

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Avaliação in vitro e in vivo do potencial fotoprotetor e
fotoquimioprotetor da fração purificada de Inga edulis (Ingá)***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Karini Carvalho Costa

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/05/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

RESUMO

COSTA, K.C. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá).** 2015. 102. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A exposição à radiação ultravioleta (UV) pode provocar um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante da pele, prejudicando sua integridade e causando diversas alterações moleculares que conduzem ao fotoenvelhecimento e ao câncer de pele. Considerando a estreita relação entre o estresse oxidativo e os efeitos danosos causados por esta radiação na pele, aliado ao fato de que estudos demonstram que o uso de protetores solares não é completamente efetivo na prevenção destes danos, a fotoquimioproteção, que consiste no uso de substâncias naturais com diversas propriedades biológicas em formulações tópicas, aparece como uma importante alternativa nas terapias de fotoproteção. A administração tópica de substâncias naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias poderia prevenir ou reverter as alterações moleculares desencadeadas pela radiação UV, bem como os danos clínicos resultantes das mesmas. Diante disto, a fração purificada de *Inga edulis* foi avaliada *in vitro* quanto ao seu potencial antioxidante e fotoprotetor, e ainda, incorporada a uma formulação tópica para a liberação cutânea de seus compostos, foi avaliada *in vivo* quanto ao seu potencial fotoquimioprotetor. Os resultados obtidos demonstraram uma elevada capacidade antioxidante e um efeito fotoprotetor da fração purificada *in vitro* e a hidrossolubilidade de seus compostos antioxidantes. A formulação permitiu a penetração dos compostos da fração purificada na pele dos animais, proporcionando um aumento da atividade antioxidante e anti-inflamatória da pele, diminuindo a atividade da enzima mieloperoxidase e os níveis da citocina TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e da quimiocina derivada de queratinócitos, KC/CXCL1, após radiação UVB, porém não impediu a depleção da glutathione redutase, o aumento da atividade da metaloproteinase 9, e o aumento dos níveis da interleucina-1 β . A formulação adicionada da fração purificada não foi capaz de absorver a radiação UVB.

Palavras-chave: Radiação Ultravioleta, Atividade Antioxidante, Atividade Anti-inflamatória, Fotoquimioproteção, *Inga edulis*.

1. Introdução

1.1. Radiação solar e danos causados à pele

Considerado o maior órgão do corpo humano, a pele é uma barreira entre o meio interno e o meio externo, que protege o organismo contra agentes agressores físico-químicos e microbiológicos do meio ambiente (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). É constituída por três camadas de tecido: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por um conjunto de células vivas e um conjunto de células mortas, que originam respectivamente a epiderme viável e o estrato córneo. A epiderme viável, por sua vez, é composta de células metabolicamente ativas, tais como, queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. A derme, localizada abaixo da epiderme, é uma camada mais flexível e resistente, constituída de fibras de colágeno, elastina e fibroblastos e, ao contrário da epiderme, é vascularizada. E, por último, a hipoderme, é formada por tecido adiposo, cuja principal função é armazenar energia (CHU, 2012).

Por ser uma barreira protetora de longa extensão, a pele está diretamente exposta aos efeitos deletérios da radiação solar que é composta de um espectro contínuo de radiações eletromagnéticas com comprimentos de ondas ultravioletas (UV), visível e infravermelho. A radiação UV pode ser dividida em 3 faixas de acordo com suas características de propagação e efeito biológico: UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC é um potente agente mutagênico, mas que praticamente não atinge a superfície terrestre, pois é absorvida pela camada de ozônio. Por outro lado, a radiação UVB (5%) e especialmente a UVA (95%) são capazes de atingir a terra causando danos na pele (Figura 1). A UVB, por ser altamente energética, é capaz de penetrar na epiderme provocando danos diretos ao DNA, inflamação (eritema ou queimadura solar), imunossupressão, melanogênese, fotoenvelhecimento e câncer de pele, além de danos indiretos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A radiação UVA, menos energética que a UVB, penetra mais na pele atingindo a derme, causando indiretamente danos biológicos, através das EROs que são geradas por fotossensibilização endógena. Estas EROs, por sua vez, afetam biomoléculas tais como, lipídios, proteínas e DNA, ocasionando principalmente fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (AFAQ; MUKHTAR, 2001; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; AFAQ, 2011; FIGUEIREDO et al., 2014).

