UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E
MEDICAMENTOS

ÁREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS

**Participação de frações do extrato hidroalcoólico de raíz de
Pothomorphe umbellata isentas de 4-nerolidilcatecol na atividade antioxidante
e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele**

Rebeca Leite de Almeida

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros

Versão corrigida

São Paulo
2011

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

Almeida, Rebeca Leite de
A447p Participação de frações do extrato hidroalcoólico de raiz de
Pothomorphe umbellata isentas de 4-nerolidilcatecol na atividade
antioxidante e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele /
Rebeca Leite de Almeida. -- São Paulo, 2011.
137p.

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

1. Antioxidante : Farmacognosia 2. Produtos naturais :
Farmacognosia 3. Metaloenzima : Bioquímica 4. *Pothomorphe*
umbellata : Farmacognosia 5. Mutação artificial : Genética
I. T. II. Barros, Silvia Berlanga de Moraes, orientador.

615.321 CDD

Rebeca Leite de Almeida

**Participação de frações do extrato hidroalcoólico de raíz de
Pothomorphe umbellata isentas de 4-nerolidilcatecol na atividade antioxidante
e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientadora/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de **2011**

“ Pois nem tudo o que Deus uniu
a cromatografia separa...”

AGRADECIMENTOS

Agradecer....

é uma oportunidade que temos de retribuir os dias de conselhos, de trabalho intenso, de resultados inesperados, de tristeza, desabafo e também de alegrias, companheirismo e finalização de projetos!!!

Agradeço por cada pessoa que colaborou seja de forma direta, indireta, imediata, tardia e até mesmo sem saber, com o desenvolvimento deste projeto.

Meu sincero agradecimento à Universidade de São Paulo em particular à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo suporte científico e à FAPESP pela concessão da bolsa.

À “velha guarda”, agradeço os direcionamentos, o tempo de Iniciação Científica (“escraviária!”) e todos os protocolos que aprendi, e me deram o empurrão inicial para a escolha pela pesquisa.

Os colegas que com o dia-a-dia se tornaram amigos e amigas!!! Recebam o meu agradecimento com muito carinho!!

Meu enorme agradecimento à Profa Silvia Berlanga, que durante todos estes anos sempre se mostrou solícita, mesmo quando eu estava em pânico!! À sua capacidade de escutar idéias e encontrar alternativas, e a oportunidade a mim concedida de poder desfrutar este período de aprendizagem sob sua orientação.

Meus familiares, que muitas vezes me viram ficarem dias e dias mal humorada por não ter conseguido os resultados desejados. Mas que assim mesmo sempre me encorajaram a “tentar outra vez”!! Agradeço!!!

E à vida, concedida por Graça e guiada por Deus, que me concedeu a dádiva de receber muitos desafios, para que eu pudesse aprender a enfrentá-los e como merecimento, conquistar um pouco mais de conhecimento.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Coleta e processamento das raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	24
3.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P.umbellata</i>	24
3.3. Isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC).....	25
3.3.1 Cromatografia Líquida de média pressão – MPLC.....	25
3.3.2 Cromatografia líquida de alta performance - HPLC semipreparativo.....	25
3.3.3 Análise do 4-NC por ressonância magnética nuclear – RMN.....	26
3.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC acoplado ao sistema de massa – MS-TOF.....	26
3.4 Determinação da concentração de 4-NC do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> , empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência -HPLC acoplada a um sistema de detecção Eletroquímico.....	27
3.5 Fracionamento líquido/líquido do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P. umbellata</i>	27
3.6 Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada - CCD	29

3.7 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC.....	29
3.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC acoplado ao sistema de detecção Eletroquímico.....	29
3.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC acoplado ao sistema de detecção ultravioleta (UV)	29
3.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC acoplado ao sistema de detecção de diodo (DAD)	30
3.8. Sub-fracionamento da fração n-butanólica - NBUT....	30
3.8.1 Análise das sub-frações NBUT por Cromatografia em Camada Delgada - CCD.....	31
3.8.2 Isolamento e identificação dos compostos da fração NBUT.....	32
3.9. Avaliação da concentração de fenólicos totais nas frações	32
3.10. Determinação de flavonóides totais.....	33
3.10.1 Determinação de flavonas e flavonóis totais.....	33
3.10.2 Determinação de flavanonas totais.....	34
3.11 Avaliação da atividade antioxidante (<i>in vitro</i>)	34
3.11.1 Método DPPH.....	34
3.11.2 Método ORAC.....	35
3.11.2.1 Hidrofílico.....	35
3.11.2.2 Lipofílico.....	36

3.12 Avaliação da atividade antioxidante (<i>in vivo</i>) na pele de camundongos sem pelo	36
3.12.1 Tratamento dos animais.....	36
3.12.2 Processamento das amostras.....	38
3.12.3 Avaliação da atividade antioxidante.....	38
3.13 Avaliação histopatológica da pele após exposição aguda a radiação UVB na pele de camundongos sem pelo	39
3.13.1 Tratamento dos animais	39
3.13.2 Processamento das amostras	39
3.13.3 Padronização da técnica de imunohistoquímica.....	40
3.13.3.1 Proteínas p53, PCNA e p21.....	40
3.13.3.2 Formação de dímeros de pirimidina - CPD's.....	42
3.13.4 Avaliação da marcação de células de queimadura solar –SBC..	42
3.14 Avaliação da indução de metaloproteinases de matriz 2 e 9 na pele de camundongos sem pelo após exposição aguda à radiação UVB	43
3.15 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> por zimografia da inibição de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMPs) de homogenato de pele das frações isentas de 4-NC	44
3.16 Avaliação do controle da expressão protéica do homogeneizado de pele por Western Blot.....	44
3.17 Análise estatística dos resultados.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P.umbellata</i>	46
4.2 Isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC).....	46

4.3 Determinação da concentração de 4-NC do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> , empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência -HPLC acoplada a um sistema de detecção Eletroquímico.....	53
4.4 Fracionamento líquido/líquido do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P. umbellata</i>	55
4.5 Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada – CCD.....	56
4.6 Determinação de 4-NC nas frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC.....	58
4.6.1 Análise das frações por HPLC – eletroquímico.....	58
4.6.2 Análise das frações por HPLC – UV.....	61
4.6.3 Análise das frações por HPLC –UV – DAD.....	63
4.7 Sub-fracionamento da fração n-butanólica – NBUT....	67
4.7.1 Isolamento dos compostos da fração NBUT	69
4.8 Avaliação da concentração de compostos fenólicos totais nas frações	72
4.9 Avaliação da concentração de flavonóides totais.....	74
4.10 Avaliação da atividade antioxidante (<i>in vitro</i>) nas frações.....	76
4.10.1 Método DPPH.....	76
4.10.2 Método ORAC.....	78
4.11 Avaliação de atividade antioxidante (<i>in vivo</i>) na pele de camundongos sem pêlo	80

4.12 Efeito da aplicação tópica do extrato bruto de <i>P. umbellata</i> e das frações N-butanólica e N-butanólica+4NC sobre as alterações causadas pela exposição aguda à radiação UVB	81
4.12.1 Formação de dímeros de pirimidina (CPD).....	81
4.12.2 Indução da proteína PCNA	83
4.12.3 Indução de células de queimadura solar (SBC).....	85
4.12.4 Indução da proteína p53	87
4.12.5 Indução da proteína p21	89
4.13 Avaliação da atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) (<i>in vitro</i>) por zimografia após exposição à radiação UVB	91
4.14 Avaliação da atividade inibitória de MMPs (<i>in vitro</i>) das frações por zimografia.....	92
4.15 Avaliação da expressão protéica no homogeneizado de pele por Western Blot.....	95
5. DISCUSSÃO.....	96
6. CONCLUSÃO	114
7. REFERÊNCIAS	116
8. ANEXOS.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
Figura 1. Folhas de <i>Pothomorphe umbellata</i>	12
Figura 2. Compostos isolados do óleo essencial de <i>P.umbellata</i>	16
Figura 3. Compostos isolados do óleo essencial e da raiz de <i>P.umbellata</i>	17
Figura 4. Compostos isolados das folhas de <i>P.umbellata</i>	18
Figura 5. 4-nerolidilcatecol (KIJJOA et al.,1980)	19
Figura 6. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P.umbellata</i> por extração líquido/líquido.	28
Figura 7. Fluxograma do processo de sub-fracionamento da fração N-butanólica (NBUT) por MPLC. Fase estacionária sílica gel RP18 e fase móvel gradiente metanol: água (5 – 100% metanol).	31
Figura 8. Sistema de extração e fracionamento por cromatografia líquida de média pressão – MPLC (Buchi®)	47
Figura 9. CCD do padrão 4-NC e das frações do extrato <i>P.umbellata</i> (100 µg/mL) obtidas por cromatografia MPLC-Buchi®. Fase móvel CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (91:1). Revelação com luz visível e UV (254 e 365 nm)	47
Figura 10. Cromatograma do padrão 4-NC (250 µg / mL) em sistema HPLC semipreparativo. Leitura em 282 nm, TR= 8 minutos.	48
Figura 11. Espectro do padrão 4-NC (250 µg / mL) em sistema HPLC– DAD. O 4-NC apresenta picos de absorbância em 210 e 282 nm.	48
Figura 12. Espectro do 4-NC por RMN H ¹ .	49
Figura 13. Espectro do 4-NC por RMN ¹³ C.	50
Figura 14. Cromatograma do 4-NC (10µg/mL) e m HPLC-MS-TOF.	52
Figura 15. Curva padrão do 4-NC, HPLC-EQ.	54

Figura 16. CCD do 4-NC do extrato bruto de <i>P.umbellata</i> (PU) e das frações hexânica (HEX), emulsão (EM), n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ). Visualização em 254nm, 365 nm e solução de DPPH para avaliação da atividade antioxidante. Fase móvel $\text{CH}_3\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (91:1).	56
Figura 17. CCD do 4-NC, do extrato bruto de <i>P.umbellata</i> (PU) e das frações hexânica (HEX), emulsão (EM) n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ. Visualização em 254nm, 365 nm e solução de DPPH para avaliação da atividade antioxidante. Fase móvel $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (70:30).	57
Figura 18. Cromatogramas HPLC-EQ. (a) 4-NC 10 $\mu\text{g/mL}$, (b) <i>P.umbellata</i> e (c) HEX. Fase estacionária C8 (3 μm) e fase móvel metanol:água (9:1), KCl 2 mM e LiClO_4 20 mM, fluxo 1mL/min. Amostras de 100 $\mu\text{g/mL}$.	59
Figura 19. Cromatogramas HPLC-EQ. (d) NBUT e (e) AQ. Fase estacionária C8 (3 μm) e fase móvel metanol:água (9:1), KCl 2 mM e LiClO_4 20 mM, fluxo 1mL/min. Amostras de 100 $\mu\text{g/mL}$.	60
Figura 20. Curva padrão 4-NC do dia. HPLC-UV, 282 nm.	61
Figura 21. Cromatogramas HPLC-UV (a) 4-NC, (b) HEX, (c) NBUT e (d) AQ. Amostras de 250 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvel $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1). Leitura em 282 nm.	62
Figura 22. Cromatogramas em 282nm do (a) 4-NC (TR= 30,087 min), (b) fração HEX, (c) fração NBUT e (d) fração AQ. Fase móvel gradiente $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (5 -100% ACN).	63
Figura 23. Cromatograma 4-NC (1mg/mL). Fase móvel gradiente $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (5 -100 % ACN).	64
Figura 24. Cromatograma fração NBUT (1 mg/mL). Fase móvel gradiente $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (5 – 100% ACN).	65
Figura 26. Gradiente $\text{MEOH}:\text{H}_2\text{O}$ utilizado no fracionamento da fração NBUT por MPLC	67
Figura 27. CCD das sub-frações da fração NBUT. Visualização em 254 e 365 nm. Fase estacionária sílica gel 60 e fase móvel $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:6).	68

Figura 28. CCD das sub-frações NBUT (A, B, C, D, E e F) obtidas por cromatografia Flash - Buchi). Fase estacionária Silica C8 RP e fase móvel diclorometano e metanol (9:1). Visualização em 254 nm.	68
Figura 29. Cromatograma sub-Fração D. HPLC-DAD, leitura em 240 nm, fase móvel metanol:água gradiente (5-100% MEOH).	70
Figura 30. Cromatograma sub-Fração E. HPLC-DAD, leitura em 240 nm, fase móvel metanol:água gradiente (5-100% MEOH).	70
Figura 31. Cromatograma para isolamento dos compostos da sub-fração D.	71
Figura 32. Curva padrão do ácido gálico e curvas referentes às amostras. <i>P.umbellata</i> , fração HEX, fração NBUT e fração AQ em análise de compostos fenólicos totais.	73
Figura 33. Curva padrão de Quercetina para avaliação de flavonóis totais	74
Figura 34. Curva padrão de Naringenina para avaliação de flavanonas totais	75
Figura 35. Curva de decaimento de DPPH do padrão TROLOX®, do extrato de <i>P.umbellata</i> , e das frações HEX, NBUT e AQ.	77
Figura 36. Curvas padrão obtidas pelo ensaio ORAC.	79
Figura 37. Atividade antioxidante <i>in vivo</i> por método ORAC (hidrofílico + lipofílico). Pele tratada topicamente com formulações 2h antes da exposição à radiação UVB (2 MED) e sacrificados após 12h. **p < 0.01, ***p < 0.001.	80
Figura 38. Porcentagem de células marcadas para CPD, 2h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. * p < 0.5, ** p < 0.01 e ***p < 0.001.	81

- Figura 39: Fotomicrografias das marcações para CPD após 2h da exposição à radiação UVB - 2MED (aumento 200X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme e com irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratado com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado. 82
- Figura 40. Porcentagem de células marcadas para proteína PCNA, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$. 83
- Figura 41: Fotomicrografias das marcações para PCNA após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado. 84
- Figura 42. Porcentagem de células marcadas para SBC, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. * $p<0.5$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$. 85
- Figura 43. Fotomicrografias das marcações para SBC após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado. 86
- Figura 44. Porcentagem de células marcadas para proteína p53, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$. 87

Figura 45: Fotomicrografias das marcações para p53 após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado. 88

Figura 46. Porcentagem de células marcadas para proteína p21, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. *** p<0.001. 89

Figura 47. Fotomicrografias das marcações para p21 após 12h da exposição à radiação UVB – 2MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado. 90

Figura 48. Zimografia de homogeneizados de pele de camundongos sem pêlo expostos à radiação UVB (2 MED) e sacrificados após 12, 16 e 24h. NI – não irradiado. 91

Figura 49. Zimografias de homogeneizados de pele tratados com 100µg/mL extrato hidroalcoólico de *P.umbellata*, 4-NC, HEX, NBUT, AQ e NBUT+4-NC. Os gráficos de barras representam as intensidades das bandas obtidas utilizando Image J. A atividade está expressa em unidades arbitrárias normalizada pela leitura do controle ao qual foi atribuído o valor 0% de inibição. 93

Figura 50. Zimografias do sobrenadante de células HT1080, adicionadas de 100µg/mL do extrato de raiz de *P. umbellata*, 4-NC, frações HEX, NBUT, AQ e NBUT+4-NC. Os gráficos de barras representam as intensidades das bandas obtidas utilizando Image J. A atividade esta expressa em unidades arbitrárias normalizada pela leitura do controle ao qual foi atribuído o valor 0% inibição.

94

Figura 51. Avaliação da expressão protéica de β - actina (45 kDa), utilizada como controle de quantificação protéica.

95

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
Tabela 1. Composição das formulações gel-creme (p/p) utilizadas no tratamento dos animais (ROPKE et al. 2002) com modificações.	37
Tabela 2. Tempo de recuperação antigênica e diluição dos anticorpos primários	41
Tabela 3. Rendimento do extrato hidroalcoólico de raiz de <i>P. umbellata</i>	46
Tabela 4. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN para ¹ H e ¹³ C do composto isolado 4-nerolidilcatecol.	51
Tabela 5. Valores da curva de calibração de 4-NC	53
Tabela 6. Resultados de validação da metodologia de quantificação do 4-NC.	54
Tabela 7. Rendimento do fracionamento do extrato de raiz de <i>P. umbellata</i> (50g)	55
Tabela 8. Concentração de 4-NC nas frações por HPLC - eletroquímico	58
Tabela 9. Detecção de 4-NC das frações (250 µg/mL) por HPLC-UV	61
Tabela 10. Rendimento de cada sub-fração obtida da fração NBUT(5g)	69
Tabela 11. Fase móvel utilizada no isolamento dos compostos das sub-frações NBUT D.	71
Tabela 12. Concentração de fenólicos totais	72
Tabela 13. Limites de detecção e quantificação para Flavonóides Totais	75
Tabela 14. Atividade antioxidante por DPPH do extrato de <i>P.umbellata</i> , do 4-NC e das frações	76
Tabela 15. Atividade Antioxidante - ORAC das frações. Resultados expressos em µmol Eq. TROLOX [®] /g.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	<i>2,2'-Azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride</i>
AcOEt	Acetato de etila
AQ	Fração aquosa
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDK	<i>Cyclin dependent kinases</i>
CPD	<i>cyclobutane pyrimidine dimer</i>
DAD	<i>Diodo array detector</i>
DCM	Diclorometano
DNPH	<i>2,4-dinitrophenyldrazine</i>
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
EROS	Espécies reativas do oxigênio
FPS	Fator de proteção solar
GTP	<i>Green tea polyphenols</i>
HEX	Fração hexânica
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HT1080	Células de fibrosarcoma
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration of 50%</i>
M1	<i>δ-(3,4-diidroxifenil)-γ-valerolactona</i>
M2	<i>δ-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-γ-valerolactona</i>
MAPK	MAPquinase
MEC	Matriz extracelular
MED	<i>Minimal eritematose dose</i>
MEOH	Methanol
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
MMPIs	<i>Metalloproteinases inhibitors</i>
MMPs	Metaloproteinases
MPLC	<i>Medium pressure liquid chromatography</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MT-MMPs	<i>membrane-type metalloproteinases</i>
NBUT	Fração n-butanólica

NZB-MMPI	<i>Non-zinc-binding metalloproteinases inhibitors</i>
O ²⁻	Ânion superóxido
O ₃	Ozônio
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
<i>P.umbellata</i>	<i>Pothomorphe umbellata</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
4-NC	4-nerolidilcatecol
RL	Radicais livres
RMN	Ressonância magnética nuclear
TIMPs	<i>tissue inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TOF	<i>time-of-flight</i>
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
Zn ²⁺	Zinco

Participação de frações do extrato hidroalcoólico de raiz de *Pothomorphe umbellata* isentas de 4-nerolidilcatecol na atividade antioxidante e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele

RESUMO

A exposição à radiação ultravioleta promove o desenvolvimento de efeitos indesejáveis, incluindo o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Uma forma de prevenção é a utilização de antioxidantes de origem natural. O extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* (PU) apresenta conhecida atividade antioxidante e fotoprotetora, atividade esta atribuída, em parte, ao princípio ativo 4-nerolidilcatecol (4-NC). Artigos publicados sobre a atividade do extrato de raiz de PU, conhecida popularmente como “pariparoba” e do princípio ativo, 4-NC, mostraram que o extrato bruto de raiz é mais ativo do que o 4-NC isolado como inibidor de metaloproteinases (MMPs) e como antioxidante, sugerindo a presença de outros compostos com estas atividades, além de um possível efeito sinérgico. O objetivo deste estudo foi o de obter frações do extrato de PU isentas de 4-NC e avaliar a atividade antioxidante, fotoprotetora e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele. O extrato hidroalcoólico de raiz de PU foi submetido ao fracionamento líquido/líquido sucessivamente com hexano e *n*-butanol, restando um resíduo aquoso. As frações *n*-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ) mostraram-se isentas de 4-NC. A avaliação da atividade antioxidante por DPPH e ORAC das 3 frações obtidas mostrou maior capacidade antioxidante para a fração hexânica (HEX), seguido das frações NBUT e AQ. O mesmo perfil foi observado quanto à presença de compostos fenólicos. Entretanto não foi detectada a presença de flavonóides nas frações. O tratamento tópico com formulação gel-creme contendo o extrato de PU, a fração NBUT e a fração NBUT+4-NC, 2h antes da exposição aguda à radiação UVB (2 MED - 204.36 mJ/cm²), mostrou-se

[Almeida,R.L., 2011]

insuficiente para repor os níveis basais do sistema antioxidante da pele depletados em aproximadamente 20% pela radiação após 12h quando comparado ao controle. O mesmo tratamento não foi capaz de reduzir a formação de dímeros de pirimidina (CPD) após 2h. A avaliação após 12h mostrou redução da marcação de células de queimadura solar (SBC) e do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) para o grupo PU e NBUT. A marcação para p53 e p21 também foi diminuída para o grupo PU e NBUT+4NC, respectivamente. A atividade de metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 ativas extraídas do homogenato de pele de camundongos sem pelo após 24h da exposição à radiação UVB, avaliada por zimografia foi inibida pela fração NBUT. Os resultados observados pela fração NBUT de menor atividade antioxidante, comparados à fração HEX, sugerem que a atividade inibitória de MMPs não esteja necessariamente relacionada à capacidade antioxidante. Neste estudo não foi possível identificar o(s) composto(s) provavelmente responsável(is) pela ação inibitória de MMPs da fração NBUT.

