O mecanismo de degradação da enzima provavelmente está relacionado à decomposição dependente de oxigênio de um dos quatro anéis de porfirina pela radiação visível (ARONOFF, 1965).

Em um estudo de dose-resposta realizado por SHINDO *et al.* (1994) não foi observada alteração significativa na atividade das enzimas glutathione resutase e glutathione peroxidase para doses baixas de radiação, como as empregadas neste estudo (0,23 J/cm²).

A diminuição no aparecimento de rugas e alterações histológicas em relação aos animais irradiados, observadas na pele de camundongos tratados com o extrato de *P. umbellata* e expostos cronicamente à radiação pode estar relacionada a não degradação do α -tocoferol obtida nos experimentos de exposição aguda para os animais tratados com o extrato. Apesar de não ter sido observado um comprometimento significativo do sistema antioxidante cutâneo, a redução acentuada da concentração de α -tocoferol poderia ser responsável por um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio no meio celular. Colágeno e elastina fornecem integridade estrutural à pele. A indução de metaloproteinases, que degradam colágeno e elastina na pele pode ser o mecanismo primário de mediação do fotoenvelhecimento cutâneo (FISHER *et al.*, 1996). Resultados de ensaios *in vivo* e *in vitro* trazem fortes evidências do envolvimento de espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação UV na regulação positiva e ativação de metaloproteinases, pela indução da síntese e liberação de interleucinas (SCHARFETTER-KOCHANKEK, 1997 a e b, ROBERT, 2001). Além disto, espécies reativas de oxigênio podem causar dano direto por oxidação às proteínas da matriz extracelular (MONBOISSE & BOREL, 1996). O envolvimento destas espécies reativas de oxigênio geradas pela radiação ultravioleta, como possíveis causadores das alterações observadas no fotoenvelhecimento, sugere uma explicação para o fato do extrato de *P. umbellata* ter sido capaz, devido a sua atividade antioxidante, de inibir o aparecimento dos sinais de fotoenvelhecimento nos animais irradiados e tratados. Fazem-se necessários estudos bioquímicos complementares na

pele de animais expostos cronicamente à radiação ultravioleta para comprovação desta hipótese.

6. Conclusões

- Entre as formulações estudadas (gel, gel-creme e creme O/A), o gel foi o veículo que apresentou melhor desempenho nos estudos de permeação cutânea do 4-nerolidilcatecol.
- A permeação cutânea do 4-nerolidilcatecol presente no extrato hidroalcoólico liofilizado da raiz de *P. umbellata* foi menor do que a do 4-nerolidilcatecol isolado, incorporado ao mesmo veículo.
- O extrato de *P. umbellata* foi capaz de preservar a concentração de α -tocoferol na pele de camundongos irradiados com uma dose única de UVB (230 mJ/cm²). Nos camundongos irradiados e não tratados com o extrato a concentração de α -tocoferol foi reduzida em 60% em comparação a concentração encontrada na pele de animais não irradiados.
- O extrato da raiz de *P. umbellata* foi capaz de prevenir o aparecimento dos sinais de fotoenvelhecimento na pele dos animais tratados e expostos cronicamente à radiação UVB.

Considerando a atividade antioxidante do 4-nerolidilcatecol e do extrato de *Pothomorphe umbellata* (DESMARCHELIER et al, 1997; BARROS et al., 1996; RÖPKE, 1999), juntamente com os resultados de absorção percutânea, foi possível concluir que o extrato de *Pothomorphe umbellata* pode ser empregado com sucesso como agente fotoprotetor tópico no estresse oxidativo da pele.