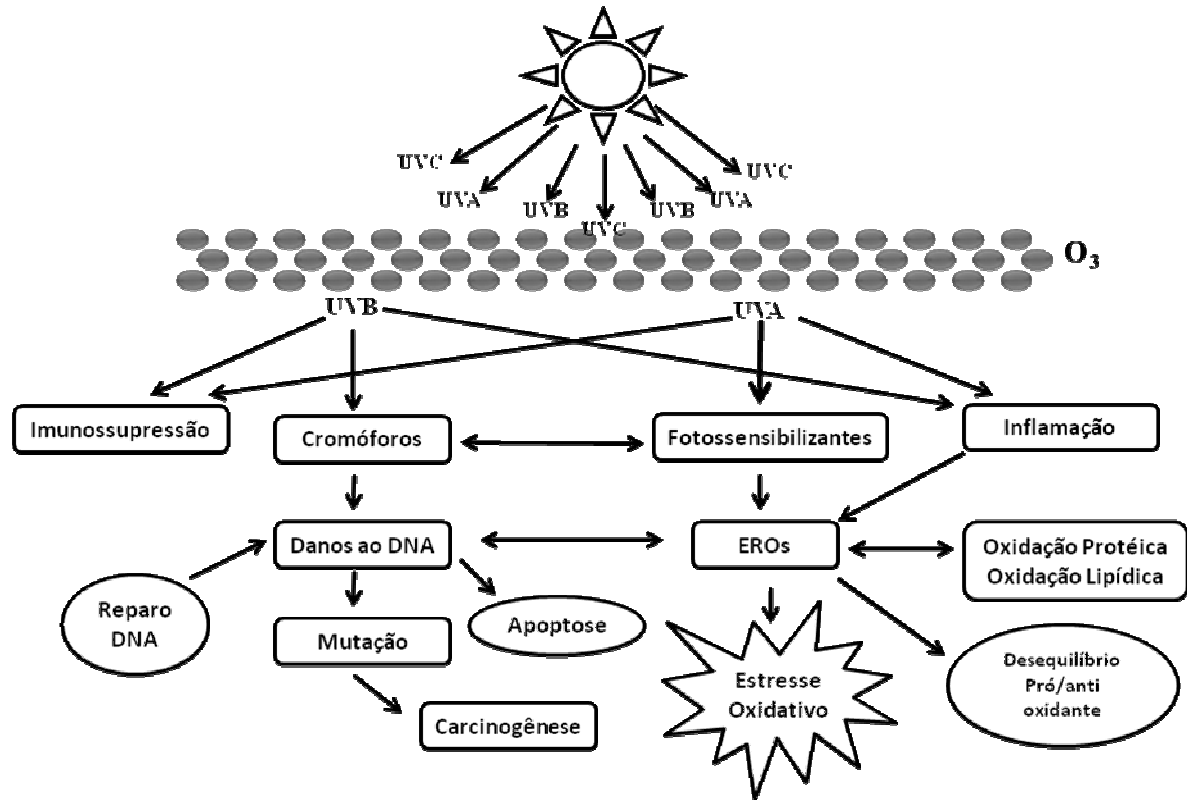


Figura 1: Efeitos da radiação UV nas biomoléculas celulares da pele. Modificada de Svobodova, Walterova e Vostalova (2006).

Neste contexto, a radiação UVB, ao entrar em contato com a pele (Figura 1), pode ser absorvida diretamente por cromóforos celulares, como as bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico (DNA), porfirinas, riboflavinas, aminoácidos e seus derivados, como o ácido trans-urônico e melanina. Quando absorvida, esta radiação desencadeia reações fotoquímicas que causam danos direto ao DNA, induzindo principalmente a formação de dímeros do tipo ciclobutano pirimidina (CPDs) e dos fotoprodutos (6,4) pirimidina-pirimidona (Figura 2). Alguns dímeros CPDs, como timina-citosina e citosina-citosina, são responsáveis por desencadear mutações no gene p53, que é fundamental para o reparo do DNA, uma vez que este é importante na interrupção do crescimento celular e no processo de apoptose. Logo, quando ocorrem mutações neste gene, as células perdem a sua capacidade de se conduzir ao processo de apoptose e, como consequência, desencadeiam a fotocarcinogênese (HECK et al., 2004; CADET; SAGE; DOUKI, 2005; MONTAGNER; COSTA, 2009; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; TAKAHASHI et al., 2011; BOLFA et al., 2013; GODIC et al., 2014).

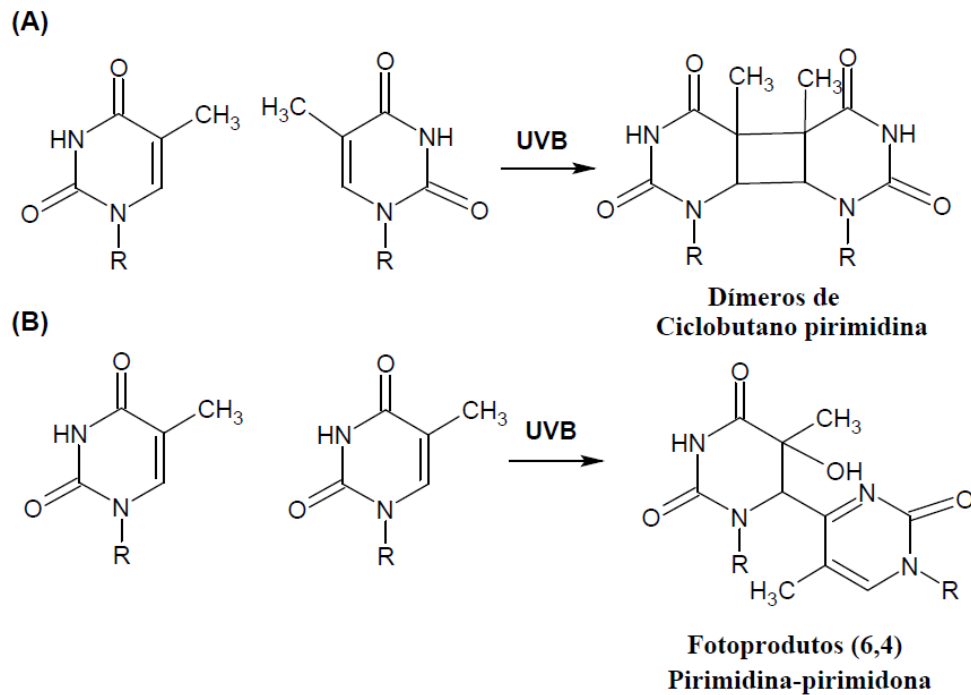


Figura 2: Principais lesões no DNA induzidas pela absorção da radiação UVB: dímeros de ciclobutano pirimidina (A) e fotoprodutos (6,4) pirimidina-pirimidona (B). Retirada de Svobodova, Walterova e Vostalova (2006).

Por outro lado, a radiação UVA (Figura 1) é absorvida por fotossensibilizantes endógenos que, quando excitados, podem tanto realizar a transferência de elétrons por meio de uma interação direta com outra biomolécula resultando, então, na formação de radicais livres, quanto transferir seus elétrons para moléculas de oxigênio, produzindo assim EROs. Dessa forma, os danos no DNA induzidos indiretamente por esta radiação incluem a formação de dímeros de pirimidina e de 8-hidroxi-7,8-diidroguanina e/ou 8-oxo-7,8-diidroguanina, que podem ser utilizados como marcador de exposição crônica à radiação UV. A maioria desses fotossensibilizantes endógenos ainda permanecem desconhecidos, mas alguns exemplos são a porfirina, a melanina e o ácido trans-urônico que são substâncias cromóforas (RAVANAT; DOUKI; CADET, 2001; WONDRAK; JACOBSON M.; JACOBSON E., 2005; PANDEL et al., 2013; YIN et al., 2013).

As EROs geradas pela radiação UV compreendem vários metabólitos ativos, incluindo radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical peroxil (ROO^\bullet), e os precursores desses metabólitos ativos, como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (AFAQ; MUKHTAR, 2001; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; KRYSTON et al., 2011).

Em condições normais, as EROs formadas continuamente pelas células, como consequência de reações bioquímicas oxidativas ou de fatores externos, são rapidamente removidas pelo sistema de defesa antioxidante da pele, o qual inclui enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase, e antioxidantes não enzimáticos como glutatona, α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno, os quais são suficientes nessas condições para manter a homeostasia do organismo. Entretanto, a capacidade destes antioxidantes é limitada após uma exposição excessiva da pele à radiação UV, uma vez que ocorre depleção destes antioxidantes e um aumento na quantidade de EROs formadas, ocasionando um desequilíbrio no sistema pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro, desencadeando, assim, um estresse oxidativo (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; KOHEN; GATI, 2000; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; GODIC et al., 2014).