Palavras-chave: *P.umbellata*, pariparoba, metaloproteinases, antioxidante

Participation of hidroalcoholic *Pothomorphe umbellata* root extract fractions without 4-nerolidylcatechol in the antioxidant and inhibitory metalloproteinases 2 and 9 activities in the skin

ABSTRACT

Ultraviolet radiation exposure induces the development of undesirable effects, including photoageing and photocarcinogenesis. One way of preventing these effects is the use of natural antioxidants. The *Pothomorphe umbellata* (PU) root extract shows antioxidant and photoprotective activities, which have been attributed, in part, to 4-nerolidylcatechol (4-NC), the main compound from this plant species. In previous studies, the plant extract was more efficient than 4-NC as an antioxidant and in metalloproteinases (MMPs) inhibitory activities, suggesting the presence of others compounds that could be related with these properties, as well as a possible synergic effect. The purpose of this study was to obtain fractions from PU without 4-NC, and to evaluate the antioxidant, photoprotection and skin MMPs 2 and 9 inhibitory activity of this fractionation. The *P.umbellata* hidroalcoholic root extract was submitted to liquid/liquid extraction with hexane followed by n-buthanol, from which derived a final residue of aqueous extract. The n-buthanolic (NBUT) and aqueous (AQ) fractions did not show the presence of 4-NC. The evaluation of the antioxidant activity by DPPH and ORAC for the 3 fractions showed higher antioxidant activity for the hexanic (HEX) fraction, followed by the NBUT and AQ fractions. The same profile was observed for phenolic compound concentration. However the presence of flavonols in the fractions and PU root extract was not detected. The gel-cream topic treatment containing PU root extract, NBUT fraction and NBUT+4NC, 2h before acute UVB exposure (2 MED - 204,36 mJ/cm²), was insufficient to promote the normal

conditions of basal level antioxidant system depleted approximately 20% after 12h of the exposure compared with the control. The same treatment evaluated by immunohistochemistry, was not able to reduce the CPD (cyclobutane pyrimidine dimers) 2h after the exposure. In 12h reduction of SBC (sunburn cells) and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in PU and NBUT mouse groups was observed. The p53 and p21 proteins were reduced in PU and NBUT+4NC groups, respectively. The activity of metalloproteinases 2 and 9 (MMPs) of mouse skin homogenates after 24h acute UVB exposure, evaluated by zymography, was inhibited by the NBUT fraction. The observed results for NBUT that showed lower antioxidant activity than HEX suggest that the inhibitory effects of MMPs activity may not be related to the antioxidant capacity. It has not been possible to identify the compound(s) that are probably responsible for inhibitory activity of MMPs from the NBUT fraction.

Key-words: *P.umbellata*, pariparoba, metalloproteinases, antioxidant

1. INTRODUÇÃO

Diariamente estamos expostos a fatores ambientais, tais como radiação ultravioleta (UV) e visível, ozônio e radiação ionizante, que são fontes geradoras de radicais livres (RL) (FUCHS et.al., 1989; THIELE et.al., 1997).

A radiação ultravioleta (UV) compõe parte do espectro eletromagnético solar. Os três espectros que compõem a radiação UV são o UVA (315-400nm), o UVB (280-315 nm) e o UVC (100-280 nm). As porções UVB e UVC são absorvidas parcial e totalmente, respectivamente, pela camada de ozônio (WHO, 2003; INPE, 2010). O decréscimo da camada de ozônio tem implicado no aumento da incidência de radiação UV a que estamos expostos (WHO, 2009).

A pele é o maior órgão do corpo, e faz a interface entre o corpo e o meio ambiente, atuando como uma barreira de proteção a patógenos e aos fatores ambientais externos e colabora com a manutenção do equilíbrio e harmonia do organismo (SANDER et al., 2004; GONZALEZ, 2010).

A radiação UV tem ação benéfica colaborando com a biossíntese de vitamina D, eliminação de patógenos na pele e na manutenção da vida na Terra (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002). Dentre as reações indesejáveis provenientes da radiação UV na pele são descritos o desenvolvimento do fotoenvelhecimento prematuro e da fotocarcinogênese por aumento de espécies reativas do oxigênio (EROS) (SCHARFFETTER-KOCHANKE et al., 1997). O envelhecimento prematuro da pele é um processo cumulativo, assim como o envelhecimento cronológico, porém depende principalmente do grau de exposição ao sol e tipo de pele (FISHER et al., 2002).

A superfície da Terra recebe radiação UVA e UVB, consideradas carcinogênicas (SCHARFFETTER-KOCHANKE et al., 1997). Embora represente 10% do total da radiação UV capaz de chegar à superfície terrestre, a UVB é a maior responsável pelos efeitos biológicos relacionados ao câncer de pele (WHO, 2010; INPE, 2010; INCA, 2010) e fotoenvelhecimento, promovendo dano direto ao DNA, RNA, proteínas e outros constituintes celulares. A radiação UVA (320-400 nm) também desempenha papel importante no fotoenvelhecimento e na fotocarcinogênese pela geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) como oxigênio singlete (1O_2) e superóxido (O_2^-) nas reações de fotossensibilização (TEDESCO et al., 1997; FOOTE, 1991).

A produção de EROS ocorre naturalmente em sistemas biológicos (THOMAS, 2000) e sua indução na pele pela radiação UV ocorre via fotoativação de moléculas fotossensíveis (KITAZAWA et al., 1997). O sistema de defesa antioxidante endógeno não é totalmente capaz de evitar a formação de EROS e espécies reativas do nitrogênio (ERNs), e se a produção destas espécies for alta e a regeneração dos antioxidantes presentes no meio se tornarem um fator limitante, ocorre o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, levando à depleção destes, o que pode causar dano a componentes celulares (proteínas, lipídios e DNA) (HALLIWELL, 1996). O aumento de espécies pró-oxidantes no meio celular é definido como “*estresse oxidativo*” (SIES, 1985, SIES, 1991).

A exposição aguda e crônica à radiação UV afeta diferentemente a estrutura e a função da pele (SANDER et al., 2002). Uma única exposição à radiação UV pode induzir mutação no DNA, que pode ser revertida pelo sistema

de reparo celular. A exposição repetitiva à radiação UV promove envelhecimento da pele, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor e câncer de pele (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

As alterações bioquímicas provenientes da radiação UV são descritos por dano direto ao DNA, estresse oxidativo, alteração na transdução de sinais, imunossupressão e inflamação (VINK & ROZA, 2001; DINKOVA-KOSTOVA, 2008). Outros efeitos incluem: parada do ciclo celular, formação de células de queimadura solar, apoptose e hiperplasia (OUHTIT et al., 2000). A radiação UV é descrita por promover a formação de dímeros de pirimidina (CPD) e 6-4-fotoprodutos, que são efeitos primários de iniciação de um tumor, por alteração no DNA (DHANALAKSHMI et al., 2004). As mutações CPD são formadas pela ligação de duas pirimidinas adjacentes, timina (T) ou citosina (C), formando T-T ou C-C (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

As células de queimadura solar (SBC - *sunburn cells*) são reconhecidas como queratinócitos em processo de apoptose (KULMS & SCHWARZ, 2000) e apresentam morfologia típica de núcleo picnótico e citoplasma condensado, facilmente visualizado por coloração de hematoxilia-eosina (LAETHEM et al., 2005).

A apoptose é um processo ativo na qual uma única célula inicia uma morte programada, resultando em fragmentações sucessivas da célula (KULMS & SCHWARZ, 2000). Como mecanismo de preservação da homeostase celular, a apoptose, portanto previne a carcinogênese da pele (SANDER et al., 2004).

A indução do processo de apoptose ocorre por dois mecanismos independentes (1) via p53 por regulação positiva da transcrição da expressão das

proteínas Bax e Fas e regulação negativa de Bcl-2 e (2) outro que independe da função transcricional do p53 mas dependente da interação proteína p53 e proteínas celulares envolvidas na síntese de DNA (SANDER et al., 2004).

A proteína p53 (53 KDa), induzida por radiação UV atua ativando o gene para proteína p21, que colabora com o bloqueio do ciclo celular por inibir a fosforilação de quinases dependentes de ciclinas necessárias para a progressão do ciclo celular (OUHTIT et al., 2000; MANGONE & FEDERICO, 2003).

O gene p53, que codifica esta mesma proteína, foi descrito primariamente como “guardião do genoma” (ZIEGLER *et al.*, 1994) e responsável por estabelecer a parada do ciclo celular para reparo do dano ao DNA ou a ativação da apoptose em casos de danos celulares severos (MANGONE & FEDERICO, 2003).

Para que o ciclo celular promova a replicação correta do material genético, é necessário um balanço entre os estímulos positivos e negativos. Quando há alterações nestes estímulos a parada do ciclo celular parece ser importante para o bloqueio da tumorigênese. As quinases-dependentes de ciclinas (CDKs – *cyclin dependent kinase*) são um complexo de enzimas quaternárias formados por CDK, ciclina, antígeno de proliferação celular (PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*) e proteína p21 que atuam no controle do ciclo celular (XIONG et al., 1993). O controle negativo do ciclo celular ocorre pela família Cip e Kip, que incluem o p21, p27 e p57 e denominados de inibidores de quinase-dependentes de ciclina (CKIs – *cyclin dependent kinase inhibitors*) (ABBAS & DUTTA, 2009) por inibirem a atividade das quinases dos complexos ciclina (CDK) necessários para a manutenção do ciclo celular (MANGONE & FEDERICO, 2003).

O p21 promove diferentes atividades por diversos estímulos, e atua como efetor em diferentes caminhos de supressão de tumor por atividade anti-proliferativa independente do p53. Primariamente o p21 liga-se e inibe a atividade de quinases das CDKs, que levam a parada do ciclo em estágios específicos. Além disso, p21 liga-se ao PCNA interferindo na atividade da DNA-polimerase dependente de PCNA, inibindo a replicação do DNA e modulando diversos processos de reparo de DNA dependente de PCNA (ABBAS & DUTTA, 2010).

A radiação UV estimula também o aumento da proliferação e diferenciação celular causando aumento da espessura da epiderme, especificamente do estrato córneo, como maneira de reduzir a vulnerabilidade das células das camadas basais e suprabasais aos danos induzidos pela radiação (VERSCHOOTEN et al., 2006). A hiperplasia celular está relacionada à proteína PCNA, auxiliar da DNA polimerase, sendo sua expressão utilizada como biomarcador de proliferação celular (WARBRICK, 2007).

A exposição repetitiva ao sol causa acúmulo de danos à derme, podendo resultar em rugas características e lesões na pele (FISHER et al., 2002). O fotoenvelhecimento cutâneo caracteriza-se por espessura de epiderme variável, elastose, decréscimo ou fragmentação do colágeno, aumento de proteínas de degradação (MMPs), infiltrados inflamatórios e vasodilatação (YAAR & GILCHREST, 2007).

A radiação UV, ao induzir a formação de EROS que desencadeiam mecanismo de sinalização capazes de alterar a expressão gênica via MAPquinase (MAPK) por ativação do fator de transcrição AP 1, contribui para aumentar a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 1997; RITTIÉ & FISHER, 2002).

As MMPs são enzimas de uma família de metaloendopeptidases, dependentes de zinco (Zn^{2+}), que clivam componentes protéicos da matriz extracelular (MEC), moléculas de superfície e outras proteínas pericelulares que não pertencem à matriz (EGEBLAD & WERB, 2002).

Foram descritas mais de 20 MMPs humanas, que podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, tipo de sequência domínio ou especificidade de substrato (EGEBLAD & WERB, 2002; SNOCK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005). Existem oito classes estruturais de MMPs, sendo cinco secretadas e três associadas à membrana (MT-MMPs- *membrane-type metalloproteinases*). As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas localizam-se na superfície celular através de ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (EGEBLAD & WERB, 2002; ITOH & NAGASE, 2002). Com base nos componentes do substrato as MMPs são classificadas em: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs tipo-membrana e “outras” (VISSE & NAGASE, 2003; SNOCK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005).

As MMPs são secretadas na forma latente como pró-MMPs, e sua ativação envolve a liberação do pró-domínio por outras proteases (outras MMPs ativas ou serinas proteases) e a ligação do Zn^{2+} no sítio ativo catalítico (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). A atividade destas enzimas é regulada por uma série de inibidores enzimáticos e em níveis de transcrição gênica, sendo a classe de enzimas denominadas de inibidores de metaloproteinases (TIMPs – *tissue inhibitors of MMPs*) os mais importantes (KERKELÄ & SAARIALHO-KERE, 2003; SNOCK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005). A prevenção da degradação da MEC ocorre pelo balanço entre MMPs e TIMPs.

[Almeida, R.L., 2011]

MMPs influenciam diversos processos fisiológicos, tais como o crescimento e o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, o crescimento ósseo e a involução uterina (BENAUD et al., 1998; STERNLICHT & WERB, 2001; BRUMMER et al., 2002; EGEBLAD & WERB, 2002) e patológicos caracterizados pela degradação da MEC, incluindo a artrite reumatóide, a aterosclerose, a invasão e metástase de tumores e envelhecimento prematuro por UV (STETLER-STEVENSON et al., 1993; CHANG & WERB, 2001; NAGASE et al., 2006; DERYUGINA & QUIGLEY, 2006, FISHER et al., 1996, INOMATA et al., 2003). Em condições normais as MMPs são pouco expressas e controladas pelas TIMPs. Durante um processo neoplásico ocorre aumento da expressão de MMPs influenciando no remodelamento do microambiente tumoral e ativação de receptores de superfície celular, desencadeando cascatas de sinalização (FINGER & GIACCIA, 2010).

A exposição à radiação UV regula positivamente a síntese de MMPs, e aumenta a geração de EROS (RITTIÉ & FISHER, 2002; INOMATA et al., 2003), processos que colaboram para o desenvolvimento do fotoenvelhecimento. Aumento de expressão e atividade de MMPs 2 e 9 são também observados em consequência ao processo inflamatório que acompanha a exposição a radiações UV (SHINDO et al., 1994; ROPKE et al., 2006). Algumas MMPs, induzidas por radiação UV, degradam o colágeno e danifica desse modo a integridade estrutural da derme. Na ausência de reparo perfeito, e exposição sucessiva a radiação UV espera-se dano cumulativo, um contribuinte principal ao fenótipo de pele humana danificada por fotoexposição (FISHER et al., 2002). Dentre as 19 MMPs expressas normalmente na pele humana, as MMP-1, MMP-3 e MMP-9 são significativamente induzidas em

resposta à radiação UV. Embora sejam induzidas na epiderme, as enzimas secretadas difundem na derme e degradam o colágeno (QUAN et al., 2009)

As MMP-2, MMP-3 e MMP-9 são reguladas positivamente em resposta a fatores pró-inflamatórios, e sugere sua participação no processo de dano tecidual na inflamação aguda pulmonar (WARNER et al., 2004). As MMP-2 e MMP-9 colaboram com o processo de infiltração leucocitária de tecidos periféricos, diretamente por degradarem a MEC, e indiretamente por regulação da expressão de moléculas de adesão (JACKSON et al., 2010). Foi sugerida a participação dos neutrófilos no processo de fotoenvelhecimento da pele humana enquanto infiltram a pele e liberam as enzimas ativas elastase (elastase do neutrófilo), collagenase (MMP-1) e gelatinase (MMP-9) (RIJKEN et al., 2005).

As MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92-kDa) pertencem ao grupo das gelatinases, que possuem a capacidade de degradar a gelatina e denaturar o colágeno (STEFFENSEN, 2001; VISSE & NAGASE, 2003) e são relacionadas ao processo de transição epitélio mesênquima por degradarem o colágeno tipo IV, um dos componentes principais da membrana basal (FINGER & GIACCIA, 2010). As MMP-2 e MMP-9 são sintetizadas por células do estroma tumoral, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais (EGEBLAD & WERB, 2002).

As EROS, além de indiretamente induzirem a liberação de MMPs, são capazes de inibir enzimas TIMPs, por uma reação oxidativa direta, contribuindo assim com o progresso de tumores e com o fotoenvelhecimento (MA et al., 2001). As MMPs por contribuírem com o fotoenvelhecimento e invasão tumoral, faz dos inibidores de MMPs um importante foco de pesquisa.

A maior incidência da radiação UV e efeitos indesejáveis pelos EROS direcionam a busca por estratégias de fotoproteção.

Diversos compostos fitoquímicos derivados do metabolismo secundário de plantas oferecem possibilidades de proteção contra os efeitos deletérios da radiação UV por diferentes mecanismos que incluem absorção direta, inibição de inflamação crônica, modulação de imunossupressão, indução de apoptose, ou ainda efeito antioxidante direto ou indireto (DINKOVA-KOSTOVA, 2008).

Os antioxidantes são definidos como *“qualquer substância que retarde, previne ou remove o dano oxidativo de uma molécula alvo”* (HALLIWELL, 2007). Considerando dano oxidativo como *“dano sobre constituintes biomoleculares de organismos vivos causado por ataque de radicais livres (RL)”* (HALLIWEL & WHITEMAN, 2004) e a definição de antioxidantes, pode-se atribuir a estes compostos o reparo dos danos por processos de (1) seqüestro de radicais para prevenir propagação, (2) hidrólise enzimática das ligações éster de lipídeos, (3) seqüestro de íons metálicos de transição e (4) redução da catálise enzimática de peróxidos (THOMAS, 2000).

A fotoproteção preventiva inclui não se expor diretamente no período das 10 e 16h do dia ao sol, a proteção física (roupas, óculos, chapéu) e uso de formulações de proteção solar (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005). Algumas alternativas foram sugeridas como adjuvantes da resposta endógena a radiação UV como a utilização de enzimas de reparo, antioxidantes e compostos ativos botânicos (VERSCHOOTEN et al., 2006).

Uma estratégia para reduzir a incidência de fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento é o uso de agentes capazes de diminuir os efeitos adversos da radiação UVB na pele (LOPEZ-TORRES et al. 1998; McVEAN & LIEBLER, 1999; SANDER et al., 2004; PLACZEK, 2005; DINKOVA-KOSTOVA, 2008). O uso de antioxidantes naturais e produtos suplementados com compostos fitoquímicos, aplicados topicamente ou administrados oralmente, apresentam uma perspectiva promissora de prevenção (AFAQ et al., 2002; AFAQ & MUKHTAR, 2006).

Ao processo de prevenção, retardo ou reversão da doença por compostos naturais ou sintéticos, ou mistura de ambos, denomina-se de quimioprevenção. Os agentes com habilidade de amenizar os efeitos adversos da radiação UV são denominados fotoquimioprotetores (AFAQ et al., 2002 e 2005; F' GUYER et al., 2003; ADHAMI et al., 2008).

Muitos compostos naturais apresentam atividade preventiva aos danos induzidos por radiação UV por modulação de mecanismos de sinalização, inibição de inflamação, inibição de produção de EROS e da atividade de MMPs. Dentre eles podemos citar a epigallocatequina-3-galato (chá verde - *Camellia sinensis*), genisteína (soja - *Glycine max*), o resveratrol (uvas - *Vitis sp.*), a silimarina (*Silybum marianum*), a apigenina (alface), a curcumina (açafrão-da-índia - *Curcuma longa*), o 6-gingerol (gengibre - *Zingiber officinale*), a delphinidina (romã - *Punica granatum*) e o licopeno (tomate - *Solanum lycopersicum*) (F' GUYER et al., 2003; ADHAMI et al., 2008; DINKOVA-KOSTOVA, 2008).

A flora Brasileira apresenta grande diversidade. A Mata Atlântica compõe um dos mais ricos ecossistemas correspondendo originalmente a 15% do território brasileiro (CAPOBIANCO - Dossiê Mata Atlântica, 2001) e representa 2.7% de espécies de plantas endêmicas (MYERS et al., 2000).

Pothomorphe umbellata L. Miq. (Figura 1) é uma planta pertencente à família Piperaceae, 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 (PECKOLT, 1941), e pode ser encontrada também em Trinidad, Tobago, México e Peru (YUNKER, 1973). A espécie apresenta grande aceitação na medicina popular, e tem sido utilizada desde os tempos dos índios Brasileiros (FREITAS, 1999). O gênero *Pothomorphe* foi estabelecido em 1840 por Miquel, apresentando, então, cerca de 10 espécies, contudo apenas duas continuam descritas dentro deste gênero *Pothomorphe* ssp. (*P.umbellata* e *P.peltata*) (BHATTACHARYYA & JOHRI, 1998; JARAMILLO & MANOS, 2001). Taxonomicamente, as espécies Piperaceae são complexas, sendo a ordem Piperales classificada entre as Angiospermas basais (KATO & FURLAN, 2007).

Os nomes científicos incluem *Pothomorphe umbellata* L. Miq., *Piper umbellatum* L., *Heckeria sidaefolia*, *Heckeria umbellata* L., *Lepianthes umbellata*, *Piperomia sidaefolia*, *Peperomia umbellata*, *Piper donbeyanum*, *Piper peltatum*, *Piper sidaefolium*, *Pothomorphe alleni*, *Pothomorphe donbeyana*, *Pothomorphe sidaefolia* (link & Otto) Miq. (TROPICOS). As sinonímias populares são caápeba mansa, caápeba do mato (RIEDEL, 1941), caápeba-do-norte, malvarisco, capeua, caapeba verdadeira, pariparoba, malvaíscio (PANIZZA, 1998), caapeva, caápeba, capeba, caena, catajé, aguaxima (SILVA, 1926), caápeba-do-sul (PECKOLT, 1896), aguaxima–malvavisco, pariparoba do mato e malvavisco (LE COINTE, 1934).

[Almeida, R.L., 2011]

Figura 1. Folhas de *Pothomorphe umbellata*

A *Pothomorphe umbellata*, popularmente conhecida como “pariparoba” é um arbusto com aproximadamente 2-3 m de altura, com folhas cordiformes, ovais e pecioladas, medindo 20-25 cm de largura por 18-20 cm de comprimento (MORAES, 1983; HAMMER & JOHNS, 1993; DI STASI et al., 1989). As flores são uma inflorescência, cada uma com dois estames e três carpelos (DI STASI et al., 2002). O período da inflorescência é de janeiro a julho (MORAES et al., 1984). O fruto é uma baga pequena comestível, procurada pelos pássaros. Esta planta reproduz através das sementes, preferivelmente na terra úmida, fértil e à sombra (PECKOLT, 1941; MATTANA, 2009).