7. Referencias 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.
- AGACHE, P. Epiderme, pêlo, glândulas sebáceas e sudoríparas. In: PRUNIÉRAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1994. p.17-81.
- ACT, J., GRONWALD, M., KASIURA, K. Possibilities for the prediction of an active substance penetration through epidermis. **IFSCC Mag.**, Augsburg, v.4, p.179-183, 2001.
- ARONOFF, S. Catalase: kinetics of photooxidation. **Science**, Washington, v.150, p.72-73, 1965.
- BABIOR, B.M., WOODMAN, R.C. Chronic granulomatous disease. **Semin. Hematol.**, New York, v.27, p. 247-259, 1990.
- BARRY, B.W. **Dermatological formulations**: percutaneous absorption. New York: Dekker, 1983. p. 350.
- BARRY, B.W. Action of skin penetration enhancers – lipid protein partitioning theory. **Int. J. Cosmet. Sci.**, New York, v.10, p. 284-293, 1988.
- 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. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.48, p.114-116, 1996.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: manual of biochemical methods. 2.ed. New York: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

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.

BISSET, D.L., HILDEBRAND, G.G., HANNON, D.P. The hairless mouse as a model of skin photoaging: its use to evaluate photoprotective materials. **Photodermatology**, Copenhagen, v.6, p.228-233, 1989.

BISSET, D.L., HANNON, D.P., ORR, T.V. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.46, p.367-378, 1987.

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

BLACK, H.S., deGRUIJL, F.R., FORBES, P.D., CLEAVER, J.E., ANANTHASWAMY, deFABO, E.C., ULRICH, S.E., TYRELL, R.M. Photocarcinogenesis: an overview **J. Photochem. Photobiol., B**, Lausanne, v.40, p.29-47, 1997.

- BONINA, F., LANZA, M., MONTENEGRO, L., PUGLISI, C., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.145, p.87-94, 1996.
- BRONAUGH, R.L., STEWARD, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. III. Hydrophobic compounds. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.73, p.1255-1258, 1983.
- BRUCH-GERHARZ, D., RUZICKA, T, KOLB-BACHOFEN Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.110, p.1-7, 1998.
- BURTON, G.W., WEBB, A., INGOLD, K.U. A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determinig vitamin E/lipid ratios. **Lipids**, Champaign, v.20, p.29-39, 1985.
- CALABRESE, V., SCAPAGNINI, G., CATALANO, C., BATES, T.E., DINOLLA, F., MICALI,G., GIUFRIDA STELLA, A.M. Induction of heat shock protein síntesis in human skin fibroblast in response to oxidative stress: regulation by a natural antioxidant from rosemary extract. **Int. J. Tissue React.**, v.23, p. 51-58, 2001.
- CAMPOS, P.M.B.G.M., BENETTON, S.A., ECCLESTON, G.M. Vitamina A: penetração na pele. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.10, p.43-56, 1998.
- 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.

- CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVATORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v.30, p.49-53, 1994.
- CHENG, L.Y.L., PACKER, L. Photodamage to hepatocytes by visible light. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.97, p.124-128, 1979.
- CONNOR, M.J., WHEELER, L.A. Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.46, n.2, p.239-245, 1987.
- DESMARCHELIER, C., BARROS, S., REPETTO, M., LATORRE, L.R., KATO, M., COUSSIO, J. 4-nerolidylcatechol from *Potomorphe umbellata* Spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II) - dependent DNA damage. **Planta Med.**, Stuttgart, v.63, p.561-563, 1997.
- ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.80, p.44-49, 1983.
- EMERIT, I. Free radicals and aging of the skin. In: EMERIT, I., CHANCE, B., eds. **Free radicals and aging**. Basel: Birkhauser Verlag, 1992. p.328-341. (EXS, v.62).
- ESTERBAUER, H., PUHL, H., WAEG, G., KREBS, A., DIEBER-ROTHENDER, M. The role of vitamin E in lipoprotein oxidation. In: PACKER, L., FUCHS, J., eds. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.649-671.