A glutatona é um tripeptídeo endógeno constituído do ácido γ -glutâmico, cisteína e glicina, e é o mais prevalente tiol intracelular presente na maioria dos tecidos, incluindo a pele. Esse antioxidante não enzimático, quando em sua forma reduzida (GSH), é capaz de sequestrar diretamente radicais livres pela transferência de hidrogênio ao radical, através do grupo tiol (-SH) da cisteína, desempenhando um papel fundamental na defesa celular contra o dano oxidativo. Após a exposição da GSH ao agente oxidativo, esta é oxidada a GSSG com a participação da enzima glutatona peroxidase, e reciclado novamente a GSH pela enzima glutatona redutase, com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) atuando como doador de hidrogênio. A GSH também funciona como um doador de hidrogênio para vários outros antioxidantes endógenos, tais como o ácido ascórbico. Logo, a disponibilidade deste antioxidante é essencial para o sistema de fotoproteção cutânea. Contudo, sob condições de excesso de agentes oxidantes, ocorre um desequilíbrio entre o consumo de GSH e a redução da sua forma oxidada GSSG, contribuindo, assim, para o estresse oxidativo (AFAQ; MUKHTAR, 2001; CARINI et al., 2000).

Além dos danos causados no DNA, as EROs provocam oxidação protéica em aminoácidos como prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina, os quais levam à fragmentação da proteína quando oxidados. Como a maioria das proteínas não possui mecanismo de reparo, é necessário que ocorra uma nova síntese pelo organismo para substituir as que foram danificadas (BOVOK; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004). As EROs também alteram a função celular através da oxidação dos lipídeos das membranas biológicas, visto que estes são as biomoléculas mais susceptíveis ao ataque dessas espécies reativas, pois são altamente insaturados e banhados por fluídos ricos em oxigênio e metal

(INAL; KANBAK; SUNAL, 2001; BUEGE; AUST, 1978). Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana celular sofre uma desorganização com liberação de fosfolípidios que atuam sinergicamente, aumentando a atividade da fosfolipase A₂ e da ciclooxigenase 2 (COX-2), induzidas pela radiação UV, resultando na produção de leucotrienos, e prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂), que conduzirá à inflamação (HRUZA; PENTLAND, 1993; BAYIR, 2005).

O processo inflamatório inclui uma cascata de eventos que ocorrem em resposta ao dano tecidual, com o intuito de repará-los. Durante uma exposição contínua, a radiação UV é capaz de induzir à expressão da óxido nítrico sintase (NOS), enzima que produz o óxido nítrico (NO). O NO, juntamente com as PGE₂ (geradas após peroxidação lipídica) e outros mediadores liberados no local da inflamação, como as histaminas, vão ocasionar uma vasodilatação arteriolar com aumento do fluxo sanguíneo para subsequente migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) da circulação sanguínea para o tecido lesado. Além dessas substâncias quimiotáticas, citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e quimiocinas, geradas por melanócitos e queratinócitos da epiderme e por fibroblastos, mastócitos e outras células inflamatórias da derme, também são liberadas após a radiação UV. As células endoteliais, quando ativadas por estas citocinas, expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), enquanto que as quimiocinas induzem alterações que levam à liberação das integrinas. As selectinas medeiam a adesão fraca dos leucócitos, enquanto que as integrinas, a adesão forte, já as quimiocinas ativam e estimulam a migração transendotelial dos leucócitos para o local da inflamação. Esta migração dos leucócitos circulantes para o tecido é direcionada pela presença de um gradiente dessas substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. (FIGUEIREDO et al., 2014; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; CRUVINEL et al., 2010).

As quimiocinas constituem uma vasta família de citocinas de baixo peso molecular, responsáveis pela movimentação e recrutamento dos leucócitos para o local da inflamação. Para que isso ocorra, a ligação quimiocina-receptor inicia uma complexa cascata de sinalização que gera respostas quimiotáticas, liberação de EROs, degranulação e alteração na afinidade das integrinas na superfície celular. De acordo com o número e o espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, as quimiocinas são classificadas em quatro sub-famílias: CXC, CC, CX₃C e C (C significa cisteína e X representa aminoácido). A sub-família CXC, em especial, é caracterizada

principalmente pela ativação e recrutamento de neutrófilos para os tecidos durante o processo inflamatório. A quimiocina KC (CXCL1), por exemplo, derivada de queratinócitos e encontrada em camundongos (interleucina-8 (IL-8) correspondente em humanos), é a principal molécula quimioatraente de neutrófilos para o local da inflamação, sendo seu maior receptor o CXCR2 (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; VIEIRA et al., 2009; PHILLIPSON; KUBES, 2011; CRUVINEL et al., 2010; RAVIDRAN et al., 2013; MOURET et al., 2015).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) infiltrados, eosinófilos, basófilos e principalmente os neutrófilos, são constituídos por diferentes grânulos, os quais podem ser primários ou azurófilos, ricos em mieloperoxidase (MPO), β -glucuronidase, elastase, lisozima; secundários ou específicos, que apresentam componentes como lactoferrina e colagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13); e terciários com grânulos de gelatinase (MMP-2, MMP-9), leucolisina e catepsinas (MOLLINEDO, 2003; BORREGAARD; COWLAND, 1997; BEURDEN; HOFF, 2005; KUMAR; SHARMA, 2010).

A MPO, enzima da superfamília da heme peroxidase armazenada nos grânulos azurófilos, é a mais abundante dos neutrófilos, representando cerca de 5% de sua massa seca. Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de um haleto (cloreto, brometo, tiocianato), a MPO catalisa a formação de poderosos intermediários reativos, tais como: ácido hipocloroso, ácido bromoso, ácido hipotiocianos, radical tirosil e espécies reativas de nitrogênio, que causam lesões teciduais no local da inflamação. Desde que Bradley e colaboradores (1982) utilizaram esta enzima para avaliar a inflamação cutânea e quantificar a MPO epidermal, ela vem sendo considerada um biomarcador útil para medir e quantificar o influxo de PMNs na pele após exposição a agentes agressivos como, por exemplo, a radiação UV, ou em algum outro tecido que apresente um processo patológico acompanhado de inflamação (CROSS et al., 2003; JAIN et al., 2014; ODOBASIC et al., 2013; PULLI et al., 2013).