O emprego de *P.umbellata* na medicina popular abrange o tratamento de diversas doenças, 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, *P. umbellata*, 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 a sua indicação para uso interno 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, por seu efeito colagogo (FREITAS, 1999; PECKOLT, 1941).

P. umbellata, entre muitas plantas medicinais, é descrita como uma planta nativa da Floresta Atlântica Tropical Brasileira, e uma importante fonte econômica para a população local, assim como um potente agente terapêutico (DI STASI et al., 2002).

Freise (1933) *apud* MORAES (1983) descreveu a presença de asarona, como principal componente no óleo essencial. O apiol (1-alil-2,5-dimetoxi-3,4-metilenodioxibenzeno) (SILVA & BAUER, 1972), posteriormente relatado como sendo o dilapiol (1-alil-2,3-dimetoxi-4,5-metilenodioxibenzeno) (BERNARD & TIELE, 1978), também foi isolado. Diferentes compostos foram descritos no óleo essencial das partes aéreas, conforme o local de coleta da planta. No Brasil foram isolados germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, β -cariofileno (LUZ et.al., 1999), δ -elemeno, epizonareno, p-cariofileno (BERGAMO, 2002), E-nerolidol e β -elemeno (MESQUITA et.al., 2005). Na região Oeste da África foram descritos o pineno, o α -pineno e o E-nerolidol (MARTINS et. al., 1998). Em Cuba, safrol foi o descrito como maior componente, seguido do germacreno D e δ -cadineno (PINO et.al., 2005).

Dos extratos hexânicos de raiz de *P. umbellata* foram isolados sitosterol, 4-nerolidilcatecol (4-NC), e nerolidol (KIJJOA et.al., 1980, BASTOS, 1998). O 4-NC também pode ser isolado a partir da *P. peltata* (MONGELLI et.al., 1999a, 1999b, 2002; NUNEZ et al., 2005; PINTO et al., 2006).

O extrato hidroalcoólico das partes aéreas e de raiz de *P.umbellata*, coletadas no estado de São Paulo, resultaram em reações positivas para saponinas, taninos, compostos fenólicos, esteróides e mucilagens, e reações negativas para alcalóides, derivados de antraquinonas e flavonóides (MORAES, 1983). Extrato aquoso e etanólico de folhas coletadas na Ilha de Marajó apresentaram triterpenos e flavonóides, este último descrito somente no extrato aquoso (HAMMER & JOHNS,1993).

Hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados foram descritos (MESQUITA et al., 2005). Do extrato metanólico de folhas, cubebina e dihidrocubebina foram encontradas, e determinada a estrutura do 5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavonol. A via do ácido chiquímico foi sugerida como rota biosintética para lignanas e flavonóides das folhas (BASTOS, 1998). Os compostos *N*-benzoilmescalina, wogonina, uvangoletina e β -sitosterol glicosídeo também foram isolados das partes aéreas de *P. umbellata* (ISOBE et al., 2002).

Do extrato metanólico de folhas de *P.umbellata* foi identificado a isoasarona, 2-(4'-metilfenil)-3-metil-5-propil benzofurano e 2,3-diidro-2-(4-hidroxi fenil)-3-metil-5-propil benzofurano (AHMAD & TAWAN,2002) e 4 novos alcalóides chamados de piperumbelactamas A-D, além do N-hidroxiaristolam II, *N*-*p*-coumaroil tiramina, 4-nerolidilcatecol, *n*-trans-ferruloiltiramina, E-3-(3-4-dihidroxifenil)-N-2-[4-hidroxifeniletil]-2-propenamida, β -amirina, friedelina, apigenina 8-C-neoesperidosídeo, acacetina 6-C- β -d-glucopiranosídeo, β -sitisterol, 3-O- β -d-

glucopiranosídeo e 3-O- β -D-[6'-dodecanoil]-glucopiranosídeo (TABOPDA et al., 2008). O fracionamento do extrato de folhas de *P.umbellata* resultou na identificação além do 4-NC, de arboreumina, arboreumina-O-glucopiranosídeo, vitexina-2''-O- β -glucopiranosídeo, apigenina 8-C- β -D-glucopiranosídeo, orientina 8-C- β -D-glucopiranosídeo, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona, velutina, sesamina, diidrocubebina, ácido *p*-cumárico e rel-(6S,9S)-roseosídeo (BERGAMO, 2002; BALDOQUI et.al., 2009). As estruturas moleculares de alguns compostos isolados são apresentadas nas figuras 2 ,3 e 4.

Figura 2. Compostos isolados do óleo essencial de *P.umbellata*

Figura 3. Compostos isolados de *P.umbellata*

[Almeida,R.L., 2011]

Figura 4. Compostos isolados das folhas de *P.umbellata*

Dentre os 94 usos descritos na medicina tradicional para *P.umbellata*, em 24 países de 3 continentes, o Brasil é o que apresenta a maior quantidade de artigos na literatura (ROERSCH, 2010).

Algumas das propriedades farmacológicas de *P. umbellata* compreendem atividade antibacteriana (ISOBE et al., 2002; SPONCHIADO Jr, 2006), antimalárica (AMORIM et.al.,1998; ADAMI et al.,1998; FERREIRA-DA-CRUZ et al., 2000), anti-inflamatória e analgésica (BIOKA & ABENA,1990; PERAZZO et al., 2005) e citotóxica (SACOMAN et al., 2008). *P.umbellata* apresenta baixa toxicidade oral aguda e crônica (BARROS et.al., 2005), e ausência de efeito mutagênico (FELZENSZWALB, et al.,1987; ANDRADE et.al., 2005). Propriedades antioxidantes e anti-envelhecimento cutâneo são atribuídas em parte ao 4-NC, composto majoritário isolado da planta.

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (50%) liofilizado da raiz de *P.umbellata*, quando avaliada em ensaios *in vitro*, foi em parte atribuída à presença de um composto fenólico, o 4-NC (Figura 5) (BARROS et al., 1996). Em outro ensaio *in vitro*, o extrato de raiz de *P.umbellata* mostrou um potencial antioxidante significativamente maior que o do 4-NC isolado, sugerindo a presença de compostos adicionais com atividade antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1997).

Figura 5. 4-nerolidilcatecol (KIJJOA et al.,1980)

Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico (50%) de raiz de *P.umbellata* demonstrou atividade antioxidante *in vivo* 2,5 vezes maior do que o α -tocoferol (controle positivo) em camundongos sem pêlo (ROPKE et al., 2000).

O extrato de *P.umbellata* (0.1% 4-NC) aplicado topicamente em camundongos sem pêlo submetidos a uma dose única de radiação UVB, demonstrou sua atividade fotoprotetora *in vivo* sendo capaz de reduzir em 40% a depleção do α -tocoferol (ROPKE et al., 2003) e prevenindo o aumento da espessura epidérmica classicamente observada em grupos controle UVB irradiados após tratamento agudo e crônico. Observou-se também a modulação da espessura das fibrilas elásticas e colagênicas em relação ao controle. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4-NC, presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele (ROPKE et al., 2005).

A avaliação *in vitro* do Fator de Proteção solar (FPS) indicou que a atividade fotoprotetora descrita para a *P.umbellata* refere-se à atividade antioxidante e não por um possível efeito como protetor solar (da SILVA et al., 2005). A exposição aguda à radiação UVB, após tratamento tópico do extrato de *P.umbellata* na pele de camundongos sem pêlo, resultou em menor marcação de células positivas para dímeros de pirimidina (CPD - *cyclobutane pyrimidine dimer*) e células de queimadura solar (SBC - *sunburns cells*), e aumento de p53 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*) na epiderme. Além disso, o tratamento com *P.umbellata* foi capaz de inibir a resposta hiperplásica e induzir o

aumento de células positivas para p53 após 5 e 15 semanas de tratamento e exposição a radiação UVB (dose total de 13.17 e 55.51 kJ/m²) (da SILVA et al., 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata* e 4-NC sobre a atividade gelatinolítica das metaloproteinases (MMPs) MMP-2 e MMP-9, resultou em maior inibição *in vitro* pelo extrato bruto em comparação ao 4-NC isolado, o que sugere a presença de outras substâncias com atividade inibitória de MMPs no extrato. O resultado *in vivo* demonstrou a capacidade do extrato de inibir significativamente a atividade da MMP-9 (ROPKE et.al., 2006). O extrato hidroalcoólico de folhas de *P.umbellata*, mostrou *in vitro* a inibição da atividade de MMP-2 e MMP-9 (ALMEIDA et al., 2008).

O extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*, também foi capaz de inibir *in vitro* a atividade da MMP-9, pró-MM2 e MMP-2 ativa em córnea de coelhos albinos submetidos a injúria alcalina de forma dose-dependente (BARROS et al., 2007).

O efeito expressivo do extrato de *P. umbellata* na prevenção de fotoenvelhecimento induzido na pele de camundongos sem pêlo expostos cronicamente à radiação UVB (ROPKE, 2003, 2005) pode estar relacionado à atividade antioxidante do mesmo, reduzindo as concentrações de EROS e possivelmente reduzindo a expressão de MMPs, uma vez que a exposição à radiação UV é capaz de induzir direta ou indiretamente, por geração de EROS, alterações na expressão gênica e protéica de elementos da MEC (GILCHREST et al.,1998; SEITÉ et al., 2004; ROPKE et al., 2005).

A hipótese e sugestão da presença de compostos adicionais ao 4-NC presentes no extrato de *P. umbellata* responsáveis pelo efeito antioxidante (BARROS et al., 1996; DESMARCHELIER et al., 1997) e inibitório de MMPs (ROPKE et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008), serviram de motivação para dar continuidade à esta pesquisa e pela primeira vez avaliar as frações isentas de 4-NC, quanto a atividade antioxidante, fotoprotetora e inibitória de MMPs.

2. OBJETIVOS

1. Fracionar o extrato bruto hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*, de maneira a obter frações isentas de 4-nerolidicatecol.
2. Avaliar estas frações quanto a capacidade antioxidante (*in vitro*) e atividade inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele de camundongos sem pêlo (*in vitro*).
3. Estudar o efeito do tratamento tópico da fração isenta de 4-NC com maior atividade antioxidante/inibitória de MMPs sob as alterações induzidas por exposição à radiação UVB aguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Coleta e processamento das raízes de *Pothomorphe umbellata*

A coleta das raízes de *Pothomorphe umbellata* foi realizado no campus da Empresa Centroflora[®] - Anidro do Brasil S.A., situada na Cidade de Botucatu (São Paulo – Brasil). Uma exsicata foi preparada e a mesma depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com o nome de R. Almeida 001, sob o número SPF 183629.

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

Para a obtenção do extrato, as raízes foram moídas em moinho de facas e martelo, passadas por tamis de malha de 1 mm e, posteriormente, o material foi reprocessado no moinho de facas e martelos e tamizado em malha de 0,25 mm (NORIEGA-SALAZAR et al., 2005).

3.2 - Obtenção do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*

As raízes tamisadas foram umedecidas com etanol:água (1:2), na proporção de 1kg raiz/10 litros de líquido extrator, colocadas no percolador e maceradas por uma hora. Posteriormente, foi realizada a percolação até esgotamento total da droga, segundo processo A da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). O extrato foi concentrado à vácuo à temperatura constante de 40°C e o resíduo aquoso liofilizado em liofilizador marca Edwards do Brasil (BARROS et al., 1996).

3.3 - Isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC)

3.3.1 Cromatografia Líquida de média pressão - MPLC

De acordo com procedimento já realizado anteriormente em nosso laboratório, o extrato liofilizado de raiz de *P.umbellata* foi submetido à cromatografia em coluna filtrante utilizando sílica gel 60 (0,03 – 0,1 mm MERCK®) com diclorometano como eluente (MERCK®) (FREITAS, 1999, da SILVA, 2007), substituindo a coluna aberta pelo sistema preparativo de extração Flash - BUCHI® (Buchi Labortechnik, Switzerland) composto por duas bombas Buchi Pump Module C-605, detector Buchi UV Photometer C-635, coletor Buchi Fraction Collector C-660 e controlador Buchi Pump Manager c-615. Coluna glassplastic 15x230 mm. O extrato bruto foi adicionado em uma pré-coluna seguido de coluna de separação, e o processo de extração foi acompanhado pela leitura em 282nm. Fluxo de 20ml/min e coletas de 60ml.

A extração foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de alumínio para cromatografia de sílica gel 60 F250 (MERCK®) e fase móvel composta por diclorometano:metanol (91:1, v/v). Foi utilizado como revelador luz ultravioleta B (254 e 365 nm). As amostras foram comparadas com padrão de 4-NC previamente isolado em nosso laboratório e identificado por ressonância magnética nuclear (RMN).

3.3.2 Cromatografia líquida de alta performance - HPLC semipreparativo

As frações contendo 4-NC foram submetidas à cromatografia de alta eficiência em coluna semipreparativa com detecção ultravioleta (UV). O sistema

utilizado compreende com aparelhagem: Shimadzu SCL 10A vp com detector de arranjo de diodo SPD 10A vp (*diode array*), software Class VP, coluna semi-preparativa Luna C18 10 μ m (250x10mm) (Phenomenex[®]), com pré-coluna C18 (10x10mm) (Phenomenex[®]). A fase móvel utilizada foi metanol:água (9:1, v/v), com fluxo de 4ml/min e visualização em 282nm. Para aumentar a pureza do 4-NC, foram coletados as frações correspondentes ao mesmo tempo de retenção (TR= 8 minutos) obtido no cromatograma do padrão.

3.3.3 Análise do 4-NC por ressonância magnética nuclear - RMN

A análise de ressonância magnética nuclear foi realizado em equipamento Bruker Avance DPX 300, com probe de 5mm, 300 MHz para H¹ e C¹³ e comparado com o espectro obtido por REZENDE (2002) e KIJJOA e colaboradores (1980).

3.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC acoplado ao espectrometro de massa – MS -TOF

O sistema de espectrometria de massa de alta resolução utilizado foi *Micromass-LCT Premier Time of Flight* (TOF) (Waters, MA, USA), composto por uma interface *eletrospray* e acoplado ao sistema AcquityTM (Waters, MA, USA) e bomba Shimadzu LC-10ADvp (Duisburg, Germany). Condições do ESI: voltage do capilar 2800V, cone voltagem 40V, voltagem do detector MCP 2650 V, temperatura 120 °C, temperatura de solvatação 250 °C, fluxo de gás no cone 10L/h, fluxo de gás de solvatação 550 L/h. A detecção foi realizada nos modos de íon positivo e íon negativo m/z entre 100–1000 com tempo de leitura de 0,25 s. Coluna LCT premier MICROMASS –MS WATERS 5 μ m, com volume de injeção de 3 μ l. A fase móvel

utilizada foi gradiente acetonitrila:água (5-100% ACN) com fluxo 0,2 ml/min. Foi utilizado para controle o software *MASS LYNX – Waters MS-TOF v.4.1*.

3.4 - Determinação da concentração de 4-NC do extrato de *Pothomorphe umbellata*, empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um sistema de detecção Eletroquímico.

Realizado conforme metodologia já validada e utilizada em nosso laboratório para outros extratos de *Pothomorphe umbellata* (ROPKE et al., 2003b). O sistema cromatográfico foi composto por bomba Waters Model 510, injetor 7161 Rheodyne, dotado de loop de 20 μ L, detector eletroquímico HP 1049A, constituído por 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 Termostepparation Products. A fase estacionária utilizada foi coluna Luna C8 (2) 3 μ m (75x4,6mm) PHENOMENEX® (Torrance, CA, USA) e a fase móvel metanol:água (9:1), contendo KCl 2mmol/L e LiClO₄ 20mmol/L, fluxo 1,0 ml/minuto. O detector eletroquímico foi programado para potencial 0,6 V, polaridade de oxidação, modo amperometria e acompanhada pelo Software Clarity.

3.5 Fracionamento líquido/líquido do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*

O extrato bruto seco de raiz de *P.umbellata* (50g) foi solubilizado em etanol:água (1:2) e submetido ao processo de partição utilizando como solvente extrator hexano (800 mL) com agitação por 3 minutos, por 10 vezes consecutivas, com a finalidade de esgotar o 4-NC. A fase hexânica foi separada e o resíduo

hidroalcoólico evaporado para retirada do etanol em rotaevaporador FISATOM modelo 802, banho de água FISATOM modelo 550 e bomba FISATOM modelo 825T (30W) (FISATOM, São Paulo, Brasil). A fase aquosa foi submetida novamente à extração com n-butanol (1:2), com agitação por 2 minutos, por 2 vezes. As frações foram separadas e evaporadas em Rotaevaporador BUCHI R124, banho de água BUCHI B480, bomba FISATOM modelo 826T (370W) (FISATOM, São Paulo, Brasil) à 40°C, e pressão apropriada para cada solvente. O resíduo aquoso foi liofilizado no equipamento LIOTOP modelo L101, bomba à vácuo IP21 Liobrás. O fluxograma do processo está descrito na figura 6.

Figura 6. Fluxograma do processo de fracionamento do extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata* por extração líquido-líquido.

3.6 - Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada - CCD

As frações obtidas foram monitoradas por CCD em placa de alumínio para cromatografia de sílica gel 60 F250 (MERCK®) e fase móvel adequada conforme as condições de cada fração. Todas as placas foram reveladas em luz ultravioleta B (254 e 365 nm) e solução de DPPH 100µmol/L para visualização das possíveis frações com atividade antioxidante.

3.7 - Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC

3.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao sistema de detecção Eletroquímico

A concentração de 4-NC nas frações obtidas foi determinada empregando-se a metodologia descrita no item 3.4.

3.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao sistema de detecção ultravioleta (UV)

O sistema de cromatográfico acoplado ao sistema UV foi composto de bomba Consta Metric 3200, com detector espectrofotométrico Lab Alliance, modelo 525 com comprimento de onda 282nm, coluna C18 (4,6x250mm), 10 µm PHENOMENEX® (Torrance, CA, USA). Injetor Rheodyne 7125, com loop de 20 µL. As fases móvel utilizadas foram isocrático metanol:água (90:10), com fluxo 1,0 ml/min.

3.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC acoplado ao sistema de detecção de arranjo de diodo (DAD)

As frações obtidas e o 4-NC foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna com detecção ultravioleta e de diodo (UV-DAD). O sistema foi composto de sistema HP – HAWETT PACKARD SERIES 1100, bomba BIM G1312A, degaseificador G1322A, detector G1315B (*diode array*), software Class VP, coluna Symetry C18 10 μ m (4,6x250mm) (WATERS®). A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água gradiente (5-100% ACN), com fluxo de 1ml/min. Foi escolhida uma visualização em 282nm devido ao 4-NC.

3.8.- Sub-fracionamento da fração n-butanólica (NBUT)

A fração NBUT foi submetida à cromatografia líquida utilizando coluna de vidro glassplastic®C - 690 (100 mm x 15 mm) contendo sílica RP18 (25-40 μ m) LiChroprep (MERK®). A coluna foi empacotada previamente com H₂O e fase móvel composta por metanol:água (CH₃OH:H₂O) gradiente (5-100% CH₃OH), durante 120 minutos e fluxo 10 ml/min. A amostra (1g) foi adicionada por meio de uma pré-coluna. Foram obtidas 30 frações (50 ml cada) e o fracionamento realizado em 5 dias consecutivos, totalizando 5g de fração NBUT submetida ao processo (Figura 7).

Figura 7. Fluxograma do processo de sub-fracionamento da fração N-butanólica (NBUT) por MPLC. Fase estacionária sílica gel RP18 e fase móvel gradiente metanol: água (5 – 100% metanol).

3.8.1 Análise das sub-frações NBUT por Cromatografia em Camada Delgada - CCD

As 30 sub-frações obtidas foram monitoradas por CCD em placa de alumínio para cromatografia de sílica gel 60 F254 (MERCK®) e fase móvel adequada conforme as condições das frações. Após os resultados, as frações foram agrupadas em 6 sub-frações reagrupadas finais (A,B,C,D,E e F) avaliadas por CCD em placa de vidro contendo sílica C 8 (MERCK®), e fase móvel diclorometano:metanol (DCM: MEOH) (9:1) Todas as placas foram reveladas em luz ultravioleta B (254 e 365 nm).

3.8.2 Isolamento e identificação dos compostos da fração NBUT

O processo foi realizado em 3 etapas: (1) determinação do método a ser aplicado, por sistema HPLC - DAD (item 3.4.2) e UV coluna Luna RP C18 10 μm (4,6 x 150mm) PHENOMENEX[®] (Torrance, CA, USA) com fase móvel gradiente metanol:água; (2) aplicação do método desenvolvido em sistema cromatográfico semi preparativo (item 3.3.2) e coleta dos majoritários para isolamento, e (3) análise dos compostos isolados em HPLC- MS/TOF, RMN.

3.9 - Avaliação da concentração de fenólicos totais nas frações

As frações (HEX, NBUT e AQ) foram analisadas quanto a concentração de compostos fenólicos totais pela reação de *Folin-Ciocalteu* em placa, segundo AINSWORTH & GILLESPIE (2007) validado em nosso laboratório. O método se baseia na transferência de elétrons, em meio alcalino, dos compostos fenólicos para complexos fosfotúngsticos/fosfomolibdênicos, formando complexos azuis que podem ser determinados espectrofotometricamente.