- 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.
- FISHER, G.J., DATTA, S.C., TALWAR, H.S., WANG, Z., VARANI, J., KANG, S., VOORHEES, J.J. Molecular basis of sun-induced premature skin-ageing and retinoid antagonism. **Nature**, London, v.379, p.335-339, 1996.
- FISHER, G.J., TALWAR, H.S., LIN, J., VOORHEES, J.J. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by All-trans retinoic acid. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.69, p.154-157, 1999.
- FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v.54, p.659, 1991.
- FOX, C. Skin care review 1995-1999. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.115, p.55-72, 2000.
- 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.
- FREITAS, P.C.D. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família *Piperaceae*: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. São Paulo, 1999. 115p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- FRYER, M.J. Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, 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.**, Augusta, v.50, p.739-744, 1989.

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, p.848-873, 1998.

GEORGE, L.L., ALVES, C.E.R., CASTRO, R.R.L. **Histologia comparada**. São Paulo: Roca, 1985. p.257-259.

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

GILCHREST, B.A. A review of skin ageing and its medical therapy. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.135, p.867-875, 1996.

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

GIROTTI, A.W., 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.**, Augusta, v.51, n.4, p.497-509, 1990.

GUIA DOS GENÉRICOS, Pharmacopéia (CIL) Brasil, 1999, 37p.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1985. 346p..

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Clarendon Press, 1999. 936p..

HILTON, J., WOOLEN, B.H., SCOTT, R.C., AUTON, T.R., TREBILOCK, K.L., WILKS, M.F. Vehicle effects on "in vitro" percutaneous absorption through rat and human skin. **Pharm. Res.**, New York, v.11, p.1396-1400, 1994.

IDSON, B. Dermatological emulsions. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.95, p.59-62, 1980.

IDSON, B. Vehicle effects in percutaneous absorption. **Drug Metab. Rev.**, New York, v.14, p.207-222, 1983.

JASS, H.E., ELIAS, P.M. The living stratum corneum, implications for cosmetic formulation. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.106, p.47-53, 1991.

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

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

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-Nerolidylcathecol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.39, p.85-87, 1980.

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

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.**, Augusta, v.65, p.355-365, 1997.

KRAMER-STICKLAND, K., KROL, E.S., LIEBLER, D.C. UV-B induced photooxidation of vitamin E. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.10, p.219-224, 1997.

KRAMER-STICKLAND, K., LIEBLER, D.C. UV-B induced photooxidation of vitamin E in mouse skin. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.12, p.187-191, 1999.

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

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

LAUTERBURG, B.H., VAISHNAV, Y., STILLWELL, W.G., MITCHEL, J.R.
The effects of age and glutathione depletion on hepatic glutathione turnover *in vivo* determined by acetaminophen probe analyses. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.213, p.54-58, 1980.

LODÉN, M. Skin barrier function: effects of moisturizers. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, p.31-40, 2001.

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, n.2, p.207-215, 1998.

MARTIN, A.N., BUSTAMANTE, P. **Physical pharmacy**: physical chemical principles in the pharmaceutical science. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.324-361.

MARTENSSON, J., MEISTER, A. Glutathione deficiency increases hepatic ascorbic acid synthesis in adult mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.89, p.11566-11568, 1992.

MAYER, P. The effect of vitamin E on the skin. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.108, p.99-109, 1993.

MCCORD, J.M., FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.

MONBOISSE, J.C., BOREL, J.P. Oxidative damage to collagen. In: EMERIT, I., CHANCE, B., eds. **Free radicals and aging**. Basel: Birkhauser Verlag, 1992. p.322-327. (EXS, v.62).

MORAES, M.S. Caracterização farmacognostica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. São Paulo, 1983. 112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

ONISHI, Y., TAJIMA, S., AKIYAMA, M., ISHIBASHI, A., KOBAYASHI, R., HORI, I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v.292, p.27-31, 2000.

PACKER, L., ROY, S., SEN.C.K. α -lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. In: SIES, H., ed. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego, London: Academic Press, 1997a. 707p.

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.

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

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.