Paralelamente a esses eventos, a IL-1 e o TNF- α liberados no local da inflamação vão atuar em vias como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Figura 3) (SHAH; MAHAJAN, 2013; KWON; JUNG; YANG, 2013).

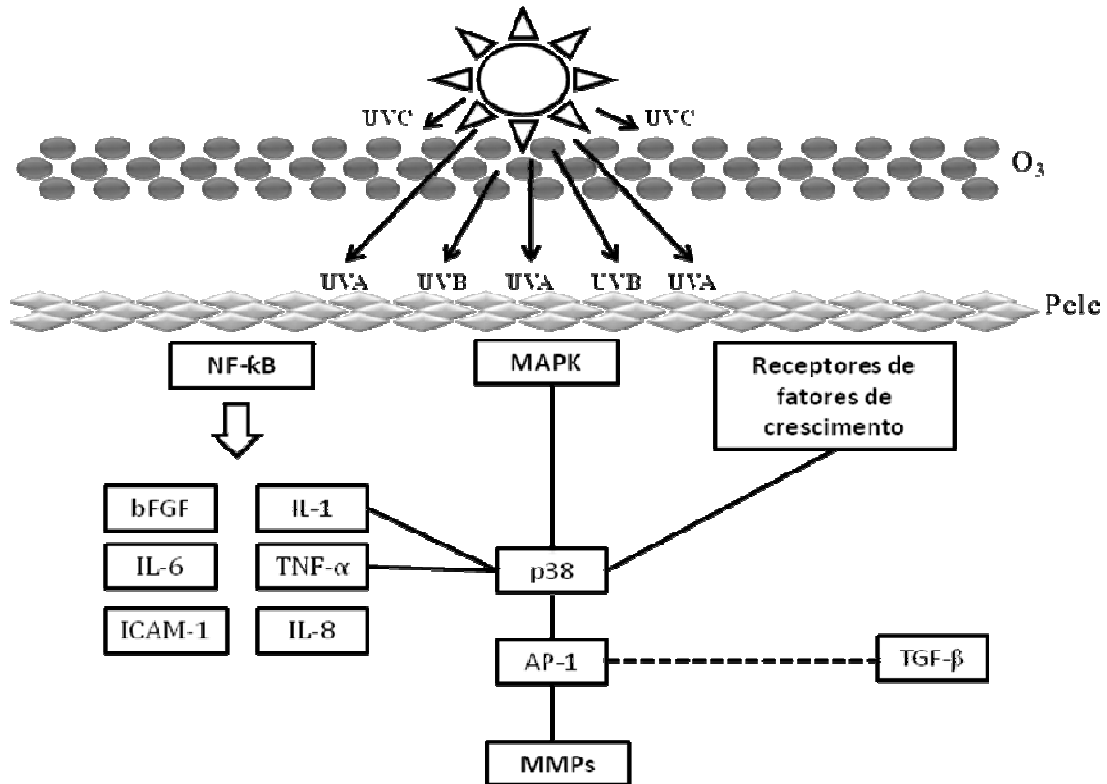


Figura 3: Vias de sinalização induzidas pela radiação UV. Ativação do NF-κB e MAPK, aumento nos níveis de diferentes receptores de fatores de crescimento com consequente aumento das MMPs, e regulação negativa do TGF-β, resultando na diminuição da síntese de colágeno. Modificada de Shah e Mahajan (2013).

O NF-κB é um complexo de proteínas capaz de regular a transcrição do DNA, que normalmente se encontra inativo no citoplasma por ligação com sua molécula inibidora (I-KB). Ao serem liberados, a IL-1 e o TNF-α causam a degradação da I-KB, deixando o NF-κB em sua forma livre. Uma vez em sua forma livre, o NF-κB regula a transcrição de genes envolvidos na produção de substâncias da resposta inflamatória, tais como, TNF-α, IL-1, interleucina-6 (IL-6), IL-8 e ICAM-1, além de regular a transcrição de genes que são responsáveis pela formação das metaloproteínas de matriz (MMPs), e de estimular o fator de crescimento de fibroblastos básicos da derme (bFGF) (BASU-MODAK; TYRRELL, 2001; SHAH; MAHAJAN, 2013).

Já a MAPK compreende um grande número de proteínas serina/treonina quinases que podem ser quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) ou então quinase p38, envolvidas na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse oxidativo e apoptose. A ativação destas quinases pode ocorrer em queratinócitos, em resposta ao dano oxidativo causado pela radiação UV e por citocinas inflamatórias (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). As

citocinas IL-1 e o TNF- α , por exemplo, após serem produzidas e de se ligar ao seu receptor, é capaz de desencadear uma série de sinais e ações que vão resultar na ativação da molécula p38 através de sua fosforilação. A p38, por sua vez, é capaz de aumentar a expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana, que após ser estabilizado por MAPK se dimeriza com c-Fos, expressando o ativador protéico 1 (AP-1), fator de transcrição altamente ativo que leva ao aumento da expressão das MMPs e à diminuição de pró-colágeno I (SHAH; MAHAJAN, 2013; RITTIÉ; FISHER, 2002).

A radiação UV também conduz a um aumento nos níveis de diferentes receptores de fatores de crescimento, tais como: epidérmico, de fibroblastos e derivado de plaquetas. Esses fatores, via ativação da p38 e aumento da expressão do AP-1, corroboram com a produção das MMPs. Por outro lado, o aumento da expressão do AP-1 ocasionado pela radiação UV, regula de forma negativa o fator de crescimento transformante β (TGF- β), interrompendo sua principal função que é a síntese de colágeno (SHAH; MAHAJAN, 2013).

As MMPs são enzimas de uma família de metaloenzimas de zinco, que clivam componentes protéicos da matriz extracelular, moléculas de superfície e outras proteínas pericelulares que não pertencem a matriz (EGEBLAD; WERB, 2002). Essas enzimas desempenham um papel chave no mecanismo patofisiológico do fotoenvelhecimento. O aumento da síntese das MMPs pela radiação solar ocorre em queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme. Pelo menos três MMPs são ativadas pela radiação UV: MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial) que pode degradar fibras de colágeno tipo I e III; MMP-3 (estromelina 1), hidrolisa colágeno tipo IV da membrana basal e colágeno parcialmente degradado; e MMP-9 (gelatinase B), que pode digerir fragmentos de colágeno gerados pela MMP-1. Juntas, as MMPs possuem a capacidade de degradar muitas das proteínas da matriz extracelular, resultando no acúmulo de fibras de colágeno fragmentadas, prejudicando, assim, a integridade estrutural da matriz extracelular, conduzindo, logo, ao fotoenvelhecimento (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; KROLIKIEWICZ-RENIMEL et al., 2013; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011; FENG et al., 2014).