As amostras (50 μL) foram diluídas em 5 concentrações diferentes, e adicionadas de reagente de *Folin-Ciocalteu* (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 0,4 $\mu\text{mol/L}$ (50 μL) e solução de carbonato de cálcio 700 mmol/L (100 μL). A reação foi mantida em ausência de luz durante 1 hora, e a leitura realizada em leitor de placas Synergy HT (BIOTEK[®], Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) em 760 nm. Os resultados foram expressos em Equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{mol/g}$ de amostra) para o qual foi construída uma curva-padrão (250, 200, 150, 100, 75 e 50 $\mu\text{mol/L}$).

3.10 Determinação de flavonóides totais

A quantificação de flavonóides totais foi realizada por ensaio espectrofotométrico que se baseia na formação de um complexo entre os íons Al^{+3} e o grupo carbonílico. As diferentes classes de flavonóides, conforme sua estrutura molecular interage diferentemente com este íon, formando complexos que absorvem em diferentes comprimentos de onda. A ausência de ligação dupla entre os carbonos 2-3 do anel carbônico do flavonóide (flavanonas) é observada pela mudança drástica na absorbância. Devido a particularidades das classes de flavonóides, foi aplicado um método para a quantificação de flavonas e flavonóis e outro para flavanonas (POPOVA et al., 2004).

3.10.1 Determinação de flavonas e flavonóis totais

O extrato bruto de raiz de *P.umbelalta* foi avaliado quantitativamente quanto à presença de flavonóis conforme KOSALEC e colaboradores (2005). A amostra de *P.umbellata* foi diluída em 5 concentrações diferentes (1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 e 0,005 mg/ml). Em microplacas de 96 poços, foi adicionado 100 μL de água, 60 μL de etanol, 10 μL de cloreto de alumínio (solução aquosa 40mg/mL), 10 μL de acetato de sódio (solução aquosa 32,81mg/mL) e 20 μL de amostra ou substância de referência (quercetina). A reação foi mantida em ausência de luz durante 30 minutos à temperatura ambiente, e a leitura realizada em 415 nm em leitor de placas Synergy HT (BIOTEK®, Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em μmol Eq. quercetina/g amostra para o qual foi construída uma curva-padrão diluída em etanol 80% (300, 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g/ml}$).

3.10.2 Determinação de flavanonas totais

A quantificação de flavanonas totais do extrato bruto de raiz de *P.umbellata* realizado conforme o método descrito por NAGY & GRANCAI (1996) que se baseia na formação de 2,4 dinitrofenilhidrazonas a partir da reação de DNPH (2,4-*dinitrophenyldrazine*) com os grupos cetonas e aldeídos presentes nas hidrazonas das flavanonas. Amostra de 0,5 mL de *P.umbellata* (1mg/ml) diluído em metanol, foi adicionada de 1ml de solução 1% de DNPH e 1ml de metanol. A mistura foi aquecida a 50°C por 50 minutos. A seguir adicionou-se 2,5ml de hidróxido de potássio a 10% (em metanol 70% v/v) e após dois minutos 2,5ml de metanol, seguido de centrifugação a 1000g durante 10 minutos. A leitura foi feita em 495nm em leitor de microplaca Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). A solução de DNPH foi preparada dissolvendo-se 1g deste reagente em 2ml de ácido sulfúrico 96% completando-se o volume para 100ml de metanol. Os resultados foram expressos em μmol Eq. naringenina/g de amostra, para o qual foi construída uma curva-padrão diluída em metanol (2.0, 1.0, 0.5, 0.25 e 0.125 mg/ml).

3.11 - Avaliação da atividade antioxidante (*in vitro*)

3.11.1 Método DPPH

A atividade antioxidante das frações obtidas a partir do extrato bruto de raiz de *P.umbellata* foi determinada pela capacidade de redução do radical 2,2'-*difenil-1-picrilhidrazil* (DPPH) em 50% (BRAND-WILLIAMS et al,1995, QIAN & NIHORIMBERE, 2004). As amostras (50 μL) foram adicionadas da solução de DPPH

(150µL), e mantidas ao abrigo de luz por 2 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517nm.

3.11.2 Método ORAC

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), que se baseia na medida de inibição do decaimento da fluorescência da fluoresceína na presença de radicais livres gerados por 2'2'-azobis(aminidinopropane)dihydrochloride (AAPH) (CHANDRA & GONZALEZ DE MEJIA, 2004). Na presença de compostos antioxidantes o decaimento da fluorescência é inibida (OU et al., 2001).

3.11.2.1 Hidrofílico

As amostras das frações obtidas, o 4-NC e o extrato hidroalcoólico de *P.umbellata* foram solubilizadas (1mg/mL) em solução de acetona:água 50% (v/v) e diluída em 6 concentrações diferentes em tampão fosfato (75mM, pH 7.0). São adicionados à placa de 96 poços, 25µL de amostra, 150µL de solução de fluoresceína 40 mM em tampão fosfato (75 mM, pH 7.0) e a reação é incubada por 30 minutos à 37°C. Adiciona-se 25 µL de AAPH 153 mM (em Tampão Fosfato pH 7.0) /poço. A placa foi agitada por 10 segundos e a leitura realizada em leitor de placa modelo Synergy HT (BIOTEK®, Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a cada 1 minuto durante 1 hora. Excitação em 493 nm (filtro 485/20) e Emissão em 515 nm (filtro 528/20). A amostra branco e controle de reação foram constituídas de 200µL de tampão fosfato 75 mM pH 7.0 e 25 µL de tampão substituindo a amostra, respectivamente.

O valor final é calculado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox® e a área sob a curva de decaimento de fluorescência

[Almeida,R.L., 2011]

(AUC). Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox[®]/g da amostra para o qual foi construída uma curva padrão (100, 50, 25, 12.5 e 6.25 μ M).

3.11.2.2 Lipofílico

As frações obtidas, o 4-NC e o extrato hidroalcoólico de *P.umbellata* foram solubilizadas em hexano (1mg/ml), e agitadas por 3 minutos para extração dos compostos lipofílicos. A amostra foi então centrifugada a 350g por 2 minutos, retirada uma alíquota de 1ml do sobrenadante e evaporado em nitrogênio (N₂). O resíduo foi ressuspensionado em solução 7% (p/v) de β -ciclodextrina randomicamente metilada (Cyclodex Technologies, High Springs, FL, USA) solubilizada em acetona:água 50% (v/v) e diluídos em 6 concentrações diferentes. O preparo da placa foi feito conforme descrito no item 3.11.2.1. Na avaliação lipofílica, no controle de reação, a amostra é substituída por 25 μ L de solução de ciclodextrina 7% e a curva padrão de Trolox[®] segue as diluições 50, 37.5, 25, 12.5 e 6.25 μ M.

3.12 - Avaliação de atividade antioxidante na pele de camundongos sem pêlo

3.12.1 Tratamento dos animais

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

Os animais foram separadas em 6 grupos (n=3) e tratados topicamente, exceto os grupos controle e irradiado, com formulação gel-creme (O/A) (ROPKE et al., 2002) (Tabela 1) contendo o extrato de *P.umbellata* e a fração N-butanólica. Após 2h do tratamento (BISSET,1989), os animais foram expostos de forma aguda à radiação UVB correspondente a 2MED (204.36 mJ/cm²). O sacrifício dos animais foi realizado 2 e 12h após a exposição por deslocamento cervical (da SILVA et al., 2009).

Tabela 1. Composição das formulações gel-creme (p/p) utilizadas no tratamento dos animais (ROPKE et al. 2002) com modificações.

componentes	Gel-creme	<i>P.umbellata</i> 0.1% 4NC*	NBUT 0.28%**	NBUT 0.28% + 0.1% 4NC
Carbomero 940	0.3	0.3	0.3	0.3
Propilenoglicol	10	10	10	10
Trietanolamina	0.25	0.25	0.25	0.25
Cetiol V	1.5	1.5	1.5	1.5
Lanette N®	2.5	2.5	2.5	2.5
Nipagin®	0.15	0.15	0.15	0.15
Nipazol®	0.15	0.15	0.15	0.15
Extrato PU	-	0.125	-	-
4-NC	-	-	-	0.1
Fracao NBUT	-	-	0.285	0.285
Agua destilada	100	100	100	100
qsp				

* Concentração estabelecida a partir do doseamento de 4-NC no extrato de *P. umbellata*. ** Concentração de fração *n*-butanólica equivalente ao de 0.1% 4-NC no extrato de *P.umbellata*.

3.12.2 Processamento das amostras

A pele dorsal retirada (0,75-1g) foi lavada com tampão fosfato de potássio 140mM pH7,4 e reduzida a pequenos fragmentos com auxílio de tesoura. O homogeneizado 1:4 (p/v) em tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0 foi obtido em homogeneizador Ultra Turrax (Metabo GE700, Nurtiger, Alemanha) seguido de homogeneizador Potter-Elvehjem (Marconi MA099, Piracicaba, São Paulo, Brasil), e centrifugados a 1000g durante 20 minutos, à 4°C em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf 5403. O sobrenadante foi empregado como amostra.

3.12.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação foi realizada empregando o método de ORAC (PRIOR et al., 2003) com modificações. As amostras de 100µL de homogenato de pele foram adicionados 200µL de etanol e 100µL de água. A mistura foi submetida à agitação por 1 minuto e acrescentada de 400µL de hexano, seguida de nova agitação. O tubo foi centrifugado a 10000rpm durante 5 minutos. Removeu-se 350µL da camada hexânica que foi transferida para tubo âmbar. Uma segunda extração com 400µL de hexano foi realizada e a camada hexânica foi combinada com a primeira e evaporada sob nitrogênio. Esta fração foi utilizada para a análise da atividade antioxidante lipofílica. À parcela remanescente adicionou-se 400µL de ácido perclórico 0,5M seguido de centrifugação a 12000rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato (75mM, pH7.0) e analisado como fração hidrofílica, seguindo protocolo descrito no item 3.11.2.1.

Para avaliação da atividade antioxidante lipofílica, o extrato hexânico evaporado foi dissolvido em 250 μ L (125 μ L para pele) de acetona e diluído com 750 μ L (375 μ L para pele) de uma solução 7% (p/v) de β -ciclodextrina randomicamente metilada (Cyclodex Technologies, High Springs, FL, USA) em acetona:água 50%. As diluições subseqüentes foram feitas nesta mesma solução, assim como o preparo da substância de referência (Trolox[®]) e do branco. O protocolo de análise segue conforme protocolo descrito no item 3.11.2.2.

3.13 - Avaliação histopatológica da pele após exposição aguda a radiação UVB na pele de camundongos sem pêlo

3.13.1 Tratamento dos animais

O tratamento dos animais foi realizado conforme descrito no item 3.12.1. Os animais expostos à radiação UVB correspondente a dose aguda de 2MED (204.36 mJ/cm²) foram sacrificados por deslocamento cervical após 2h para ensaio de CPD e 12h após a exposição para avaliação de SBC, PCNA, p53 e p21 (da SILVA, 2007, da SILVA et al., 2009).

3.13.2 Processamento das amostras

Um pequeno fragmento da pele dorsal dos mesmos camundongos sem pêlo utilizados no item 3.12.1 foram fixados em formalina tamponada a 4% e posteriormente, incluídos em parafina em até 24 horas após a fixação para garantir a preservação dos antígenos. Depois foram submetidos a cortes de 5 μ m de espessura em micrótomo rotatório e posteriormente submetidos a ensaios conforme

metodologia correspondente, sendo montados em lâminas silanizadas para os ensaio de imunohistoquímica e lâmina normal para avaliação histológica.

3.13.3 Padronização da técnica de imunohistoquímica

3.13.3.1 Proteínas p53, PCNA e p21

A padronização da técnica de imunohistoquímica foi realizado em lâminas silanizadas dos cortes dos grupos controle e irradiado com tempo de sacrifício de 12 horas após a irradiação, já que segundo a literatura este é o tempo no qual as proteínas p53 e PCNA estão presentes em maiores quantidades. O ensaio foi realizado segundo BERG e colaboradores (1996) e OUHTIT e colaboradores (2000) para a proteína p53, PCNA e p21 com modificações.

As lâminas contendo os cortes (item 3.13.2) após desparafinização e rehidratação, foram tratadas com soluções para recuperação antigênica solução de tampão citrato pH6,0 (S1699, DAKO®); em banho aquecido com vapor de água e mantido a 97°C por tempo determinado conforme Tabela 2. As lâminas foram, então, resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos, ainda em solução de recuperação antigênica e lavadas, posteriormente, com água destilada e tampão TBST (tampão salina Tris com Tween 20, S3306, DAKO®).

Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo anti-PCNA rato monoclonal de camundongo clone PC10 (M0879, DAKO®), anticorpo anti-p53 humano monoclonal de camundongo clone PAb240 (AbCAM®) e anticorpo policlonal de coelho anti-p21 (ab2961, AbCAM®) diluídos em solução de diluente de anticorpo, tampão Tris-HCl contendo carreador de proteína e azida sódica 0,015M (S0809, DAKO®) (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo de recuperação antigênica e diluição dos anticorpos primários

Anticorpo Primário	Tempo incubação (min)	Diluição Utilizada	Concentração do Anticorpo 1 ^{ario}
P21	10	12.5 µg/ml	1 mg/ml
P 53	20	1:250	1.2 mg/ml
PCNA	30	1:50	525 mg/l

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

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

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumento 400x) sendo o número de células marcadas por 100 células por campo foram contadas, sendo três campos por animal e três animais para cada grupo avaliado (controle, irradiado, *P.umbellata*, N-butanólica e N-butanólica+4NC 0.1%) após 2 e 12h da exposição a radiação UVB (OUHTIT et al., 2000; da SILVA, 2007).

3.13.3.2 Formação de dímeros de pirimidina - CPD's

A técnica de imunohistoquímica foi padronizada segundo LIARDET e colaboradores (2001) e adaptada para coloração com (diaminobenzidina) DAB, empregando-se o kit ARC (DAKO® Cytomation, CA, USA). O tempo de sacrifício empregado foi de 2 horas após a irradiação UVB conforme dados da literatura (BÄCKVALL et al., 2002, DHANALAKSHMI et al., 2004).

Após o processo de desparafinização e rehidratação das lâminas (item 3.12.2), as amostras foram denaturadas com NaOH 0,1N em etanol 70%, durante 3 min. Foram então incubadas com proteinase K pré-diluída DAKO® por 3 minutos e após várias lavagens com água foram deixadas no tampão TBS-T DAKO®. A coloração foi feita segundo orientação do kit ARC da DAKO® com anticorpo primário anti-dímero de pirimidina (CPD - *anti-thymine dimer*), clone KTM53 (Kamya Biomedical Company, WA, USA), na diluição 1:100. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harrys, e posteriormente desidratadas e montadas com resina sintética (Entellan® – MERCK®). As lâminas foram analisadas conforme descrito no item 3.13.3.2, com aumento de 200x em microscópio óptico.

3.13.4 Avaliação da marcação de células de queimadura solar (SBC – *sun burn cells*)

Os cortes histológicos conforme descrito no item 3.12.3, foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Conforme descrito por LAETHEM e colaboradores (2005), as SBC estão presentes na epiderme e exibem a característica morfológica de núcleo picnótico e citoplasma intensamente corado por eosina. As lâminas foram analisadas conforme descrito no item 3.13.3.2, com aumento de 200x em microscópio óptico.

3.14 - Avaliação da indução de metaloproteinases de matriz 2 e 9 na pele de camundongos sem pêlo após exposição aguda à radiação UVB

Foram utilizados animais conforme descrito no item 3.12.1 submetidos à radiação UVB (2 MED – 204.36 mJ/cm²) e sacrificados após 12, 16 e 24 horas. A zimografia foi realizada conforme protocolo de ROPKE e colaboradores (2006) com modificações. Após o sacrifício por deslocamento cervical, a pele dos camundongos foi separada, lavada com tampão Tris-HCl 0,05M, 0,15M NaCl, pH 7,4. Uma pequena quantidade (0,1g) de tecido foi homogeneizada em tampão RIPA (1:5) (Tris-Base 50 mM pH 7,4 contendo 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100 e 1 mM EDTA), por 2 vezes consecutivas de 20s em homogeneizador Ultra Turax (modelo T8) com velocidade 4. O homogeneizado foi submetido à centrifugação 13000rpm durante 20min, a 4°C, em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf modelo 5804R (Alemanha). O sobrenadante foi empregado como amostra.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY (1951), e as amostras (20µg de proteína) submetidas à eletroforese (70 V por 30 min e 100 V por 1,5 h, sistema Mini-Protean III BioRad), em gel de poliacrilamida 10% contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 0,5 % de gelatina.

Ao final da corrida o gel foi cortado em tiras e lavado com Triton 2,5 % para remoção do SDS. As tiras foram incubadas a 37°C por 18h em um tampão de incubação Tris-HCl 0,05M, 5mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂, pH 8,0. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 15 min em temperatura ambiente e descorados com água contendo 10% de metanol e 10% de ácido acético. As gelatinases aparecem como regiões não coradas de gelatina (INOMATA et al., 2003). O gel foi

fotografado no equipamento DNR- B10 Imaging Systems MINIBIS-PRO, *Software Gel Capture* e as intensidades das bandas foram calculados utilizando o programa ImageJ (versão 1.41).

3.15 - Avaliação da atividade *in vitro* por zimografia da inibição de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMPs) de homogenato de pele das frações isentas de 4-NC

Foram utilizados animais conforme descrito no item 3.12.1 submetidos à radiação UVB (2 MED – 204.36 mJ/cm²). O protocolo foi realizado conforme descrito no item 5.4. e o tempo de sacrifício após 24h (estabelecido experimentalmente no item 3.14). Para a avaliação da atividade, as amostras (20µg de proteína) adicionadas das frações, 4-NC e extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*, foram submetidas à eletroforese (70 V por 30 min e 100 V por 1,5 h, sistema Mini-Protean III BioRad) para avaliação da atividade inibitória de MMP-2 e MMP-9 por zimografia.

3.16 - Avaliação do controle da expressão protéica do homogeneizado de pele por Western Blot

A avaliação da proteína actina para controle da expressão protéica foi realizada com extrato protéico total obtido do homogeneizado da pele dos camundongos sem pêlo utilizados no ensaio de zimografia (item 3.15).

A separação das proteínas foi realizada em gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Em cada poço foi aplicado 20 ou 40µg de extrato protéico total + tampão de amostra 4X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol

0,1%, DTT 50mM) e 10 μ L de marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 80V / 3h durante o gel de separação.

Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) utilizando o Tampão de Transferência (Tris Base 3,03g, Glicina 14,4g diluído em H₂O pH8.3).

Para o bloqueio da membrana foi utilizada a solução de PBS-T 0,02% (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,02%) com 5% de leite (sem gordura), durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após o bloqueio foi realizada a incubação com o anticorpo primário de actina anti-camundongo (1:10000) (A5316, Sigma) por 1h à TA. A seguir foram realizadas 3 lavagens de 5 min cada com PBS-T 0,02%, e a membrana foi incubada com anticorpo secundário de actina anti-camundongo (1:5000) (115-035-062 goat anti-mouse, Jackson ImmunoResearch Labs) nas mesmas condições. Novamente a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 min cada com PBS-T 0,02%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL).

3.17 - Análise estatística dos resultados

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

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*

O rendimento (p/p) do extrato hidroalcoólico seco bruto de raiz de *P. umbellata* foi de 5.83 % (Tabela 3).

Tabela 3. Rendimento do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*

	Peso (kg)	%
Raiz	4.114	100
Extrato seco	0.240	5,83

4.2 Isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC)

O isolamento do composto majoritário 4-NC, a partir do extrato de seco liofilizado de *P.umbellata* (1g) resultou em 57,59 mg (5,76 %) do composto. A extração por MPLC (Figura 8) resultou em 30 frações, que foram agrupadas em 4 frações principais. O processo foi controlado por CCD (Figura 9). A(s) fração(ões) que apresentaram 4-NC foi(ram) seca(s) em nitrogênio e o isolamento realizado em HPLC semipreparativo (Figura 10). O perfil do 4-NC por HPLC-DAD é mostrado na Figura 11. A amostra obtida de 4-NC foi analisada por RMN do ^1H e ^{13}C (Figuras 12 e 13) e comparado com a literatura (Tabela 4).

Figura 8. Sistema de extração e fracionamento por cromatografia líquida de média pressão – MPLC (Buchi®).

Figura 9. CCD do padrão 4-NC e das frações do extrato *P. umbellata* (100 $\mu\text{g/mL}$) obtidas por cromatografia MPLC - Buchi®. Fase móvel DCM:MEOH (91:1). Revelação com luz visível e UV, 254 e 365 nm.

Figura 10. Cromatograma do padrão 4-NC (250 $\mu\text{g/mL}$) em sistema HPLC semipreparativo. Leitura em 282 nm, TR= 8 minutos.

Figura 11. Espectro do padrão 4-NC (250 $\mu\text{g/mL}$) em sistema HPLC–DAD. O 4-NC apresenta picos de absorvância em 210 e 282 nm.

Figura 12. Espectro do 4-NC por RMN ^1H .

Figura 13. Espectro do 4-NC por RMN C^{13} .

4 - nerolidilcatecol (4-NC)

Tabela 4. Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN para H^1 e C^{13} do composto isolado 4-nerolidilcatecol.