- 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.
- PENCE, B.C., NAYLOR, M.F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.95, p.213-216, 1990.
- PIROT, F., MILLET, J., KALIA, Y.N., HUMBERT, P. *In vitro* study of percutaneous absorption, cutaneous bioavailability and bioequivalence of zinc and copper from five topical formulations. **Skin Pharmacol.**, Basel, v.9, p.259-269, 1996.
- PODDA, M., GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clin. Exp. Dermatol.**, Oxford, v.26, p.578-582, 2001.
- PODHAISKY, H.P., RIEMSCHEIDER, S., WOHLRAB, W. UV light and oxidative damage of the skin. **Pharmazie**, Eschborn, v.57, p.30-33, 2002.
- PRASCH, T.H., SCHLOTSMANN, K., SCHMIDT-FONK, K., FÖRSTER, T.H. The influence of cosmetic products on the stratum corneum by infrared and raman spectroscopy. **IFSCC Mag.**, Augsburg, v.4, p.201-206, 2001.
- RANGARAJAN, E., ZATZ, J.L. Skin delivery of vitamin E. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.50, p.249-279, 1999.
- RHEIN, L.D., WOLF, B. Barrier function and aging skin: current and new therapeutic strategies. **IFSCC Mag.**, Augsburg, v.4, p.191-198, 2001.

- 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 oxygen affecting skin products. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.104, p.83-90, 1989.
- ROBERT, L. Extracellular matrix and aging: a review of mechanism and interventions. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, p.61-70, 2001.
- ROPKE, C.D. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* na pele. São Paulo, 1998. 83p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
- SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., DE PASQUALE, A., UCCELLA, N., BARBUZZI, T., PAOLINO, D., BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.199, p.39-47, 2000.
- SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D., GIACCHI, M., DE PASQUALE, A., PAOLINO, D., BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.175, p.85-94, 1998.
- SHAH, J.C. Analyses of permeation data: evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.90, p.161-169, 1993.
- SHAH, J.C., KAKA, I., TENJARLA, S., LAU, S.W.J., CHOW, D. Analyses of permeation data. II. Evaluation of the lag time method. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.109, p.283-290, 1994.
- SHAH, V.P., MAIBACH, H.I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. 453p.

SCHARFFETER-KOCHANNEK, K. Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy. In: SIES, H., ed. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego, London: Academic Press, 1997a. 707p.

SCHARFFETER-KOCHANNEK, K., WLASCHEK, M., BRENNER, P., SCHAUEN, M., BLAUDSCHUN, R., WENK, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biol. Chem.**, Berlin, v.378, p.1247-1257, 1997b.

SHINDO, Y., WITT, E., PACKER, L. Antioxidant defense mechanism in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, 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.**, Malden, v.102, p.470-475, 1994.

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

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.

SPEIKY, H., MACDONALD, A., GILLES, G., ORREGO, H., ISRAEL, Y. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute

- ethanol administration: turnover studies. **Biochem. J.**, London, v.225, p.565-572, 1985.
- 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.
- TAYLOR, C.R., STERN, R.S., LEYDEN, J.J., GILCHREST, B.A.
Photoaging/photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.22, n.1, p.1-15, 1990.
- TEDESCO, A.C., 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.
- THIELE J.J., TRABER, M.G., TSANG, K.G. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.23, p.385-391, 1997.
- THIELE J.J., TRABER, M.G., PACKER, L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive *in vivo* marker of UV-induced photo-oxidation. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.110, p.756-761, 1998.
- 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.

- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.27, p.502-522, 1969.
- THOMAS, M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, London, v.16, p.716-718, 2000.
- TOUITOU, E., FABIN, B. Altered skin permeation of a highly lipophilic molecule: tetrahydrocannabinol. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.43, p.17-22, 1988.
- VACATA, V., GERTCHEN-OHLIGSCHLÄGER, B., GHYYCZY, M. Topical formulations conforming to the structure of the skin. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.116, p.67-74, 2001.
- 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.
- WERTZ, P.W. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Derm.-Venereol.**, Stockholm, v.208, suppl., p.7-11, 2000.
- WESTER, R.C., MAIBACH, H.I. Cutaneous Pharmacokinetics: 10 steps to percutaneous absorption. **Drug Metab. Rev.**, New York, v.14, p.169-205, 1983.