1.2. Extratos vegetais como agentes fotoquimioprotetores

Pela complexidade e severidade dos danos induzidos pela radiação solar UV sobre a pele, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda limitar o tempo de exposição ao sol, fazer uso de roupas e acessórios, como chapéu e óculos de sol e, principalmente, utilizar protetores solares com capacidade de proteção tanto para radiação UVB quanto para UVA.

A fotoproteção consiste no uso de protetores solares (HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011) constituídos por uma mistura de filtros UV orgânicos e/ou inorgânicos que refletem, dispersam ou absorvem a radiação UV em função da sua natureza química (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007).

No entanto, apesar do crescente consumo de protetores solares, a incidência de câncer de pele só vem aumentando. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2014 e 2015 é de 182 mil novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma, e de aproximadamente 6 mil para o tipo melanoma, sendo que este apresenta uma letalidade elevada (BRASIL, 2014). O pronunciado aumento pode ser resultado de uma série de fatores, tais como: uso incorreto do protetor solar, aumento do tempo de exposição ao sol e da incidência de radiação UVB sobre a Terra, aliado ao pouco conhecimento que se tem atualmente de substâncias capazes de absorver a radiação UVA, o que poderia aumentar a eficácia dos fotoprotetores. Ainda, alguns estudos apontam para um efeito nocivo à pele, provocado pelos constituintes dos protetores solares, como aumento dos níveis de EROs, por exemplo, após penetração de filtros solares químicos (3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila) e subsequente radiação UV (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007; HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Também já foi demonstrado em trabalhos na literatura, que os filtros solares sofrem processos de degradação induzidos pela radiação UV, o que leva a uma redução na capacidade de proteção da pele e a geração de espécies potencialmente tóxicas (SCALIA; MEZZENA, 2010).

Desta forma, uma segunda estratégia nas terapias de fotoproteção, é a fotoquimioproteção que consiste no uso de formulações tópicas adicionadas de substâncias/compostos naturais com propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias na prevenção ou reversão de danos causados à pele pela radiação UV. Pois, uma vez incorporadas em formulações, essas substâncias poderiam agir de forma isolada, sendo aplicadas antes dos protetores solares e da exposição ao sol, ou então poderiam ser utilizadas em associação com outros ativos, como os filtros solares, potencializando o efeito fotoprotetor.

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, das quais os compostos fenólicos (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas) são a principal classe, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e lipoxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante desses compostos deve-se às suas propriedades redutoras e estrutura química, pois desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de

transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo visto que a estrutura química permite a doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila da sua estrutura aromática e, ainda, estabiliza elétrons desemparelhados, devido à ressonância do anel aromático (SOUSA et al., 2007). Pesquisas já realizadas demonstram que extratos vegetais ricos em polifenóis com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênica, anticarcinogênese e imunomodulatória têm a capacidade de exercer efeitos inibitórios marcantes em diversos eventos celulares e moleculares induzidos pela radiação solar UV (CASAGRANDE et al., 2006; AFAQ, 2011; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SERAFINI et al., 2014).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides destacam-se por apresentarem diversas atividades biológicas, as quais estão relacionadas principalmente com suas propriedades antioxidantes. Quimicamente são definidos como substâncias compostas por 15 átomos de carbono arranjados em dois anéis fenil (A e B) ligados por um anel pirano (C), formando o núcleo flavano (Figura 4). O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C definem as classes de flavonóides e, dentro destas, o padrão de substituição nos anéis A e B determinam os compostos específicos. As características estruturais dos flavonóides estão intimamente ligadas ao seu potencial antioxidante. Uma maior atividade sequestradora do radical superóxido, por exemplo, é associada à presença de um grupo hidroxila no carbono 3 e três grupos hidroxilas no anel B de sua molécula (COOK; SAMMAN, 1996; PIETTA, 2000; COS et al., 1998).

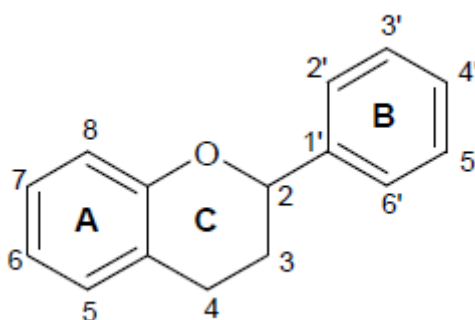


Figura 4: Estrutura química básica dos flavonóides (núcleo flavano).

Diante disso, a aplicação de formulações tópicas, adicionadas de produtos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, vem sendo cada vez mais reconhecida por sua capacidade de proteger a pele contra os danos da radiação UV, tais como o

fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (YIN et al., 2013; CAMPANINI et al., 2013; HWANG et., 2014).

1.2.1. *Inga edulis* (Ingá)

A diversidade biológica existente na Floresta Amazônica é uma grande fonte de espécies vegetais potencialmente úteis para o desenvolvimento de medicamentos, alimentos funcionais e cosméticos. Diversas espécies ricas em compostos fenólicos com diferentes atividades biológicas são utilizadas popularmente para o tratamento de diferentes doenças. Dentre essas plantas destaca-se o ingazeiro, *Inga edulis* Martius (POMPEU et al., 2012; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

Inga edulis Martius é uma árvore frutífera, da família das Leguminosae: Mimosoideae, amplamente distribuída em florestas secundárias tropicais das Américas Central e do Sul. Popularmente, além de ser reconhecida pelos seus frutos comestíveis, esta árvore, através de suas folhas, é utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório e anti-diarréico (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; POMPEU et al., 2012). Silva, Rogez e Larondelle (2007) relataram que esta propriedade anti-inflamatória pode estar relacionada ao fato de as folhas serem ricas em compostos fenólicos, especialmente flavan-3-óis ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e flavonóis (miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo). Posteriormente, Dias, Souza e Rogez (2010), fracionando o extrato bruto concentrado proveniente da maceração das folhas de *Inga edulis* em acetona, água e ácido acético, por partição líquido-líquido com hexano e por coluna C₁₈, obtiveram uma fração aquosa com compostos de média polaridade. E esta fração aquosa, ao ser analisada, demonstrou altos teores de polifenóis totais (571,4 mg EAG/g de fração seca) sendo grande parte representada pelos flavonóis (107,9 mg EMR/g de fração seca), flavanóis (168,5 mg ECA/g de fração seca) e proantocianidinas (142,1 mg ECI/g de fração seca) . Dentre esses compostos, os identificados foram miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo, procianidina B2, catequina, procianidina B1 e epicatequina, em ordem decrescente.