Tipo C (nº)	Literatura* (270 MHz, $CDCl_3$)	Experimental (270 MHz, $CDCl_3$)	Literatura* (22,5 MHz)	Experimental (75,0 MHz)
	H^1	H^1	C^{13}	C^{13}
$CH_3(3')$	1,30 (s)	1,32 (s)	25,0	25,00
$C(3')$	----	-	43,8	43,82
$CH_3(11')$	1,51 (s)	1,51(s)	17,7	17,70
$CH_3(11')$	1,59 (s)	1,59 (s)	25,7	25,69
$C(11')$	----	-	131,4	131,33
$CH_3(7')$	1,67 (s)	1,67 (s)	15,9	15,93
$C(7')$	----	-	135,1	134,96
$CH_2(5')$	1,9 – 2,1 (m, 4H)	1,94 – 2,05 (m, 4H)	23,2	23,22
$CH_2(9')$			26,8	26,75
$CH_2(4')$	1,6 – 1,9 (m, 4H)	1,69 – 1,92 (m, 4H)	41,2	41,21
$CH_2(8')$			39,7	39,71
$CH_2(1a')$	5,00 (dd, J=17,0 e 1,3 Hz)	4,98	111,6	111,50
$CH_2(1b')$	5,05 (dd, J=10,5 e 1,3 Hz)	5,04		
$CH(6')$	5,09 (2t; J=7,5 Hz)	5,08	124,5	124,41
$CH(10')$			124,7	124,60
$CH(2')$	5,97 (dd, J=17,0 e 10,5 Hz)	5,97	147,1	147,10
$CH(5)$	6,78 (d, J=8,0 Hz)	6,77	119,3	119,09
$CH(6)$	6,73 (dd, J=8,0 e 2,0 Hz)	6,75	114,4	114,26
$CH(2)$	6,83 (d, J=2,0 Hz)	6,84	143,2	143,23
$C(3)$	----	-	115,1	114,98
$C(1)$	----	-	141,1	140,87
$C(4)$	----	-	141,4	141,42

* KIJJOA et al., 1980.

Instrumentos como TOF (*time of flight*) tem sido popularizado por possibilitarem informações sobre massa molecular devido à sua alta resolução (WOLFENDER, 2009).

A análise do padrão 4-NC por HPLC-MS-TOF (Figura 14) permitiu avaliar a massa molecular do composto. No modo positivo (+) o valor obtido foi de 315,2349 e no modo negativo (-) 313,2130, que concordam com o valor de massa molecular 314.4617 g/mol do 4-NC (KIJJOA et al, 1980).

Figura 14. Cromatograma do 4-NC (10µg/mL) e m HPLC-MS-TOF.

Tabela 5. Cálculo do erro experimental

Massa teórica	315,2318 g/mol
Massa calculada	315,2349 g/mol
Erro (ppm)	9,2291

4.3 Determinação da concentração de 4-NC do extrato de *Pothomorphe umbellata*, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC acoplada a um sistema de detecção Eletroquímico.

A curva de calibração do 4-NC foi realizada em triplicatas de 5 concentrações (2.5, 1.25, 0.625, 0.313 e 0.156 $\mu\text{g/mL}$) solubilizadas em etanol Lichrosolv® (MERCK®). O cálculo de regressão linear foi realizado pelo método dos mínimos quadrados. A precisão foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%) (Tabela 5), definido como o valor do quociente do desvio padrão pela concentração média determinada. Os valores são referentes a três dias diferentes. Conforme o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” – ANVISA, resolução 899 (2002). Os valores de limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e extensão do método estão descritos na Tabela 6.

Tabela 5. Valores da curva de calibração de 4-NC

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas *	Desvio- padrão	CV% inter dia
2,5	1.163.051	192462,819	16,55
1,25	584.225	115122,399	19,70
0,625	278.658	41061,652	14,73
0,313	142.423	23405,199	16,43
0,156	62.804	10139,2041	16,14

* média de triplicata

Tabela 6. Resultados de validação da metodologia de quantificação do 4-NC.

LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
0,06913	0,156	105,87

A partir da curva-padrão de 4-NC (Figura 15), e pela reta de regressão linear obtida, foi determinada a concentração de 8,02 % de 4-NC no extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellata*. As amostras foram solubilizadas em etanol:água (1:2) e o experimento realizado em triplicata.

Figura 15. Curva padrão do 4-NC, HPLC-EQ.

4.4 – Fracionamento líquido/líquido do extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*

A extração líquido/líquido a partir do extrato bruto hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata* (50g) resultou em 3 frações: fração hexânica (HEX) que corresponde a fase orgânica, fração *n*-butanólica (NBUT), de característica mais polar e fração aquosa (AQ) referente à fase aquosa residual do extrato. Adicionalmente, foi separada uma emulsão (EM) obtida durante o processo de extração com hexano. A Tabela 7 apresenta o rendimento do fracionamento.

Tabela 7. Rendimento do fracionamento do extrato de raiz de *P.umbellata* (50 g)

FRAÇÃO	Qtde FINAL (g)	%
HEX	5.4	10.8
NBUT	11.43	22.86
AQ	30.30	60.60
EM	1.82	3.64
TOTAL	48.95	97.9

A porção EM (emulsão) do fracionamento, por ser composta pelas fases aquosa e orgânica, foi descartada diante da dificuldade de separação das fases e por representar uma porção mínima dentre as frações (Tabela 7).

4.5 – Análise das frações por Cromatografia em Camada Delgada – CCD

Todas as frações (HEX, NBUT e AQ) foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) assim como o extrato bruto e o 4-NC isolado, utilizando como fase móvel diclorometano:metanol (91:1) e hexano:acetato de etila (70:30) (Figuras 16 e 17), sendo possível observar a presença do 4-NC na fração HEX, assim como outros compostos presentes nesta e na fração NBUT. A revelação da placa com solução de DPPH permitiu visualizar a presença de compostos antioxidantes na fração HEX e no extrato de *P.umbellata*. Além do 4-NC presente na fração HEX, a CCD indica que outros compostos com esta atividade estão presentes no extrato.

Figura 16. CCD do 4-NC do extrato bruto de *P.umbellata* (PU) e das frações hexânica (HEX), emulsão (EM), n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ). Visualização em 254nm, 365 nm e solução de DPPH para avaliação da atividade antioxidante. Fase móvel DCM:MEOH (91:1).

Figura 17. CCD do 4-NC, do extrato bruto de *P.umbellata* (PU) e das frações hexânica (HEX), emulsão (EM) n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ). Visualização em 254nm, 365 nm e solução de DPPH para avaliação da atividade antioxidante. Fase móvel HEX:AcOEt (70:30).

4.6 – Determinação de 4-NC nas frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

4.6.1 Análise das frações por detecção eletroquímica (HPLC-EQ)

O 4-NC foi detectado no extrato de raiz de *P.umbellata* e na fração HEX. Conforme esperado, nas frações NBUT E AQ não foram detectados a presença do composto 4-NC (Tabela 8). Os cromatogramas e os respectivos tempos de retenção (TR) são exibidos nas Figuras 18 e 19. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 8. Concentração de 4-NC nas frações por HPLC - eletroquímico

AMOSTRA	Concentração 4-NC (%)
<i>P.umbellata</i>	8.02 ± 0.6810
HEX	38.35 ± 2.9802
NBUT	-
AQ	-

Figura 18. Cromatogramas HPLC-EQ. (a) 4-NC 10 $\mu\text{g/mL}$, (b) *P.umbellata* e (c) HEX. Fase estacionária C8 (3 μm) e fase móvel metanol:água (9:1), KCl 2 mM e LiClO_4 20 mM, fluxo 1mL/min. Amostras de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 19. Cromatogramas HPLC-EQ. (d) NBUT e (e) AQ. Fase estacionária C8 (3 μ m) e fase móvel metanol:água (9:1), KCl 2 mM e LiClO₄ 20 mM, fluxo 1mL/min. Amostras de 100 μ g/mL.

4.6.2. Análise das frações por detecção ultravioleta (HPLC – UV)

As análises dos cromatogramas (Figura 21) das frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*, também demonstraram a presença do composto 4-NC na fração HEX, estando ausente nas frações NBUT e AQ (Tabela 9). A curva padrão está representada na Figura 20.

Tabela 9. Detecção de 4-NC das frações (250 µg/mL) por HPLC-UV

AMOSTRA	RT (min)	ÁREA
4-NC	6.772	1995.461
HEX	6.774	939.820
NBUT	-	-
AQ	-	-

Figura 20. Curva padrão 4-NC do dia. HPLC-UV, 282 nm.

Figura 21. Cromatogramas HPLC-UV (a) 4-NC, (b) HEX, (c) NBUT e (d) AQ. Amostras de 250 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvel $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (9:1). Leitura em 282 nm.

4.6.3 - Análise das frações por HPLC-UV-DAD

Os resultados da análise por HPLC-UV-DAD das frações, em fase móvel gradiente acetonitrila: água (ACN:H₂O) (5 – 100% ACN) mostraram compostos diferentes em cada fração (HEX, NBUT e AQ) e a presença majoritária do 4-NC na fração HEX. As Figuras 22-25 exibem os perfis cromatográficos.

Figura 22. Cromatogramas em 282nm do (a) 4-NC (TR= 30,087 min), (b) fração HEX, (c) fração NBUT e (d) fração AQ. Fase móvel gradiente ACN:H₂O (5 -100% ACN).

Figura 23. Cromatograma 4-NC (1mg/mL). Fase móvel gradiente ACN:H₂O (5 -100 % ACN). Leituras em (a) 240 nm, (b) 282nm, (c) 320nm, (d) 470nm e (e) 254nm.

Figura 24. Cromatograma fração NBUT (1 mg/mL). Fase móvel gradiente ACN:H₂O (5 – 100% ACN). Leituras em (a) 240 nm, (b) 282nm, (c) 320nm, (d) 470nm e (e) 254nm.

Figura 25. Cromatograma fração AQ (1mg/mL). Fase móvel gradiente ACN:H₂O (5 - 100 % ACN). Leituras em (a) 240 nm, (b) 282nm, (c) 320nm e (d) 470nm.

4.7 - Sub-fracionamento da fração n-butanólica - NBUT

A fração NBUT, por não conter 4-NC, foi escolhida para o sub-fracionamento. A amostra (1g) submetida à cromatografia líquida de média pressão – MPLC - Buchi[®] resultou em 30 sub-frações (50 ml cada) (Figura 26). O sub-fracionamento foi realizado por 5 dias consecutivos com o objetivo de obter melhor rendimento.

Figura 26. Gradiente MEOH:H₂O utilizado no fracionamento da fração NBUT por MPLC.

As sub-frações foram analisadas por CCD em fase móvel MEOH: H₂O (4:6) e reveladas em 254nm e 365 nm (Figura 27).

Figura 27. CCD das sub-frações da fração NBUT. Visualização em 254 e 365 nm. Fase estacionária sílica gel 60 e fase móvel ME OH:H₂O (4:6).

Após os resultados, as frações foram reagrupadas em 6 sub-frações (A, B, C, D, E e F) (Figura 28). O rendimento das frações está descrito na Tabela 10.

Figura 28. CCD das sub-frações NBUT (A, B, C, D, E e F) obtidas por cromatografia Flash - Buchi). Fase estacionária Silica C8 RP e fase móvel diclorometano e metanol (9:1). Visualização em 254 nm.

Tabela 10. Rendimento de cada sub-fração obtida da fração NBUT (5g)

Sub-fração	Quantidade (g)	Rendimento (%)
A	2.01	40.2
B	1.30	26.0
C	0.27	5.4
D	0.12	2.34
E	0.10	2.03
F	0.03	0.58
TOTAL	3.83	76.55

4.7.1 Isolamento dos compostos da fração NBUT

Dentre as 6 sub-frações submetidas a análise qualitativa por HPLC-DAD, as sub-frações D e E (Figuras 29 e 30) foram as que apresentaram picos de maior intensidade quando analisados em HPLC – DAD entre 230-240 nm. A partir dos cromatogramas e do resultado da CCD (Figura 28), foi desenvolvido a melhor condição de isolamento para as sub-frações D e E (Tabela 11). O cromatograma do isolamento dos compostos da sub-fração D está representado na figura 31.

Figura 29. Cromatograma sub-Fração D. HPLC-DAD, leitura em 240 nm, fase móvel metanol:água gradiente (5-100% MEOH).

Figura 30. Cromatograma sub-Fração E. HPLC-DAD, leitura em 240 nm, fase móvel metanol:água gradiente (5-100% MEOH).

Tabela 11. Fase móvel utilizada no isolamento dos compostos das sub-frações NBUT D.

T (min)	% MEOH	% H ₂ O
0 - 5	60	40
5.1 - 20	75	25
20.1-25	60	40

Figura 31. Cromatograma para isolamento dos compostos da sub-fração D.

4.8 - Avaliação da concentração de compostos fenólicos totais nas frações

Os resultados indicam que a fração HEX contém a maior quantidade de compostos fenólicos seguido do extrato bruto de raiz de *P.umbellata* e das frações NBUT e AQ (Tabela 12). Os valores observados são comparados ao valor do padrão do ácido gálico/g de amostra. A Figura 32 exibe as curvas padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 12. Concentração de fenólicos totais

Amostra	Eq. ác. gálico ($\mu\text{mol/g}$)
Ac. Gálico	5878
PU	232,61 $\pm$ 12,66
HEX	464,64 $\pm$ 22,58
NBUT	202,47 $\pm$ 9,83
AQ	74,37 $\pm$ 3,52

Figura 32. Curva padrão do ácido gálico e curvas referentes às amostras. *P.umbellata*, fração HEX, fração NBUT e fração AQ em análise de compostos fenólicos totais.

4.9 - Avaliação da concentração de flavonóides totais

De acordo com as condições dos métodos utilizados. Não foi detectado a presença de flavonóides e de flavanonas no extrato de raiz de *P.umbellata* na maior concentração avaliada de 1mg/mL. As Figuras 33 e 34 exibem a curva padrão para Quercetina e de Naringenina em análise de flavonóis totais e flavanonas totais, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estão descritos na Tabela 12.

Figura 33. Curva padrão de Quercetina para avaliação de flavonóis totais.

Figura 34. Curva padrão de Naringenina para avaliação de flavanonas totais.

Tabela 13. Limites de detecção e quantificação para Flavonóides totais

	LD	LQ	Exatidão	Precisão
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	(%)	(%)
Flavonóis totais	7,41	25,0	99,14	9,12
Flavanonas totais	55,0	125,0	95,56	14,61

*LD=limite de detecção e LQ= limite de quantificação. Metodologia validada no laboratório

4.10 - Avaliação da atividade antioxidante (*in vitro*) nas frações

4.10.1 Método DPPH

Entre as frações (HEX, NBUT e AQ) avaliadas quanto à atividade antioxidante por ensaio de DPPH, a fração HEX foi a que apresentou maior atividade (Tabela 14). O valor de concentração inibitória (IC₅₀) corresponde ao valor necessário para reduzir de 50% a concentração inicial do radical DPPH. O padrão foi o TROLOX[®]. As curvas de decaimento estão representadas na Figura 35.

Tabela 14. Atividade antioxidante por DPPH do extrato de *P.umbellata*, do 4-NC e das frações

AMOSTRA	IC ₅₀ (µg/mL)	µmol eq. TROLOX [®] /g
<i>P.umbellata</i>	232.50	299.67
HEX	67.43	1033.25
NBUT	466.50	149.35
AQ	1446.04	48.18
4NC	27.42	2541.40
TROLOX[®]	17.44	-

Figura 35. Curva de decaimento de DPPH do padrão TROLOX®, do extrato de *P.umbellata*, e das frações HEX, NBUT e AQ.

4.10.2 - Método ORAC

O ensaio de capacidade de absorvência de um radical do oxigênio (ORAC – *oxygen radical absorbance capacity*) é uma ferramenta para a avaliação antioxidante de fontes botânicas e suplementos nutritivos (PRIOR & CAO, 2000).

As frações obtidas e analisadas por método ORAC mostraram atividade antioxidante elevada para a fração HEX, seguida da fração NBUT e AQ (Tabela 15). Este resultado era em parte esperado considerando a atividade antioxidante representativa do composto isolado 4-NC, presente na fração HEX. O valor de atividade total refere-se à somatória da atividade particionada em porção hidrofílica e lipofílica. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados comparados à curva padrão de TROLOX[®] (4000 µmol/g) (Figura 36). Os valores são expressos em µmol equivalente TROLOX[®]/g de amostra.

Tabela 15. Atividade Antioxidante - ORAC das frações. Resultados expressos em µmol Eq. TROLOX[®]/g.

AMOSTRA	HIDROFÍLICO	LIPOFÍLICO	TOTAL
TROLOX			4000,00
4NC	0	47476,31±2698,15	47476,31
PU	1175,06±74,37	4413,92±252	5588,98
HEX	0	23349,00±1749,27	23349,00
NBUT	1007,63±86,87	0	1007,63
AQ	249,16±6,47	0	249,16

A fração HEX, na análise hidrofílica e as frações NBUT e AQ, na análise lipofílica, no ensaio piloto não mostraram atividade antioxidante significativa na maior concentração avaliada (1mg/mL).

Figura 36. Curvas padrão obtidas pelo ensaio ORAC.

4.11 – Avaliação de atividade antioxidante (*in vivo*) na pele de camundongos sem pêlo

Os camundongos tratados 2h antes da irradiação UVB (2 MED – 204.36 mJ/cm²) com as formulações (veículo, *P.umbellata* 0.1% 4-NC, NBUT 0.28% e NBUT 0.28% + 4-NC 0.1%) não apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo irradiado (Figura 37) sacrificados após 12h do tratamento. O resultado refere-se à média do experimento realizado em triplicata.

Figura 37. Atividade antioxidante *in vivo* por método ORAC (hidrofilico + lipofílico). Pele tratada topicamente com formulações 2h antes da exposição à radiação UVB (2 MED) e sacrificados após 12h. **p < 0.01, ***p < 0.001.

4.12 - Efeito da aplicação tópica do extrato bruto de *P. umbellata* e das frações N-butanólica e N-butanólica+4NC sobre as alterações causadas pela exposição aguda à radiação UVB

4.12.1 Formação de dímeros de pirimidina (CPD)

Após 2h de uma única exposição a uma dose de 2 MED (204.36 mJ/cm²) de radiação UVB foi possível observar a formação de dímeros de pirimidina (CPD) nos núcleos de queratócitos da epiderme dos grupos irradiados, sendo que nenhuma formação destes dímeros foi observada nos animais do grupo controle (Figura 38 e 39). Entretanto, há uma pequena redução significativa entre o grupo irradiado e o tratado topicamente com a formulação veículo 2h antes da irradiação com UVB.

Figura 38. Porcentagem de células marcadas para CPD, 2h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. * p < 0.5, ** p<0.01 e ***p<0.001.

[Almeida,R.L., 2011]

Figura 39: Fotomicrografias das marcações para CPD após 2h da exposição à radiação UVB - 2MED (aumento 200X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme e com irradiação; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratado com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado.

4.12.2 Marcação da proteína PCNA

Os tratamentos tópicos aplicados 2h antes da exposição à radiação UVB (2MED – 204.36 mJ/cm²) foi capaz de reduzir marcação da proliferação celular nos grupos tratados avaliada pela marcação da proteína PCNA 12h após a exposição, exceto para o grupo tratado com a fração NBUT+4NC comparados ao grupo irradiado (Figura 40 e 41).

Figura 40. Porcentagem de células marcadas para proteína PCNA, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. ** p<0.01 e *** p<0.001.

Figura 41: Fotomicrografias das marcações para PCNA após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado.

4.12.3 Marcação de células de queimadura solar (SBC)

A avaliação após 12h de exposição única a uma dose de 2 MED (204.36 mJ/cm²) de radiação UVB possibilitou observar a formação de células de queimadura solar (SBC – *sunburn cells*) em queratócitos da epiderme, exceto para o grupo NBUT+4NC, comparado aos animais do grupo controle (Figura 42 e 43). Entre o grupo irradiado houve redução com diferença estatística em relação aos grupos tratados com PU, NBUT e NBUT+4NC 2h antes da irradiação com UVB.

Figura 42. Porcentagem de células marcadas para SBC, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. *p<0.5, **p<0.01 e *** p<0.001.

Figura 43. Fotomicrografias das marcações para SBC após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado.

4.12.4 Marcação da proteína p53

A exposição aguda à radiação UVB (2 MED – 204.36 mJ/cm²) foi suficiente para promover o aumento na marcação da proteína p53 nos animais submetidos à radiação comparado ao grupo controle. A aplicação tópica 2h antes da exposição à radiação UVB (2MED – 204.36 mJ/cm²) reduziu a marcação da proteína p53 no grupo tratado com veículo e com o extrato de raiz de *P.umbellata*, mas não mostrou alteração significativa na marcação da proteína p53 para os grupos tratados com a fração NBUT e NBUT+4NC 12h após a exposição comparado ao grupo irradiado (Figura 44 e 45)

Figura 44. Porcentagem de células marcadas para proteína p53, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. ** p<0.01 e ***p<0.001.

Figura 45: Fotomicrografias das marcações para p53 após 12h da exposição à radiação UVB – 2 MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado.

4.12.5 Marcação da proteína p21

A exposição aguda à radiação UVB (2MED – 204.36 mJ / cm²) induziu a marcação da proteína p21 comparado ao grupo controle. O tratamento com as formulações tópicas (veículo, *P.umbellata* e NBUT) 2h antes da exposição UVB mostrou uma redução significativa na marcação de p21 apenas em relação ao grupo tratado com a fração NBUT+4NC, após 12h da exposição (Figura 46 e 47), comparado ao grupo irradiado.

Figura 46. Porcentagem de células marcadas para proteína p21, 12h após a irradiação UVB (2 MED) em relação ao grupo controle. Média de 3 campos por lâmina (n=3) por grupo. *** p<0.001.

Figura 47. Fotomicrografias das marcações para p21 após 12h da exposição à radiação UVB – 2MED (aumento 400X). (C) - controle sem tratamento e sem irradiação; (IR) irradiado sem tratamento; (V) veículo tratado com gel-creme irradiado; (PU) tratado com gel-creme contendo extrato de *P.umbellata* na concentração de 0,1% de 4-NC e irradiado, (NB) tratando com gel-creme contendo a fração N-butanólica na concentração 0,28% e irradiado, e (NB4NC) tratado com gel-creme contendo fração N-butanólica adicionada de 0,1% de 4-NC e irradiado.

4.13 Avaliação da atividade de MMPs (*in vitro*) por zimografia após exposição à radiação UVB

A atividade de MMP-2 e MMP-9 na pele, pode ser observada para os três tempos de sacrifício (12, 16 e 24h) (Figura 48) após a exposição de camundongos sem pêlo a dose única de radiação UVB (2 MED – 204.36 mJ/cm²) comparados ao grupo controle não irradiado. Experimento realizado em triplicata.

Figura 48. Zimografia de homogeneizados de pele de camundongos sem pêlo expostos à radiação UVB (2 MED) e sacrificados após 12, 16 e 24h. NI – não irradiado.

4.14 Avaliação da atividade inibitória de metaloproteinases - MMPs (*in vitro*) das frações por zimografia

O efeito inibitório da atividade gelatinolítica foi avaliado por meio da adição do extrato hidroalcoólico de raiz de *P. umbellata*, do 4-NC e das frações HEX, NBUT e AQ ao homogeneizado de pele e sobrenadante de células HT1080. Os ensaios foram avaliados na concentração de 100 µg/mL para a pele e HT1080. Os resultados obtidos sugerem atividade inibitória da atividade enzimática da MMP-2 e MMP-9 ativas pela fração NBUT (Figuras 49 e 50).

Figura 49. Zimografias de homogeneizados de pele tratados com 100µg/mL extrato hidroalcoólico de *P.umbellata*, 4-NC, HEX, NBUT, AQ e NBUT+4-NC. Os gráficos de barras representam as intensidades das bandas obtidas utilizando Image J. A atividade está expressa em unidades arbitrárias normalizada pela leitura do controle irradiado ao qual foi atribuído o valor 0% de inibição.

[Almeida,R.L., 2011]

Figura 50. Zimografias do sobrenadante de células HT1080, adicionadas de 100µg/mL do extrato de raiz de *P. umbellata*, 4-NC, frações HEX, NBUT, AQ e NBUT+4-NC. Os gráficos de barras representam as intensidades das bandas obtidas utilizando Image J. A atividade esta expressa em unidades arbitrárias normalizada pela leitura do controle irradiado ao qual foi atribuído o valor 0% inibição.

A avaliação da capacidade inibitória da atividade de MMP-2 e 9 foram observadas para a forma ativa da MMP-2 no homogenato de pele e HT1080 e na forma pró-MMP-9 para HT1080. A atividade da fração NBUT (isenta de 4-NC) quando adicionada de 4-NC resultou em uma diminuição da atividade das MMPs (Figuras 49 e 50), mas não maior do que do 4-NC isolado. Assim este resultado sugere que o efeito sinérgico sobre a atividade de MMPs 2 e 9 parece não ocorrer.

4.15 Avaliação da expressão protéica no homogeneizado de pele por Western Blot

As bandas referentes à proteína constitutiva β - actina, como controle da expressão da proteína, foram igualitárias para todos os poços de aplicação da amostra (Figura 51), mostrando que foram aplicadas as mesmas quantidades de proteína para cada amostra (20 e 40 μ g de homogeneizado protéico).

Figura 51. Avaliação da expressão protéica de β - actina (45 kDa), utilizada como controle de quantificação protéica.

5. DISCUSSÃO

Mundialmente 70-80% da população utiliza alguma forma de medicina complementar ou alternativa. Como forma popular de medicina tradicional, as plantas medicinais alcançaram uma parte significativa do mercado mundial. Entre 2003-2004, os rendimentos na Europa Ocidental foram de US\$ 5 bilhões, na China as vendas em 2005 totalizaram US\$ 14 bilhões, e no Brasil o lucro foi de US\$ 160 milhões em 2007 (WHO, 2008). A América do Sul abrange 1/3 da biodiversidade botânica mundial (DESMARCHELIER, 2010).

A utilização de plantas medicinais no tratamento e manutenção da saúde tem sido fato crescente e abrange os 5 continentes. Entre os medicamentos usados clinicamente 25% são derivados de plantas (PHILLIPSON, 2007). Segundo estimativa, cerca de 92% da população brasileira já fez uso de alguma planta medicinal (ABIFISA, 2010).

Em geral, as plantas medicinais são caracterizadas pelas atividades farmacológicas, e classe de compostos/princípio(s) ativo(s) provavelmente relacionado(s) a um determinado efeito.

Camellia sinensis, planta de origem asiática, e conhecida mundialmente como chá verde, tem sido descrita por apresentar atividade farmacológica antioxidante, antiinflamatória e antitumoral devido à presença de polifenóis, em particular as catequinas e epigallocatequinas (THANGAPAZHAM et. al., 2007; YUSSUF et al., 2007; BUTT et al., 2009).

A forma de uso das plantas medicinais pode ser dividida em: (1) constituintes puros isolados e (2) mistura complexa de vários constituintes, como as infusões, óleos essenciais, tinturas, extratos ou material particulado em diferentes preparações galênicas (HAMBURGER & HOSTTETMANN, 1989).

Para a obtenção de compostos naturais farmacologicamente ativos, o processo de isolamento e identificação dos compostos naturais requer padronização para (1) garantir a dose efetiva do princípio ativo, (2) manutenção do controle de composição e (3) estabilidade do princípio ativo (HAMBURGER & HOSTTETMANN, 1989). A aplicabilidade destes objetivos depende da escolha dos processos de obtenção e análise empregados.

As metodologias aplicadas em fitoquímica abrangem técnicas cromatográficas analíticas. Misturas complexas requerem técnicas sofisticadas que sejam capazes de caracterizar com boa sensibilidade e seletividade, assim como dar informação estrutural dos constituintes de interesse (MARSTON, 2007, MARSTON & HOSTTETMANN, 2009).

5.1 Fracionamento do extrato hidroalcoólico de raiz de *P.umbellata*

A obtenção das frações isenta de 4-NC, princípio ativo de *P.umbellata*, foi realizada por meio de esgotamento por partição líquido-líquido do 4-NC com hexano, devido às tentativas anteriores sem sucesso de extração em coluna em gradiente de polaridade de solvente. Esta forma de fracionamento resultou em 3 frações: hexânica (HEX), n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ) (Figura 6 e Tabela 7). A análise das frações por HPLC - eletroquímico e UV comprovou a ausência do 4-NC nas frações NBUT e AQ, satisfazendo a primeira etapa do projeto

[Almeida, R.L., 2011]

(Figuras 18, 19 e 20 e Tabelas 8 e 9). O solvente hexano extrai compostos apolares, e o butanol e a água compostos mais polares, como agliconas e glucosídeos (MARKHAM, 1982).

Conforme afinidade dos compostos e características dos solventes, a fração HEX provavelmente extrai terpenos e acetofenonas e a fração NBUT as classes de flavonóides glicosilados, taninos, saponinas e carboidratos (CECHINEL & YUNES, 1998).

As cores observadas na CCD (Figura 17) após revelação com luz UV sugerem a presença de compostos do grupo de cumarinas, saponinas ou flavonóides (WAGNER, 1995). A atividade antioxidante descrita para a *P.umbellata*, na qual o 4-NC é parcialmente responsável (BARROS et al., 1996), abriu a possibilidade de avaliação desta propriedade sem a presença do composto majoritário. A visualização da CCD (Figura 16 e 17) indicando a presença de substâncias capazes de reduzir o DPPH sugere a possível atividade antioxidante complementar dos demais compostos presente no extrato.

5.2 Sub-fracionamento da fração NBUT e isolamento dos compostos

O processo de sub-fracionamento da fração NBUT mostrou rendimento de 2.34 e 2.03% para as sub-frações D e E (Tabela 10) do extrato bruto de *P.umbellata*, que apresentaram compostos visualizado após irradiação em 254nm (Figuras 27, 28,29 e 30).

Em relação aos resultados obtidos do proceso de isolamento e caracterização dos compostos presentes nas sub-frações D e E – NBUT, foi possível apenas a visualização geral dos compostos por HPLC – DAD, que

apresentaram melhor visualização entre o comprimento de onda de 230 – 240 nm (Figuras 29 e 30). A quantidade final obtida dos compostos isolados não foi suficiente para a realização da caracterização por HPLC-MS e análise por RMN.

5.3 – Avaliação da atividade antioxidante e da concentração de compostos Fenólicos e Flavonóides no extrato de *P.umbellata* e nas frações obtidas

Compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes são descritos por apresentarem função protetora contra doenças crônicas incluindo câncer e doenças cardiovasculares, ambas associadas ao processo de estresse oxidativo (TSAO & DENG, 2004). Estruturas catecólicas são capazes de atuar como sequestradores de radicais (RICE-EVANS et al.,1996), como é observado para o 4-NC, que tem a estrutura de um anel catecol acoplado a uma cadeia alifática a uma cadeia alifática saturada.

Embora na CCD revelada com DPPH (figuras 16 e 17), as frações NBUT e AQ mostrem atividade antioxidante, os resultados obtidos pelo ensaio de atividade de seqüestro de radical DPPH demonstram que o maior responsável pela atividade antioxidante corresponde a fração HEX ($IC_{50} = 67.43 \mu\text{g/mL}$) que contém 4-NC e que os outros compostos das frações NBUT e AQ contribuem em menor proporção para esta atividade ($IC_{50} = 466.50$ e $1446.04 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Tabela 14).

Na avaliação de atividade antioxidante *in vitro* – ORAC, os valores indicam a capacidade de 10x maior para o 4-NC em relação ao padrão TROLOX[®] ($47476,310$ e $4000,00 \mu\text{mol Eq. TROLOX}^{\text{®}}/\text{g}$, respectivamente)(Tabela 15). Este resultado mostra a potencialidade do composto, e a sua importância na

composição do extrato bruto quanto a essa atividade. As frações NBUT e AQ apresentaram capacidade antioxidante por ORAC de 1007,630 e 249,160 μmol Eq. TROLOX[®]/g, respectivamente. Considerando que a fração NBUT representa 22,86%, AQ 60,6% e HEX 10,8% do extrato bruto, suas atividades antioxidantes referem-se a 4,11, 2,68 e 45,13% do extrato bruto de *P.umbellata*. A somatória das atividades das frações HEX, NBUT e AQ correspondem a 2902,00 mmol eq. Trolox, o que equivale a 52% da atividade total do extrato bruto de raiz de *P.umbellata* (5588,00 mmol eq. Trolox/g). Uma possível explicação para este fato se deve a emulsão formada entre as frações HEX e NBUT. Esta emulsão corresponderia a cerca de 3,64% da massa total do extrato. Considerando que o 4NC deve estar presente nesta fase e ele é responsável por grande parte da atividade antioxidante, esta perda de massa pode explicar a diferença na quantificação da atividade total do extrato.

Estudos descrevem a relação entre atividade antioxidante e quantidade total de compostos fenólicos, sugerindo como um importante indicador da capacidade antioxidante (JAYAPRAKASHA et al., 2008; PRASAD et al., 2009). Frações polares de *Salvia virgata* apresentaram maior capacidade de sequestro de radical DPPH e maiores quantidades de compostos fenólicos totais do que as frações apolares (KOSAR et al., 2008).

O doseamento de compostos fenólicos totais do extrato de raiz de *P.umbellata* indica a presença destes compostos, em quantidade 2x maior na fração HEX em relação à NBUT ($464,64 \pm 22,58$ e $202,47 \pm 9,83$ $\mu\text{mol/g}$ Eq. Ácido gálico, respectivamente)(Tabela 12), podendo assim correlacionar a maior atividade antioxidante observada no ensaio de DPPH para a fração HEX devido à presença de compostos fenólicos.

Os flavonóides foram descritos com baixa atividade de seqüestro de radical por DPPH (HO et al., 2000, LU et al., 2002), fato que poderia explicar o resultado obtido para a fração NBUT. Entretanto a avaliação de flavononas e flavonóides totais resultaram em valores sem significância (item 4.1.1), sugerindo que a atividade antioxidante observada não está diretamente relacionada à presença de flavonóides no extrato.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante (*in vivo*) e efeito da aplicação tópica do extrato bruto de *P. umbellata* e das frações N-butanólica e N-butanólica+4NC sobre as alterações causadas pela exposição aguda à radiação UVB

Propriedades farmacológicas da flora vêm sendo estudadas de forma crescente, como fontes de proteção e prevenção de diversas doenças. Um fator de crescente pesquisa é a capacidade antioxidante e fotoprotetora de compostos naturais contra os efeitos nocivos da radiação UV solar.

A exposição aguda a doses elevadas e a crônica em doses baixas de radiação UV altera antioxidantes distintos (FUCHS, 1998). Conforme a dose, tempo de exposição, comprimento de onda e região exposta, a radiação UV pode causar desde queimaduras na pele e envelhecimento cutâneo precoce até danos ao DNA celular cutâneo e câncer de pele (SCHARFETTER-KOSHANEK et al., 1997, MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

A análise dos dados do ensaio de atividade antioxidante de pele por ORAC indicou a depleção de cerca de 20% do sistema antioxidante da pele no grupo irradiado após 12h. Entretanto, o tratamento dos camundongos sem pêlo (HRS/J) com formulações gel-creme, extrato de *P.umbellata* (0.1% 4-NC), N-butanólica 0.28% e N-butanólica 0.28% + 0.1% 4-NC 2h antes da exposição à radiação UVB aguda (2 MED -204.36 mJ/cm²) não foi capaz de modular a atividade do sistema antioxidante da pele sob os efeitos da radiação UV (Figura 37). Os resultados podem estar relacionados com o fato de não ter ocorrido à permeação dos compostos presentes na formulação. ROPKE e colaboradores (2002) demonstraram que a permeação do 4-NC (16 µg/cm² pele) era responsável pelos efeitos do extrato bruto de raiz de *P.umbellata* nas camadas inferiores da pele.

A radiação UV é capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele e princípios ativos antioxidantes aplicados topicamente necessitam portanto, alcançar as camadas cutâneas mais profundas (SAIJA et al., 2000). Para que uma substância desempenhe sua função na pele, precisa primeiramente alcançar o local de ação, seja a parte mais externa, epiderme, ou a área mais profunda, a derme. A camada córnea tem papel importante no controle da absorção percutânea de substâncias (PRASCH et al., 2001) e a passagem por esta camada é o fator limitante do processo por ser a etapa mais lenta (MARTIN & BUSTAMANTE, 1993).

A irradiação UV aguda é capaz de induzir lesões no DNA entre resíduos adjacentes de bases pirimidicas (timina ou citosina) causando mutações do tipo dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) ou 6-4-fotoprodutos (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002), e a formação de células de queimadura solar (SBC)

por apoptose (OUHTIT et al., 2000) cuja função é de reduzir o risco de transformação maligna e depende do estado do queratinócito, dose de UVB e do balanço entre os fatores de sobrevivência e morte (LAETHEM et al., 2005). A proteína denominada de fator de proliferação celular (PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*) tem papel importante na replicação e reparo do DNA (MOORE et al., 2006). O gene supressor de tumor p53 é alvo de inativação em diversos tumores humanos, e sua ativação ocorre por diversos estímulos e sua atividade envolve a parada do ciclo celular e apoptose, incluindo a indução da proteína p21, que bloqueia a progressão do ciclo celular em G1 para que ocorra o reparo do DNA lesado (OUHTIT et al., 2000; KURIBAYASHI & EL-DEIRY, 2008).

Compostos fitoquímicos com propriedades quimiopreventivas têm apresentado capacidade suficiente para diminuir com segurança a incidência das neoplasias devido às causas ambientais. Os efeitos anticarcinogênicos dos compostos fitoquímicos afetam a sinalização celular por interferir com proteínas quinases, lipídeos e fatores de transcrição. A interação com alvos celulares pode ocorrer pelo efeito na membrana plasmática, sobre a sinalização citoplasmática e diretamente no núcleo celular (DING et al., 2009).

Dentre os efeitos agudos da exposição à radiação UV, os danos iniciais como a formação de dímeros de pirimidina (CPD) e células de queimadura solar (SBC – *sunburn cells*), indução de proliferação celular (PCNA) e alterações na expressão de proteínas como p53 e p21 colaboram na determinação de indícios de mudanças que podem promover a progressão de tumores caso não sejam revertidos.

O ensaio de imunohistoquímica realizado mostrou o aumento da marcação após 12h da irradiação aguda UVB (2 MED - 204.36 mJ/cm²) para PCNA, SBC, p53 e p21 e após 2h para CPD no grupo irradiado em relação ao controle. A exposição à radiação aplicada neste estudo foi efetiva no processo de indução dos marcadores celulares. Estes resultados concordam com os observados por OUHTIT e colaboradores (2000), em que houve aumento máximo da marcação de SBC e p21 para o grupo irradiado, após 24h da exposição aguda à radiação UVB e após 12h para p53 e 48h para PCNA.

BERTON e colaboradores (2001) descreveram o aumento de expressão protéica de p53 e p21 em resposta ao dano ao DNA induzido por uma dose única correspondente a 1MED (90 mJ/cm²) de radiação UVB entre 6 e 48h. Sendo que o pico para p53 foi de 15h e p21 de 24h. Os autores sugerem a participação do p21 no processo de reparo ao DNA, apoptose, progressão do ciclo celular e/ou diferenciação.

A avaliação da modulação de marcadores celulares por imunohistoquímica diante da exposição aguda à radiação UVB na dose 2 MED (204.36 mJ/cm²) mostrou que o tratamento com as formulações contendo extrato de *P.umbellata* (PU) e as frações NBUT e NBUT+4NC não foi capaz de reduzir significativamente a marcação para CPD (Figura 39).

Adicionalmente, os resultados observados mostram que o tratamento com as formulações PU, NBUT e NBUT+4NC foram capazes de reduzir a formação de SBC em 40, 33 e 26%, respectivamente, em relação a grupo irradiado (Figura 42). Além disso, a marcação para a proteína de proliferação celular PCNA mostrou-se reduzida 13% no grupo tratado com o veículo, 28% com PU e 34% para NBUT em

comparação ao grupo irradiado (Figura 41). A marcação para a proteína p53 teve redução significativa (20%) para os grupos veículo e PU, entretanto a marcação para a proteína p21 mostrou redução significativa (38%) apenas para o grupo NBUT+4NC comparado ao grupo irradiado (Figuras 44 e 45).

A administração oral de polifenóis de chá verde (GTP) e epigallocatequina galato (EGCG) durante 10 dias em camundongos inoculados com células de tumores de mama, induziu a apoptose e inibiu a marcação de PCNA, mostrando o efeito anti-proliferativo destes constituintes naturais (THANGAPAZHAM et al., 2007).

MOORE e colaboradores (2006) observaram uma relação inversa após 6 e 12h entre a marcação de CPD e as concentrações de genisteína (10, 20 e 50 μM) utilizadas no tratamento prévio de 1h à radiação UVB (20 e 60 mJ/cm^2) em pele humana reconstituída. O tratamento mostrou a redução da marcação para PCNA após 6h da exposição à radiação UVB, entretanto após 12 e 14h a marcação foi reestabelecida.

Estudo realizado com aplicação tópica de silibina (9mg/200 μL acetona) em camundongos 30 minutos antes da irradiação UVB (180 mJ/cm^2) em dose única, reduziu a formação de CPD em 75%, inibiu a marcação de PCNA em 50% após 12h e regulou positivamente p53 e p21 após 8h, sugerindo atividade na inibição do crescimento celular (DHANALAKSHMI & MALLIKARJUNA, 2004).

Os dados observados mostram-se relevantes uma vez que há redução de SBC, indicando possível atividade inibitória do processo de apoptose, e a manutenção da marcação elevada para p21 nos grupos tratados topicamente e

irradiados, dão indícios de que a atividade indicativa de reparo está sendo sinalizada e que pode estar relacionada ao declínio da marcação para o PCNA, uma vez que o p21 pode ligar-se ao PCNA interferindo na atividade da DNA polimerase inibindo a replicação do DNA (ABBAS & DUTTA, 2009).

Segundo da SILVA e colaboradores (2009) foi observado o aumento de PCNA e p53 após 12h no tratamento tópico de gel de carbopol contendo extrato bruto de *P.umbellata*, assim como a marcação de CPD, modulada de forma negativa (redução de aproximadamente 32%) pela ação do extrato bruto de *P.umbellata* após 2h da exposição UVB.

A diferença observada neste estudo pode estar relacionada a escolha da formulação empregado para o tratamento tópico dos animais, uma vez que os dados descritos na literatura correspondem a formulação gel enquanto que neste estudo foi empregado uma formulação gel-creme, visando a absorção de outros compostos, ainda desconhecidos, que pudessem apresentar atividade antioxidante e atuar, portanto como auxiliaries nos resultados obtidos com o extrato bruto de raiz de *P.umbellata*, no qual parte desta atividade está descrita para o 4-NC, o composto isolado majoritário desta espécie vegetal.