Recentemente, Silva (2012), trabalhando com a fração de média polaridade obtida da purificação do extrato hidroetanólico das folhas de *Inga edulis* em resinas macroporosas, quantificou polifenóis e flavonóides totais que foram de 412 mg EAG/g (grama em relação ao peso seco da fração) e 46 mg EQ/g, respectivamente. E em associação com a empresa Lychnoflora, identificou por LC-DAD-MS os compostos majoritários desta fração, de acordo com os dados de porcentagem das áreas dos picos, que foram a miricetina-3-O- α -

ramnopiranosídeo e a vicenina-2 identificada pela primeira vez. O teor de vicenina-2 encontrado por Silva (2012) foi de 10µg/mg de fração purificada. As atividades antioxidantes desta fração determinadas pela medida de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) e inibição da peroxidação lipídica apresentaram um valor de IC₅₀ de 4,88 ± 0,033 e 2,54 ± 0,391 µg da fração por mL de meio reacional, respectivamente (SILVA, 2012).

A Miricetina-3-*O*-α-ramnopiranosídeo, conhecida como miricitrina, é um flavonóide glicosilado pertencente ao subgrupo flavonol, encontrado naturalmente em várias plantas com propriedades medicinais. Sua estrutura química (Figura 5) é formada por dois grupos fenil (A e B) unidos por uma cadeia propiônica (C), na qual está ligada um açúcar, no caso a raminose. O considerável potencial antioxidante demonstrado por este flavonóide provavelmente está relacionado a esta estrutura poli-hidroxi. Além desta capacidade antioxidante, já foi relatado que a miricitrina possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (MEOTTI et al., 2007; WU et al., 2008; SHIMOSAKI et al., 2011; SCHWANKE et al., 2013; SUN et al., 2013; CHEN et al., 2013; QIN et al., 2015).

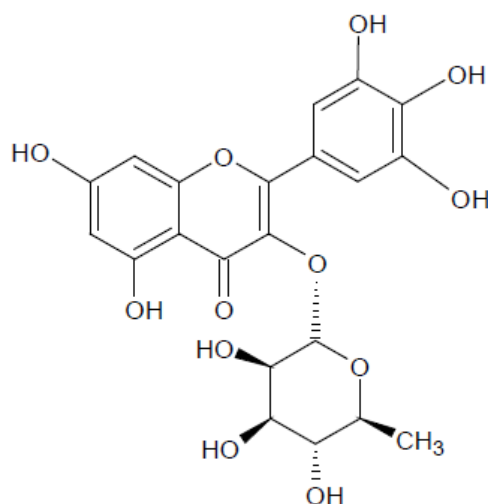


Figura 5: Estrutura química da Miricitrina.

O segundo composto majoritário desta fração purificada, a vicenina-2 (6,8-di-*C*-β-*D*-glicosilapigenina) também é um flavonóide glicosilado (Figura 6) que apresenta algumas propriedades já relatadas, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-glicação (GOBBO-NETO et al., 2005; MARRASSINI et al., 2011; ISLAM et al., 2014).

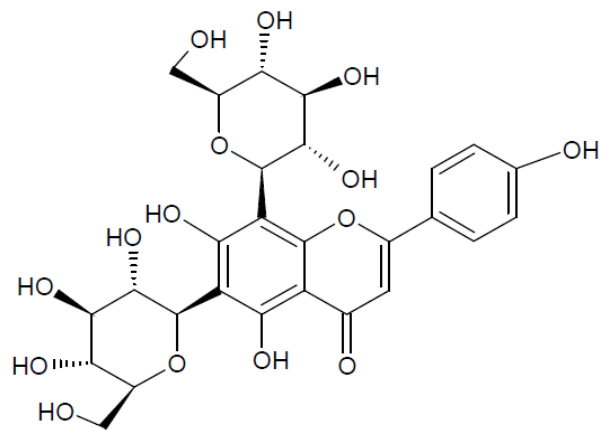


Figura 6: Estrutura química da Vicenina-2.

Nesse contexto, a proposta do trabalho consistiu em avaliar o potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada do extrato das folhas de *Inga edulis*, devido ao seu alto teor de polifenóis, potencial antioxidante e efeito anti-inflamatório observados em estudos anteriores (SOUZA et al., 2008; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

6. *Conclusões*

Diante dos resultados obtidos e de sua discussão, conclui-se que:

Os teores dos compostos majoritários da fração purificada de *Inga edulis*, vicenina-2 e miricitrina, quantificados por CLAE, foram de 14 e 146 $\mu\text{g}/\text{mg}$ da fração purificada, respectivamente.

A fração purificada demonstrou uma considerável atividade antioxidante *in vitro* no ensaio de quimioluminescência (sistema xantina/XOD/luminol), apresentando um IC_{50} de 0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio reacional.

Os compostos da fração purificada com atividade antioxidante são hidrossolúveis, conforme coeficiente de partição octanol/água realizado.

Soluções da fração purificada com diferentes concentrações, em contato com as células, fibroblastos (L929), proporcionaram uma menor oxidação do DCFH no meio intracelular, diminuindo significativamente a intensidade da fluorescência gerada pela DCF, após estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 e pela radiação UVA.

A formulação, emulsão estabilizada por polímero hidrofílico, adicionada de 1% da fração purificada de *Inga edulis*, permitiu a penetração de 3,4 μg da fração purificada por cm^2 de pele dos animais, após duas horas da aplicação, que ocasionou um aumento do potencial antioxidante endógeno da pele. A quantidade penetrada de vicenina-2 e miricitrina foram de 0,05 e 0,5 μg da fração/ cm^2 de pele, respectivamente.

A fração purificada nas concentrações de 25 e 50 mg/mL apresentou um efeito fotoprotetor para as radiações UVA e UVB, em cultura de células, fibroblastos (L929). Porém, este efeito não foi observado quando a fração purificada foi incorporada à formulação na concentração de 1%.