Conforme descrito por ROPKE e colaboradores (2002) a formulação gel foi escolhida por apresentar melhor fluxo de permeabilidade para o 4-NC dentre as formulações estudadas (gel, gel-creme e creme). Um fator importante para a determinação da permeação de um fármaco é sua lipofilicidade, que determina sua distribuição no estrato córneo. Substâncias com coeficiente de partição octanol/água maior que 1 tendem a permanecer na pele (ACT et al., 2001). O 4-NC apresenta um coeficiente de partição octanol/água de 6,032 (FREITAS, 1999)

demonstrando maior afinidade pelo estrato córneo. O coeficiente de partição K indica a afinidade entre o veículo e o fármaco, e a liberação do fármaco é favorecida pela escolha de veículo com baixa afinidade pelo fármaco (IDSON, 1983). O 4-NC apresentou o maior valor de coeficiente de partição K, para a formulação gel, seguida da gel-creme e creme ($0,64 \pm 0,28$, $0,31 \pm 0,07$; $0,09 \pm 0,02$, respectivamente), informando assim sua baixa afinidade pela formulação. Além disso, o gel com o extrato bruto de raiz de *P.umbellata* resultou em um menor valor de K, o que sugeriu a influência de outras substâncias presentes no extrato sobre a afinidade do 4-NC a formulação (ROPKE, 2003).

A melhora de uma absorção percutânea envolve a escolha de um veículo apropriado, considerando a solubilidade, concentração do permeante e pH (IDSON, 1983; PIROT et al., 1996). O fracionamento do extrato bruto de raiz de *P.umbellata*, isento de 4-NC, resultou em duas frações finais, a fração N-BUT (n-butanólica) e a AQ (aquosa). Devido à característica dos solventes utilizados nas frações, optou-se pela formulação gel-creme nos estudos *in vivo* por ter esta característica de emulsão O/A (óleo/água) com fase interna lipofílica e fase externa hidrofílica, visando que os compostos, ainda não identificados apresentassem melhor solubilidade na formulação. A avaliação da permeação cutânea não foi realizada pelo fato de não haver um marcador conhecido para a realização dos compostos permeantes, necessário para avaliação.

5.5. Avaliação da atividade inibitória de metaloproteinases (*in vitro*)

A exposição a fatores de estresse ambiental, como ozônio (O₃), cigarro e radiação UV são capazes de promover o aumento da expressão e atividade de

[Almeida, R.L., 2011]

MMPs na pele (FORTINO et al., 2007). Em tecidos adultos, a expressão de MMPs normalmente ocorre em baixos níveis, e em geral são regulados positivamente em condições de remodelamento tecidual ou patológica (FOLGUERAS et al., 2004). As MMPs normalmente não expressas constitutivamente, têm sua expressão induzida por sinais exógenos, como citocinas, fatores de crescimento ou alteração entre o contato célula-matriz ou célula-célula (AMALINEI et al., 2007).

As metaloproteinases de matriz MMP-2 (gelatinase A, 72 kDa) e MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa) são ativadas na superfície celular e digerem colágeno e gelatina denaturadas (EGEBLAD & WERB, 2002, VISSE & NAGASE, 2003). O aumento da atividade de MMP-2 (pró e ativa) foi observada em camundongos jovens e idosos de forma semelhante após exposição à radiação UV (0.09 J/cm^2) por 4 dias. Entretanto, o aumento da MMP-9 foi observado apenas nos animais idosos submetidos à radiação UV, sugerindo a relação entre envelhecimento, estresse oxidativo e MMPs como causa da fragilidade cutânea aos danos induzidos por fatores externos (FORTINO et al., 2007).

Baixas doses de UVB são suficientes para induzir o fator de transcrição A P – 1 e fator de necrose tumoral B (NF - κ B), conhecidos estimuladores dos genes de MMPs (ANGEL et al., 1987, SATO & SEIKI, 1993). A exposição a 1 MED – UVB, em simulador solar (equivalente aproximadamente a 2-3 minutos sob radiação solar em um dia de verão) induziu em 6x a expressão protéica e 4x a atividade de MMP- 9, avaliados por Western-blot e zimografia. O aumento do RNAm de MMP-9 foi de 4x, observado após 16h com pico máximo de 6x, 24h após exposição à radiação UVB (2 MED) (FISHER et al., 1996). A radiação

UV além de degradar o colágeno contribui para a redução de sua síntese por inibir a expressão de genes de colágeno I e III (MONTAGNER & COSTA, 2009). Adicionalmente, ocorre o aumento de MMPs capazes de degradar a matriz extracelular (MEC) (MMP-1, -3 e -9) via AP-1 após 8h da exposição à radiação UV (RITTIÉ & FISHER, 2002).

A indução do aumento de MMP-2 e MMP-9 em camundongos irradiados (UVB – 2 MED 204.36 mJ/cm²) (Figura 48) observados após 12, 16 e 24h exibe a resposta ao estímulo da radiação UVB sobre a pele e corresponde aos resultados descritos por FISHER (1996) e RITTIÉ & FISHER (2002).

A administração oral de polifenóis de chá verde (GTP) (12 mg/dia) foi capaz de inibir a expressão de MMPs na pele de camundongos sem pêlo expostos cronicamente à radiação UVB. A avaliação por western blot mostrou inibição de 67% para MMP-2, 63% para MMP-3, 62% para MMP-7 e 60% para MMP-9. O tratamento com GTP também foi capaz de reduzir o aumento da espessura da epiderme comparado ao grupo exposto à radiação sem tratamento (VAYALIL et al., 2004).

ROPKE e colaboradores (2006) demonstraram maior atividade inibitória de pró-MMP-9 e -2 do extrato bruto de *P.umbellata* em relação ao 4-NC isolado em diferentes concentrações *in vitro*, e não observaram diferença significativa para a MMP-2 *in vivo*. Aplicando as mesmas condições *in vitro*, o extrato de folhas de *P.umbellata* (0.1% 4-NC), cuja concentração de 4-NC foi 30% menor em relação ao extrato de raiz, foi capaz de inibir em 80% a atividade de pró-MMP-2 e -9 (ALMEIDA et.al., 2008).

Os resultados de avaliação da atividade de MMP-2 e -9 *in vitro* de homogenato de pele de camundongos expostos à radiação UVB (2 MED) e sacrificados após 24h adicionados do extrato de *P.umbellata*, 4-NC e frações HEX, NBUT e AQ (100 µg/mL) demonstram uma tendência de inibição da atividade proteolítica principalmente da MMP-2 e da MMP-9 ativas pela fração NBUT (Figura 49) sugerindo que a atividade inibitória não está necessariamente relacionada à atividade antioxidante.

Células de fibrosarcoma (HT1080) mantidas em cultura celular sintetizam e secretam MMP-2 e -9 (STANTON et al., 1998). A avaliação como um controle positivo do experimento, com o sobrenadante de células HT1080, por zimografia adicionados do extrato de raiz de *P.umbellata*, do 4-NC e das frações HEX, NBUT, AQ e NBUT+4-NC exibem visualmente o efeito inibitório da adição das amostras (100 µg/mL) sobre a atividade das MMP-2 e -9 (Figura 50).

A regulação de MMPs acontece por (1) transcrição gênica, (2) ativação da proenzima e (3) inibição da atividade enzimática (FOLGUERAS et al., 2004, JACKSON et al., 2010). Sua atividade é regulada constitutivamente pelas proteínas endógenas TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) (JACOBSEN et al., 2010).

Os inibidores de MMPs (MMPIs), cuja função é de conter a atividade das MMPs compreendem (1) os ZBG – *Zinc binding group*, capazes de se ligarem ao íon metal do sítio catalítico da enzima e (2) NZB-MMPI – *Non-zinc-binding MMPI*, capazes de interagir de forma não covalente com os sub-sítios específicos presentes ao redor do sítio ativo da proteína (JACOBSEN et al., 2010).

Conforme descrito por ROPKE e colaboradores (2006), a atividade inibitória dos compostos presentes no extrato de *P.umbellata*, e de forma mais específica do 4-NC, foi atribuída à atividade quelante sobre o zinco (Zn^{2+}). Esta hipótese faz-se provável uma vez que no modelo experimental descrito a inibição foi demonstrada *in vitro* adicionando-se o extrato bruto de *P.umbellata* ao tampão de incubação, contendo Zn^{2+} . Assim, o 4-NC ou outros compostos do extrato de raiz de *P.umbellata* podem ter quelado o Zn^{2+} do tampão ou ainda interagido com o Zn^{2+} do sítio ativo catalítico da enzima, impedido a ativação das MMPs.

GRIMM e colaboradores (2004) mostraram que o picnogenol e dois produtos de sua biotransformação, δ -(3,4-diidroxifenil)- γ -valerolactona (M1) e δ -(3-metoxi-4-hidroxifenil)- γ -valerolactona (M2), foram capazes de inibir a atividade de MMP-1, -2 e -9. Os compostos M1 e M2 foram mais efetivos na inibição enzimática do que o picnogenol e a (+)-catequina, seu precursor metabólico. A ação quelante ao Zn^{2+} do sítio ativo catalítico foi observada para MMP-9. Entretanto, na presença de Zn^{2+} (10 μM) a inibição foi revertida para M1 e M2. A manutenção do efeito inibitório do picnogenol após a adição de Zn^{2+} sugeriu sua ação por ligação direta ao sítio ativo. M1 e M2 também inibiram de forma dose-dependente a secreção ($\text{IC}_{50} = 0.5\mu\text{M}$) de MMP-9 em monócitos humanos isolados. A atividade antioxidante total foi maior para M1, seguido da (+)-catequina, ácido ascórbico, M2, ácido ferrúlico e taxifolina. Adicionalmente, M1 foi o composto de maior capacidade de seqüestro de radical livre. O fato de M1 e M2 apresentarem capacidade inibitória de MMPs semelhantes e atividade antioxidante de seqüestro de radical diferentes indica que a inibição de MMPs não está diretamente relacionada à atividade antioxidante.

A inibição de MMP-2 e MMP-9 descrita neste trabalho (Figura 14 e 15) sugere a possibilidade de ação inibitória direta ao sítio ativo da enzima ativa, uma vez que foi observada maior redução de atividade das enzimas ativas em comparação as formas zimógenas (pró-MMP-2 e pró-MMP-9). Outra possibilidade é a de ligação dos compostos com o Zn^{2+} no sítio catalítico, impedindo a ativação.

Segundo SARTOR e colaboradores (2002) a inibição das gelatinases (IC_{50}) depende de hidroxilas presentes no anel aromático e/ou um grupo pirano, enquanto grupos glicosídicos podem alterar a conformação resultando em fraca interação enzimática e, portanto, pouca inibição da atividade proteolítica. Dentre os 27 compostos avaliados para a inibição de MMP-2 e MMP-9, baicaleína, delfinedina, epigallocatequina-3-galato, fisetina, miricetina, morina e pelargonidina foram os que apresentam IC_{50} inferior a 10 μM . A presença de 3 grupos hidroxila nos anéis aromáticos A e B dos compostos polares, e o grupo galoil no carbono 3 para os compostos apolares, foram descritos como possíveis determinantes da atividade.

Evidências indicam que as MMPs intervêm em muitas mudanças no microambiente durante a progressão tumoral, e dependendo das circunstâncias podem suprimir ou promover tumorigênese ou atuar independentemente de sua atividade proteolítica (KESSENBROCK et al., 2010). Faz-se necessário o conhecimento dos sistemas regulatórios e proteolíticos para novas estratégias de controle e inibição de MMPs (FOLGUERAS et al., 2004).

Os MMPs utilizados apresentam amplo espectro e têm sido falhos em testes clínicos devido a pouca eficácia por perda de especificidade, baixa disponibilidade oral e farmacocinética, e aos efeitos adversos (AGRAWAL et al., 2008, JACKSON et al., 2010).

A investigação dos mecanismos de ação e melhor compreensão das propriedades farmacológicas de *P.umbellata* e delineamento da continuidade da pesquisa relacionada à capacidade fotoprotetora e modulatória da atividade de MMPs podem trazer benefícios a saúde e direcionamento de novas estratégias de prevenção aos danos celulares que ocorrem como resposta aos diversos efeitos deletérios indesejáveis provocados pelos fatores ambientais ao qual estamos diariamente expostos.

6. CONCLUSÕES

1. O fracionamento do extrato de raiz de *P.umbellata* resultou em 3 frações: hexânica (HEX), n-butanólica (NBUT) e aquosa (AQ), sendo as duas últimas isentas de 4-NC, satisfazendo o primeiro objetivo do projeto.
2. A avaliação da atividade antioxidante das frações por DPPH e ORAC demonstrou uma atividade significativa para a fração NBUT, embora inferior ao da fração HEX, que contém o 4-NC, assim como a presença de compostos fenólicos. Entretanto não foi detectada a presença de flavonóides nas frações obtidas a partir do extrato bruto de raiz de *P.umbellata*.
3. Em relação ao experimento de avaliação da atividade fotoprotetora sob exposição aguda à radiação UVB, o sistema antioxidante da pele após 12h mostrou-se insuficiente para repor os níveis basais depletados em aproximadamente 20% pela radiação observada comparado ao controle. O tratamento tópico com o extrato de PU, a fração NBUT e NBUT+4NC não foi capaz de reverter a redução da atividade antioxidante da pele induzida por UVB.
4. O tratamento tópico com formulações contendo *P.umbellata*, e as frações NBUT e NBUT+4NC 2h antes da exposição aguda a 2 MED (204.36 mJ/cm²) de radiação UVB não foi capaz de reduzir a formação de dímeros de pirimidina (CPD) após 2h. Entretanto, a marcação de células de queimadura solar (SBC) e do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) após 12h foi reduzida para os grupos PU e NBUT. A marcação para p53 e p21 também foi diminuída para os grupos PU e NBUT+4NC, respectivamente. Apesar da ausência de dados referentes à permeação da formulação gel-creme O/A utilizada, estes dados contribuem para a sugestão de que outros compostos adicionais, no caso

presentes na fração NBUT e provavelmente com características mais polares contribuir para com o efeito fotoprotetor do extrato bruto de raiz de *P.umbellata*.

5. A fração NBUT foi capaz de inibir a atividade de MMP-2 e MMP-9 ativas no homogenato de pele de camundongos sem pêlo submetidos à radiação UVB correspondente a 2 MED (204.36 mJ/cm²), assim como para o sobrenadante de células HT1080. O fato de a fração apresentar uma menor atividade antioxidante, comparado a fração HEX, pode indicar que a atividade inibitória de MMPs não está necessariamente relacionada à capacidade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS,T., DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat. Rev. Cancer**, v.9 (6), p. 400-414, 2009.
- ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/faq.asp>. Acesso em 21 de junho de 2010.
- ACT, J., GRONWALD, M.; KASIURA, K. Possibilities for the prediction of an active substance penetration through epidermis. **IFSCC Mag.**, v.4, p.179-183, 2001.
- ADAMI, Y.L.; MILHOUS, W.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. In vitro antimalarial activity of crude extracts of *Pothomorphe peltata* and *P. umbellata* (Piperaceae). **Tropical medicine**, v.40, p.91-94, 1998.
- ADHAMI, V.M., SYED, D.N., KHAN, N., AFAQ, F. Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. **Photochem Photobiol.**, v.84, n.2, p.489-500, 2008.
- AFAQ, F., ADHAMI, V.M., AHMAD, N., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 784-792, 2002.
- AFAQ, F., ADHAMI, V.M., MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat Res.**, v.571, p.153-73, 2005.
- AFAQ, F., MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Exp Dermatol.**, v.15, n.9, p.678-84, 2006.
- AGRAWAL, A.; ROMERO-PEREZ, D.; JACOBSEN, J.A.; VILLARREAL, F.J.; COHEN, S.M. Zinc-Binding Groups Modulate Selective Inhibition of MMPs. **Chem. Med. Chem.**, v.3, n.5, p.812–820, 2008.
- AHMAD, F.B.; TAWAN, C. Phytochemical studies on Piper umbellatum L. ASEAN – Review of Biodiversity and Environmental Conservation, p.1-4, 2002.
- AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, 2, p.875-877, 2007.

- ALMEIDA, R.L.; DA SILVA, V.V.; RIVELLI, D.P.; MIRANDA, D. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M.; ROPKE, C. D. Standardization and determination of photostability of leaf extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) and evaluation of the inhibition *in vitro* of metalloproteinases 2 and 9 in skin. **Braz. J. of Pharm. Sci.**, v.44, n.1, p.43-50, 2008.
- AMALINEI, C.; CARUNTU I-D.; BALAN, R.A. Biology of metalloproteinases – review. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.48, n.4, p.323-334, 2007.
- AMORIM, C.Z.; FLORES, C.A.; GOMES, B.E.; MARQUES, A.D; CORDEIRO, R.S.B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. **J. Ethnopharmacol**, v.24, p.101-106, 1988.
- ANDRADE, N.S.; SOUZA, M.R.; PERAZZO, F.F.; BASTOS, J.K.; MAISTRO, E.L. Evaluation of the Mutagenic Potential of a Water-Ethanol Extract of *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) Aerial Parts on Wistar Rats Cells by the Comet and Micronucleus Assay. **Cytologia**. v.70, n.4, p.399-405, 2005.
- ANGEL, P. et al. Cell 49, 729-739 (1987) *apud* FISHER, G.J.; DATTA, S.C.; TALWAR, H.; WANG, Z-Q, VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Molecular basis of Sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v.379, p.335-339, 1996.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 05 dezembro 2009.
- BACKVALL, H.; WASSABERG, C.; BERNE, B.; PONTEN, F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin *in vivo*. **Experimental Dermatology**, v.11, p.349-356, 2002.
- BALDOQUI, D.C. ; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M.; FURLAN, M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellatum* (Piperaceae), **Quim. Nova**. v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.
- BARROS, S.B.M., TEIXEIRA, D.S., AZNAR, A.E., MOREIRA JR., J.A., ISHII, I., FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. **Ciênc. Cult**, v. 48, p. 114-116, 1996.

- BARROS,S.; ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.H.; DA SILVA, V.V.; PEREIRA, S.M.M.; BARROS, S.B.M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Braz J of Pharm Sci.** v.41, n.1, p.53-61, 2005.
- BARROS, L.F.M.; BARROS, P.S.M.; ROPKE, C.D.; SILVA, V.V. ; SAWADA, T.C.H. ; BARROS, S.B.M.; BELFORT JR, R. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.40, p.1129-1132, 2007.
- BASTOS, W.L. Metabolismo secundário de *Pothomorphe umbellata*. São Paulo, 95p. (Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho), 1998.
- BENAUD, C., DICKSON, R.B.; THOMPSON, E.W. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.50, n.2, p.97-116, 1998.
- BERG, R.J.; VAN KRANEN, H.J.; REBEL, H.G.; DE VRIES,A.; VAN VLOTEN,W.A.; VAN KREIJIL,C.F.; VAN DER LEUN, J.C.; DE GRUIJIL,F.R. Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.274-278, 1996.
- BERGAMO, D.C.B. Avaliação Química dos componentes não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcatecol em *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae), 146p. (Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho), 2002.
- BERNARD, H.O.; THIELE, K. Isolierung von 1- allyl- 2,3 dimetox- 4,5-methylendioxybenzol aus *Heckeria umbellata* (L.) Kunth (Piperaceae) **Helv. Chim. Acta Basel**, v.61, n.6, p.2273-2274, 1978.
- BERTON, T.R.; PAVONE, A.; FISCHER, S.M. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis *in vivo*.**The J. of Inv. Dermatol.**, v.117(5), p.1172-1178, 2001.
- BHATTACHRYYA, B.; JOHRI, B.M. Flowering plants. Taxonomy and phylogeny. Berlin: Spronger Verlag. 1998. P.175-177.

- BIOKA, D.; ABENA, A. Psychopharmacologic profile of an aqueous extract of *Piper umbellatum*. **Encephale**. v.16, n.3, p.205-208, 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.
- BOURBOULIA, D., STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin. Cancer Biol.**, v.20 (3), p.161-168, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v.28,n.1, p.25-30, 1995.
- BRUMMER, O., BOHMER, G., HOLLWITZ, B., FLEMMING, P., PETRY, K.U., KUHNLE, H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. **Gynecol. Oncol.**, v.84, n.2, p.222-7, 2002.
- BUTT, M.S., SULTAN M.T. Green tea: nature's defense against malignancies. **Crit Rev. Food Sci. Nutr.**, v.49,n.5, p.463-73, 2009.
- CAPOBIANCO, J.P.R., ed. Dossiê Mata Atlântica. Projeto monitoramento participativo da mata Atlântica. Instituto Socioambiental; Rede de ONGs Mata Atlântica, Sociedade Nordestina de Ecologia. São Paulo: Ipsis Gráfica, 2001.p.11-26.
- CECHINEL FILHO,V., YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- CHANDRA, S., GONZALEZ de MEJIA, E. Polyphenolic Compounds, antioxidant capacity, and Quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.3583-3589, 2004.
- CHANG, C., WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v.11, n.11, p.S37-S43, 2001.

- Da SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; ALMEIDA, R.L. ; MIRANDA, D.V.; KERA, C.Z.; RIVELLI, D.P.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. **Int. J. Pharm.**, v.303, n.1-2, p.125-131, 2005.
- Da SIVA, V.V. Emprego do extrato de raiz de *Pothomorphe umbellata* na prevenção das alterações precoces da fotocarcinogênese induzidas pela radiação ultravioleta B na pele de camundongos sem pêlo. São Paulo, 107p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), 2007.
- Da SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; RIVELLI, D.P.; BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, p.1–7, 2009.
- DERYUGINA, E.I.; QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v.25 p.9-34, 2006.
- DESMARCHELIER, C. ; BARROS, S. ; REPETTO, M. ; LATORRE, L.R. ; KATO, M. ; COUSSIO, J. ;CICCIA, G. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. Scavengers peroxy radicals and inhibits Fe (II)- dependent DNA damage. **Planta Med.** v.63, n.6, p.561-563, 1997.
- DESMARCHELIER, C. Neotropics and Natural Ingredients for Pharmaceuticals: Why isn't South American Biodiversity on the Crest of the Wave?. **Phytoterapy Research** (review), 2010.
- DHANALAKSHMI, S.; MALLIKARJUNA, G.U.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Silibin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via a decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. **Carcinogenesis**, v.25 (8), p.1459-1465, 2004.
- DI STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; HIRUMA, C.A.; SANTOS, C.M. Plantas medicinais na Amazônia, 1ª edição, Fundação Editora Unesp, São Paulo, 1989.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H. REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p.69-91, 2002.
- DING, H.; TAUZIN, S.; HOESSLI, D.C. Phytochemicals as modulators of neoplastic phenotypes. **Pathobiology**, v.76, p.55-63, 2009.

- DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versatility of Effects and Mechanisms. **Planta Medica** (Review), v.74, p.1548-1559, 2008.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature: reviews**, v.2, p.161-174, 2002.
- FELZENSZWALB, I.; VALSA, J.O.; ARAUJO, A.C.; ALCANTARA-GOMES, R. Absence of mutagenicity of *Potomorphe umbellata* and *Potomorphe peltata* in the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity assay. **Braz J Med Biol Res.**, v.20, n.3-4, p.403-405, 1987.
- FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; ADAMI, Y.L.; ESPINOLA-MENDES, E.C.; FIGUEIREDO, M.R.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. The intraperitoneal plasmodium berghei-Pasteur infection of Swiss mice is not a System that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Exp. Parasitol**, v.94, n.4, p.243-247, 2000.
- F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.19, n.2, p.56-72, 2003.
- FINGER, E.C.; GIACCIA, A.J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. **Cancer Metastasis Rev**, 29, p.285–293, 2010.
- FISHER, G.J.; DATTA, S.C.; TALWAR, H.; WANG, Z-Q, VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Molecular basis of Sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v.379, p.335-339, 1996.
- FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J.; Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch Dermatol**. v.138, p.1462-70, 2002.
- FOLGUERAS, A.R.; PENDÁS, A.M.; SÁNCHEZ, L.M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases in câncer: from new functions to improved inhibition strategies. **Int. J. Dev. Biol.**, v.48, p.411-424, 2004.
- FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem. Photobiol.** v.54, n.5, p.659, 1991.

- FORTINO, V.; MAIOLI, E.; TORRICELLI, C.; DAVIS, P.; VALACCHI, G. Cutaneous MMPs are differently modulated by environmental stressors in old and young mice. **Toxicology Letters**, v.173, p.73-79, 2007.
- FREITAS, P.C.D. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família *Piperaceae*: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. São Paulo, 115p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), 1999.
- 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. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radic Biol Med.**, v. 25(7), p.848-73, 1998.
- GILCHREST B.A.; PARK, H.Y.; ELLER, M.S.; YAAR, M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. **Photochem. Photobiol.**, v.63, n.1, p.1-10, 1996.
- GONZALEZ, H. Percutaneous absorption with emphasis on sunscreens. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.9, p. 482-488, 2010.
- GRIMM, T.; SCHAFER, A.; HOGGER, P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol). **Free Radical Biology & Medicine**, v.36, n.6, p.811–822, 2004.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Reviews Nutrition**. v.16, p.33-50, 1996.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v.142, n.2, p.231-55, 2004.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, p.1147-1150, 2007.
- HAMBURGER M., HOSTETTMANN, K. Analytical aspects of drugs of natural origin. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v.7, n.2, p.1337-1349, 1989.

- HAMMER, M.L.A.; JOHNS E.A. Tapping an Amazonian plethora: Four medicinal plants of Marajo Island Para (Brazil). **J. Ethnopharmacol.** v.40, p.53-75, 1993.
- HO, C-T.; WANG, M.; WEI, G-J.; HUANG, T-C.; HUANG, M-T. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. **Biofactors**, v.13, p.161–166, 2000.
- IDSON, B. Vehicle effects im percutaneous absorption. **Drug Metab. Rev.**, v.14, p.207-222, 1983.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=21 Acesso em: 26 abril 2010.
- INOMATA, S., MATSUNAGA, Y., AMANO, S., TAKADA, K., KOBAYASHI, K., TSUNENAGA, M., NISHIYAMA, T., KOHNO, Y., FUKUDA, M. Possible involvment of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **J. Invest. Dermatol.**, v.120, p. 1-7, 2003.
- INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em: <http://www.inpe.br/> Acesso em: 26 abril 2010.
- ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v.122, n.4, p.291-294, 2002.
- ITOH, Y.; & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, v.38, p.21-36, 2002.
- JACKSON, B.C.; NEBERT, D.W.; VASILIOU, V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. **Human Genomics**, v.4, n.3, p.194–201, 2010.
- JACOBSEN, J.A.; MAJOR JOURDEN, J.L.; MILLER, M.T.; COHEN, S.M. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition- Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1803, p.72–94, 2010.
- JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.8, n.4, p.706-716, 2001.

- JAYAPRAKASHA G.K., GIRENNAVAR, B.; PATIL, B.S. Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. **Bioresource Technology**, v.99, p.4484–4494, 2008.
- KATO, M.J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure Appl. Chem.**, v.79, n.4, p.529–538, 2007.
- KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp. Dermatol.**, v.12, n.2, p.109-25, 2003.
- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v.141, p.52-63, 2010.
- KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O.R., GOTTLIEB, H.E. 4-Nerolidylcatechol from *Potomorphe umbellata*. *Planta Medica*, v.39, n.1, p.85-87, 1980.
- KITAZAWA, M.; PODDA, M.; THIELE, J.; TRABERL, M.G.; IWASAKI, K.; SAKAMOTO, K.; PACKERT, L. Interactions between Vitamin E Homologues and Ascorbate Free Radicals in Murine Skin Homogenates Irradiated with Ultraviolet Light. **Photochemistry and Photobiology**. v.65, n.2, p.355-365, 1997.
- KOSALEC, I., PEPELJNJAK, S., BAKMAZ, M., VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharm.**, v.55, p.423-430, 2005.
- KOSAR, M., GÖGER, P.; HÜSNÜ CAN BASER, K. In Vitro Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2369–2374, 2008.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.52(6), p.937-957, 2005.
- KULMS, D.; SCHWARZ, T. Molecular mechanisms of UV – induced apoptosis. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.16, p.195-201, 2000.
- KURIBAYASHI, K.; EL-DEIRY, W.S. Regulation of programmed cell death by p53 pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.615, p.201-221, 2008.
- LAETHEM, A.; CLAERHOUT, S.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **The International J. of Chemistry & Cell Biology**, v.37, p.1547-1553, 2005.

- LE COINTE, P. A Amazônia Brasileira –III: Árvores e Plantas úteis, 1a Edição. Belém: Livraria Clássica, p.69-70, 1934.
- LOPEZ-TORRES, M.; THIELE, J.J.; SHINDO, Y.; HAN, D.; α -tocoferol 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.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Polyphenolics of *SaVia* - a review. *Phytochemistry*, v.59, p. 117–140, 2002.
- LUZ, A.I.R.; DA SILVA, J.D.; ZOGHBI, M.Q.B., ANDRADE, E.H.A.; DA SILVA, M.H.L; MAIA, J.G.S. Volatile constituents of Brazilian Piperaceae, parte 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata* . **J. Essent Oil Res.** v.11, n.4, p.479-481, 1999.
- M A , W.; WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; SCHNEIDER, L.A.; NADERI, L.; RAZI-WOLF,Z. ; SCHÜLLER, J. ; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 26, n.7, p.592-599, 2001.
- MAcVEAN, M.; LIEBLER, D.C. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. **Molecular Carcinogenesis**, v.24,p. 169-176, 1999.
- MARKHAM, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press.
- MARSTON A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, v.68, p.2785-2797, 2007.
- MARSTON A., HOSTETTMANN, K. Natural products analysis over the last decades. **Planta Med**, v.75, p.672-682, 2009.
- MARTIN, A; BUSTAMANTE, P. Physical Pharmacy – Physical chemical Principles in the Pharmaceutical Science, 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. P.324-361.

- MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CANIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; ADZET, T. Essential oils from four Piper species. **Phytochemistry**, v.49, n.7, 2019-2023, 1998.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. **Expert Rev Mol Med.**, v.2, p.1-22, 2002.
- MATTANA, R.S. Produção de biomassa foliar, óleo essencial e 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., 138p. (Tese de Doutorado -Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho), 2009.
- McVEAN, M.; LIEBLER, D.C. Prevention of DNA Photodamage by Vitamin E Compounds and Sunscreens: Roles of Ultraviolet Absorbance and Cellular Uptake. *Molecular Carcinogenesis*, v.24, p.169–176, 1999.
- MESQUITA, J.M.O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A., OLIVEIRA, A.B. Comparative study of the essential oils of some species of Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.6-12, 2005.
- MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. **Planta Medica**, v.65, n.4, p.376-378, 1999a.
- MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C., COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant compound 4-nerolidylcatechol inhibits in vitro KB cells growth and topoisomerase I activity. Special Publication - Royal Society of Chemistry (*Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*), v.40, p.404-406, 1999b.
- MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent. **Phytotherapy Res.**, v.16, n.2, p.S71-S72, 2002.
- MONGONE, F.R.R.; FEDERICO, M.H.H. Capítulo 8: Ciclo celular. In: BRENTANI, M.M. (Org.). Bases da Oncologia. São Paulo: Marina e TEcméd Editora, 2003. p.137-145.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol.**, v.84, n.3, p.263-269, 2009.

- MOORE, J.O.; WANG, Y.; STEBBINS, W.G.; GAO, D.; ZHOU, X.; PHELPS, R.; LEBWOHL, M.; WEI, H. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.27(8), p.1627-1635, 2006.
- MORAES, M.S. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. São Paulo, 112p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), 1983.
- MORAES, M.S.; AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Chromatographic characterization of crude drug and fluid extract of *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. An. Farm.Quím, v.24, p.1-9, 1984.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v.69, p.562-73, 2006.
- NAGY, M., GRANCAI, D., Colorimetric determination of flavanones in propolis. **Pharmazie**, v.51, p.100–101, 1996.
- NORIEGA-SALAZAR, P., ROPKE, C.D., CAMILO, C.M., FREITAS, P.C.D., BARROS, S.B.M. Avaliação por análise factorial das condições de extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, n. 2, p.261-269, 2005.
- NUNEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R., PONCE-SOTO, A.L. ; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v.66, n.9, p.1017-1125, 2005.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PROOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

- OUHTIT, A.; MULLER, H.K.; DAVIS, D.W., ULLRICH, S.E., McKONKEY, D.; ANANTHASWAMY, H.N. Temporal events in skin injury and the early adaptative responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **Am. J. of Phathology**,v.156, p.201-207, 2000.
- PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. Ibrasa, São Paulo, 1998, p. 159 - 160.
- PECKOLT, T.; PECKOLT, G. História das plantas medicinais e úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Typ. Laemmert, v.6, p.1888-1914, 1896.
- PECKOLT, V. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. **Mem. Inst. Butantan**, v.15, p.1-13, 1941.
- PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; LOPES, W. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *J Ethnopharmacol.*, v.99, p.215-220, 2005.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry** (Review), v.68, p.2960-2972, 2007.
- PINO, J.A; MARBOT, R.; FUENTES, V.; PAYO, A.; D.CHAO, HERRERA, P. Aromatic plants from western Cuba. II. Composition of leaf oil of *Potomorphe umbellata* (L.) Miq. and *Agerantina havanensis* (H.B.K.) R. M. Kinget. **J. Essent. Oil Res.**,v.17,n.5,p. 572-574, 2005.
- PIROT, F., MILLET, J.; KALIA, Y.N.; HUMBERT, P. *In vitro* study of percutaneous absorption, cutaneous bioavailability and bioequivalence of zinc and cooper from five topical formulations. **Skin Pharmacol.**, v.9, p.259-269, 1996.
- PINTO, A.C.S.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C; MORAES, M.O.M.; MORAES, M.E.; CAVALCANTI, B.C.; NUNOMURA, S. N.; POHLIT, A.M. In vitro cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. **Rev. Bras. Pl. Med.**, p.205-211, 2006.
- PLACZEK, M.; GAUBE, S.; KERKMANN, U.; GILBERTZ, K.P.; HERZINGER, T.; HAEN, E.; PRZYBILLA, B. Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D-alpha-tocopherol. **J. Invest. Dermatol.**, v.124, n.2, p.304-7, 2005.

- POPOVA, M., BANKOVA, V., BUTOVSKA, D., PETKOV, V., NIKOLOVA-DAMYANOVA, B., SABATINI, A.G., MARCAZZAN, G.L., BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochem. Anal.**, v.15, p.235-240, 2004.
- PRASCH, T.H.; SCHLOTSMANN, K.; SCHIMIDT-FONK, K.; FORSTER, T.H. The influence of cosmetic products on the stratum corneum by infrared and raman spectroscopy. **IFSCC Mag.**, v.4, p.201-206, 2001.
- PRASAD, K.N.; HAO, J.; YI, C.; ZHANG, D.; QIU, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; CHEN, F. Antioxidant and Anticancer Activities of Wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) Peel. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, P.1-6, 2009.
- PRIOR R.L., CAO G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal AOAC Int.*, v. 83(4)p.950-956, 2000.
- PRIOR, R.L., HOANG, H., GU, L., WU, X., BACCHIOCCA, M., HOWARD, L., HAMPSCH-WOODILL, M., HUANG, D., OU, B., JACOB, R., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p.3273-3279, 2003.
- QIAN, H., NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **J. Zhejiang Univ. SCI**, v.5(6),p. 676-683, 2004.
- QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J.J.; FISHER, G.J. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.14, p.20–24, 2009.
- REZENDE, K.R. Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Administrado a ratos Sprague Dawley. São Paulo, 74p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo), 2002.
- RICE-EVANS C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Strucuture-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v.20, p.933-956, 1996.
- RIEDEL, O.O. Subsídios para estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) – Kunth. **Trib. Farm**, v.9, n.12, p.263-269, 1941.

- RIJKEN, F.; KIEKENS, R.C.M.; BRUIJNZEEL, P.L.B. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. **British Journal of Dermatology**, v.152, p.321–328, 2005.
- RITTIÉ, L.; FISHER, G.F. UV-light-induced signal-cascades and skin aging. **Aging Research Reviews**, v.1, p.705-720, 2002.
- ROERSCH, C.M.F.B. *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. **J. of Ethnopharmacology**, v.131, p.522-537, 2010.
- ROPKE, D.C.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H.; BERNUSSO, L.C.; DA SILVA, V.V.; BARROS, S.B.M. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. na pele. Annals of the 14th National Cosmetology Congress of the Brazilian Cosmetology Association, p.483-500, 2000.
- ROPKE, C.D., KANEKO, T.M., RODRIGUES, R.M., SILVA, V.V., BARROS, S., SAWADA, T.C.H., KATO, M.J., BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidilcatecol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 107-114, 2002.
- ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.R.; DA SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-radiation. **Photochem. Photobiol.**, v.78, n.5, p.436-439, 2003.
- ROPKE, C.D., OSTROSKY, E.A., KANEKO, T.M. CAMILO, C.M., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.2, p. 209-217, 2003b.
- ROPKE, C.D.; SAWADA, T.H.C.; DA SILVA, V.V.; MICHALANY, N.S.; BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.30, n.3, p.272-276, 2005.
- ROPKE, C.D., SILVA, V.V., KERA, C.K., MIRANDA, D.V., ALMEIDA, R.L., SAWADA, T.C.H., BARROS, S.B.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p. 439-442, 2006.

- SACOMAN, J.L.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, JG.M.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Braz J Med Biol Res**, v.41, n.5, p.411-415, 2008.
- 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 photopreventive agents. *Int. J. Pharm.*, v.199, p.39-47, 2000.
- SANDER, C.S.; CHANG, H.; SALZMANN, S.; MULLER, C.S.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. **J Invest Dermatol.** v.118, p.618-625, 2002.
- SANDER, C.S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **Int. J. Dermatol.**, v.43, p.326-35, 2004.
- SARTOR, L.; PEZZATO, E.; DELL'AICA, I.; CANIATO, R.; BIGGIN, S.; GARBISA, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.229-237, 2002.
- SATO, H. & SEIKI, M. *Oncogene* 8, 395-405 (1993) *apud* FISHER, G.J.; DATTA, S.C.; TALWAR, H.; WANG, Z-Q; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Molecular basis of Sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v.379, p.335-339, 1996.
- SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; WLASCHEK, M.; BRENNEISEN, P.; SCHAUEN, M.; BLAUDSCHUN, R.; WENK, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biol. Chemistry**, Berlin, v.378, p.1247-1257, 1997.

- SEITÉ, S.; COLIGE, A.; DEROANNE, C.; LAMBERT, C.; PIQUEMAL-VIVENOT, P.; MONTASTIER, C.; FOURTANIER, A.; LAPIÈRE, C.; NUSGENS, B. Changes in matrix gene and protein expressions after single or repeated exposure to one minimal erythral dose of solar-simulated radiation in human skin in vivo. **Photochem. Photobiol.**, v.79 (3), p.265-271, 2004.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.102, n.4, p.470-75, 1994.
- SIES, H. **Oxidative stress**. New York: Academic Press, p.507, 1985.
- SIES H. Role of reactive oxygen species in biological processes. **Klin Wochenschr.** v.69, n.21-23, p.965-8, 1991.
- SILVA, G.A.A.B.; BAUER, L. Contribuição à química do óleo essencial de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. Rev. Bras. Farm, v.53, p.59-61, 1972.
- SILVA, R.A.D. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1st edn). São Paulo: Nacional, 1926, p. 649.
- SNOEK-VAN-BEURDEN, P.A.M.; VON-DEN-HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques:Review**, v.38, p.73-83, 2005.
- SPONCHIADO JR, E.C. Atividade antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata*. Manaus, 133p. (Tese de Doutorado - Universidade Federal do Amazonas), 2006.
- STANTON, H.; GAVRILOVIC, J.; ATKINSON, S.J.; D'ORTHO, M-P.; YAMADA, K.M.; ZARDI, L.; MURPHY, G. The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. **Journal of Cell Science**, v.111, p.2789-2798, 1998.
- STEFFENSEN, B. Proteolytic events of wound-healing coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. **Crit. Rev. Oral Biol. Med**, v.12, n.5, p.373-98, 2001.
- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p. 463-516, 2001.

- STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA, KLEINER DE JR. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **FASEB J.**, v.15, p.1434-41, 1993.
- TABOPDA, T.K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.C.; TANOLI, S.A.K., KHAN, S.N., ALI, M.S., NGADJUI, B.T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*, v.69, p.1726-1731, 2008.
- TEDESCO, A.C.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Braz J Med Biol Res.** , v.30 (5):561-75, 1997.
- THANGAPAZHAM R.L., SINGH A.K., SHARMA A., WARREN J., GADDIPATI J.P., MAHESHWARI R.K. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 245,p.232–241, 2007.
- THIELE, J.J.; TRABER, M.G.; TSANG, K.G. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and incudes lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.23, p. 385 -391, 1997.
- THOMAS, M.J. The Role of Free Radicals and Antioxidants. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.716-718, 2000.
- TROPICOS - <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: 20 de setembro 2010.
- TSAO, R., DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v.812, p. 85-99, 2004.
- VAYALIL, P.K.; MITTAL, A.; HARA, Y.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **J. of Investigative Dermatology**, v.122, p.1480-1487, 2004.
- VERSCHOOTEN, L.; CLAERHOUT, S.; VAN-LAETHEM, A.; AGOSTINIS, P.; GARMYN, M. New Strategies of Photoprotection. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.1016–1023, 2006.
- VINK, A.A.; ROZA, L. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimmers. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.65, p.101-104, 2001.

- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, p.827-839, 2003.
- WARBRICK, E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioassays*, v.22, p.997-1006, 2000.
- WARNER, R.L.; BHAGAVATHULA, N.; NERUSU, K.C.; LATEEF, H.; YOUNKIN, E.; JOHNSON, K.J.; VARANI, J. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 76, p.189–195, 2004.
- WHO - World Health Organization. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> . Acesso em: 26 abril 2010.
- WHO – World Health Organization. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs305/en/index.html> . Acesso em: 26 abril 2010.
- WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.WHO-Europe> - Global change and health – Stratospheric ozone depletion.mht Acesso em 26 abril 2010.
- WOLFENDER JL. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Med.**, v.75, p.719-734, 2009.
- YAMAMOTO, M.; GILCHRIST, B.A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**, v.157, p.874–887, 2007.
- XIONG, Y.; HANNON, G.J.; ZHANG, H.; CASSO, D.; KOBAYASHI, R.; BEACH, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, v.366, p.701-704, 1993.
- YUNKER, T.G. The *Piperaceae* of Brazil Brazil I. *Piper* – Group V, *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Sarcorhachis*. *Hoehnea*, v.3, p.29-284, 1973.
- YUSSUF, N.; IRBY, C.; KATIYAR, S.K., ELMETS, C.A. Photoprotective effects of green tea polyphenols. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.23, p.48-56, 2007.

8. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 36/2006

São Paulo, 12 de junho de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 12 de junho do corrente, **APROVOU** o projeto "Pesquisa sistemática de plantas medicinais: Potencial farmacoterapêutico de *Pothomorphe umbellata*" (Protocolo CEEA nº 105), apresentado por Vossa Senhoria.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Vice-Presidente da CEEA

Pot-pourri: “Entrei de gaiato no navio... entrei, entrei, entrei por engano.... shake, shake, shake.....eu só quero saber do que pode dar certo,
(Paralamas do sucesso) (K.C. And The Sunshine Band) (Paralamas do sucesso)
 não tenho tempo a perder! Encosta tua cabecinha no meu ombro e chora.....mas tenha fé em Deus, tenha fé na vida. Tente outra vez!!! ”
(Sergio Reis) (Raul Seixas)