Os estudos de eficácia fotoquimioprotetora *in vivo* demonstraram que a fração purificada incorporada à formulação proporciona um efeito anti-inflamatório na pele dos animais após exposição à radiação UVB, por ser capaz de:

- Diminuir a atividade da MPO em 48% em decorrência de uma diminuição da migração dos neutrófilos para o tecido e não por inibição de atividade enzimática pelos compostos da fração purificada.
- Reduzir em 52% os níveis da quimiocina KC/CXCL1, devido à interação da miricitrina com receptores expressos em neutrófilos, o que resulta em uma menor síntese/secreção desta quimiocina, e em um menor recrutamento destes leucócitos.

- Reduzir os níveis da citocina TNF- α em 32%, como consequência de um menor recrutamento de neutrófilos e, logo, uma menor produção desta citocina por neutrófilos.

A formulação adicionada da fração purificada aplicada na pele dos animais expostos à radiação UVB não foi capaz de:

- Impedir a depleção do antioxidante endógeno GSH, devido à hidrossolubilidade dos compostos da fração purificada que não penetraram nas células.
- Evitar o aumento da MMP-9 via AP-1, visto que os compostos da fração purificada incorporada à formulação não absorvem a radiação UVB e não agem intracelularmente.
- Diminuir os níveis da citocina IL-1 β , pois a diminuição observada no grupo de animais tratados com a formulação adicionada da fração purificada foi igual à observada no grupo de animais tratados com a formulação placebo.

A fração purificada de *Inga edulis*, rica em compostos fenólicos, incorporada em formulação tópica, aparece como uma alternativa para prevenção das alterações provocadas na pele após exposição à radiação UVB, devido suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

7. Referências

- AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 571(1-2): 153-173, 2005.
- AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects os solar radiation on cutaneous detoxication pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63: 61-69, 2001.
- AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 508(2): 144-151, 2011.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, 55: 97-179, 1994.
- BASU-MODAK, S.; TYRRELL, R.M. Modulation of gene expression by solar ultraviolet radiation. In: GIACOMONI, P.U. **Sun Protection in Man**, 1st ed, vol. 3, Amsterdam: The Netherlands; vol.3, cap.15, pag. 303-320, 2001.
- BAYIR, H.M.D. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, 33(12): S498-S501, 2005.
- BEURDEN, P.A.M.S.; HOFF, J.W.V. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, 38: 73-83, 2005.
- BOLFA, P. et al. Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. **Food and Chemical Toxicology**, 62: 329-342, 2013.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 125: 811-826, 2004.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Bood**, 89(10): 3503-3521, 1997.
- BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, 78: 206-209, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2014. 124p.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, 52: 302-310, 1978.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research**, 571: 3-17, 2005.

CAMPANINI, M.Z. et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 127: 153-160, 2013.

CARINI, M., et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **II Farmaco** v. 55, p. 526-534, 2000.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia *in vivo***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 84 (1): 21-27, 2006.

CASSATELLA, M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Advances in Immunology**, 73: 369-509, 1999.

CAYROL, et al. A mineral sunscreen affords genomic protection against ultraviolet (UV) B and UVA radiation: in vitro and in situ assays. **British Journal of Dermatology** v. 141, n. 2, p. 250-258, 1999.

CHEN, W. et al. Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. **BioMed Research International**, 2013: 1-7, 2013.

CHRÉTIEN, M. N.; HEAFEY, E.; SCAIANO, J. C. Reducing Adverse Effects from UV Sunscreens by Zeolite Encapsulation: Comparison of Oxybenzone in Solution and in Zeolites. **Photochemistry and Photobiology** v. 86, p. 153-161, 2010.

CHU, D.H. Development and Structure of Skin. In: GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFELL, D.J.; WOLFF, K. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**, 8th ed., New York: McGraw-Hill; cap.17,p.57-73, 2012.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 7(2): 66-76, 1996.

- COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, 61(1): 71-76, 1998.
- CROSS, A.S. et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (6): 4112-4120, 2003.
- CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário Parte I – Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 50(4): 434-461, 2010.
- DIAS, A.L.S.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, 33(1): 38-42, 2010.
- DOMITROVIĆ, R. et al. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**, 230: 21-29, 2015.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews. Cancer.**, 2(3): 161-174, 2002.
- FENG, X.-X. et al. Effects of topical application of patchouli alcohol on the UV-induced skin photoaging in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 63: 113-123, 2014.
- FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, 25(6): 1003-1011, 2002.
- FIGUEIREDO, S.A. et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 131: 65-73, 2014.
- FONSECA, Y.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- FONSECA, Y.M. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, 127: 596-601, 2010.

FORTE, A.L.S.A. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

GEORGETTI, S.R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescent method. **AAPS PharmSci**, 5: 210-214, 2003.

GETIE, M. et al. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, 57: 320-322, 2002.

GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, 51: 685-692, 2000.

GOBBO-NETO, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, 71 (1): 3-6, 2005.

GODIC, A. et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014: 1-6, 2014.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, 30: 206-213, 2007.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J.M. As quimiocinas e os seus receptores – Características e Funções Fisiológicas. **Acta Médica Portuguesa**, 24: 967-976, 2011.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 1205-1212, 2006.

HALLIDAY, G.M. et al. The effects of sunlight on the skin. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms/Common skin conditions and disorders**, 5(2): e201-e209, 2008.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55: 481-504, 2000.

HECK, D.E. et al. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 195: 288-297, 2004.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 74: 214-226, 1976.

HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International Journal of Pharmaceutics**, 408(1-2): 27-38, 2011.

HRUZA, L.L.; PENTLAND, A.P. Mechanisms of UV-induced inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, 100: 35S-41S, 1993.

HWANG, E. et al. Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. **Phytotherapy Research**, 28: 1778-1788, 2014.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta**, 305: 75-80, 2001.

ISLAM, M.N. et al. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaries* exhibited potent anti-glycation properties. **Food and Chemical Toxicology**, 69: 55-62, 2014.

JAIN, A. K. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates nitrogen mustard-induced skin injuries. **Toxicology**, 320: 25-33, 2014.

JIANG, S.J. et al. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. **Journal of Dermatological Science**, 44: 29-36, 2006.

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

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, 148: 149-157, 2000.

KRYSTON, T.B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 711: 193 – 201, 2011.

KROLIKIEWICZ-RENIMEL, I. et al. Protective effect a *Butea monosperma* (Lam.) Taub. flowers extract against skin inflammation: Antioxidant, anti-inflammatory and matrix metalloproteinases inhibitory activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 148: 537-543, 2013.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. **Internacional Immunopharmacology**, 10: 1325-1334, 2010.

KWON, O.S.; JUNG, S.H.; YANG, B.S. Topical Administration of Manuka Oil Prevents UV-B Irradiation-Induced Cutaneous Photoaging in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013: 1-10, 2013.

LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 52: 113-119, 2001.

LEMBO, S. et al. The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells. **BioMed Research Internation**, 2014: 1-8, 2014

LIAKOURA, V.; BORNEAN, J.F.; KARABOURNIOTIS, G. The ability of abaxial and adaxial epiderms of sun and shade leaves to attenuate UV-A and UV-B radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, 122: 117-125, 2003.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, 6(12): 1182-1190, 2005.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento de formulações tópicos fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo.** 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MARRASSINI, C. et al. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis*. **Journal of Natural Products**, 74(6): 1503-1507, 2011.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 195: 298-308, 2004.

-
- MEOTTI, F.C. et al. Involvement of p38^{MAPK} on the antinociceptive action of myricitrin mice. **Biochemical Pharmacology**, 74: 924-931, 2007.
- MEOTTI, F.C. et al. Myricitrin as a substrate and inhibitor of mieloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, 44: 109-120, 2008.
- MERZLYAK; M.N. et al. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment. **Journal of Plant Physiology**, 162: 151-160, 2005.
- MOLLINEDO, F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. **Inmunología**, 22(4): 340-358, 2003.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84(3): 263-269, 2009.
- MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 54 (2): 103-112, 2001.
- MOURET, S. et al. Time course of skin features and inflammatory biomarker after liquid sulfur mustard exposure in SKH-1 hairless mice. **Toxicology Letters**, 232: 68-78, 2015.
- MÜLLER,K.; MEINEKE, V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. **Experimental Hematology**, 35: 96-104, 2007.
- MURPHY; P.M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Seminars in Hematology**, 34(4): 311-318, 1997.
- NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRATT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, 69: 249-256, 2011.
- NICHOLS, J.A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, 302: 71-83, 2010.
- ODOBASIC, D. et al. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. **Blood**, 121(20): 4195 – 4204, 2013.

- PANDEL, R. et al. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Notices Dermatology**, 2013:1-11, 2013.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63(7): 1035-1042, 2000.
- PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, 27: 17-34, 2005.
- PHARMASPECIAL. Informativo Técnico: Literatura Hostacerin® SAF. Disponível em: http://pharmaspecial.com.br/media/produtos/_lit_hostacerin_saf.pdf. Acesso em 18 de Janeiro de 2015.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, 17(11): 1381-1390, 2011.
- POMPEU, D.R. et al. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazônica**, 42(1): 165-172, 2012.
- PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **Plos One**, 8(7): 1-10, 2013.
- QIN, M. et al. Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3/Akt activation and STAT3 signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, 1-12, 2015.
- RAMPAUL, A.; PARKIN, I.P.; CRAMER, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, p. 138–148, 2007.
- RAVANAT, J.-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63: 88-102, 2001.
- RAVINDRAN, A. et al. Chemokine CXCL1 dimer is a potent agonist for the CXCR2 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 288(17): 12244-12252, 2013.
- RITTIÊ, L.; FISHER, G.J. UV- light- induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, 1: 705-720, 2002.

ROSA, F.S. **Influência de protetor de absorção cutânea e derivados ésteres do ácido 5-aminolevulínico na terapia fotodinâmica do câncer de pele.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 273-278, 2010.

SCHWANKE, R.C. et al. Oral administration of the flavonoid myricitrin prevents dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice through modulation of PI3K/Akt signaling pathway. **Molecular Nutrition & Food Research**, 57 (11): 1938-1949, 2013.

SERAFINI, M.R. et al. UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing *Morinda citrifolia* extract. **Biomed Research International**, 2014: 1-10, 2014.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, 360(3): 794-802, 2007.

SHAH, H.; MAHAJAN, S.R. Photoaging: new insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**, 3(3): 161-169, 2013.

SHIMOSAKI, S. et al. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extract *in vitro* and *in vivo*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, 25(4): 374-380, 2011.

SILVA, D.F. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico-químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SILVA, E.M. et al. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. **Separation and Purification Technology**, 53: 274-280, 2007.

SILVA, E.M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, 55: 381-387, 2007.

SILVA, L.R.; FERREIRA, M.M.C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, 26 (3): 312-318, 2003.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 20(2): 351-355, 2007.

SOUZA, J.N.S. et al. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, 106: 331-339, 2008.

SOUZA, J.N.S. et al. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18(6): 1276-1280, 2007.

SUN, G. et al. inhibitory effects of myricitrin on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis in ApoE^{-/-}-mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 271(1): 114-126, 2013.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, 150(1): 25-38, 2006.

TAKAHASHI, M. et al. Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. **The Plant Journal**, 66: 433-442, 2011.

TYRREL, R.M.; KEYSE, S.M.; MORAES, E.C. Cellular defense against UVA (320-380 nm) and UVB (290-320 nm) radiations. **Photobiology**, 861-871, 1991.

VICENTINI, F. T. M. C., et al. Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 69, n. 3, p. 948-957, 2008.

VIEIRA, S.M. et al. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British Journal of Pharmacology**, 158: 779-789, 2009.

VILA, A.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A.W. Dissemination of peroxidative stress via intermembrane transfer of lipid hydroperoxides: model studies with cholesterol hydroperoxides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 380(1): 208-218, 2000.

WALKER, R.B.; SMITH, E.W. The role of percutaneous penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 18: 295-301, 1996.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplatereader. **Free Radical Biology & Medicine**, 27: 612-616, 1999.

WEBER, S.U. et al. Vitamin C, uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure. **The Journal of Investigative Dermatology**, 113(6): 1128-1132, 1999.

WESTER, C.R.; MAIBACH, H.L. In vitro testing of topical pharmaceutical formulations In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**. New York: Marcel Dekker, 213-220, 1990.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56: 603-618, 2004.

WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 5(2): 215-237, 2005.

WU, J-H. et al. Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2): 328-332, 2008.

YIN, Y. et al. Quercetin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 269:89-99, 2013.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6): 787-793, 1998.

ZHU, H. et al. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. **Archives of Toxicology**, 68: 582-587, 1994.