

ALEXANDRE ROBERTO SILVA

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS COM
POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM FIBROBLASTOS
SUBMETIDOS À RADIAÇÃO UV**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Almeriane M. Weffort Santos

**CURITIBA
2009**

Silva, Alexandre Roberto

Efeito de extratos vegetais com potencial antioxidante em fibroblastos submetidos à radiação UV / Alexandre Roberto Silva. – Curitiba, 2009.

102 f.: il. ;.30 cm.

Orientadora: Almeriane Maria Weffort Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Análises Clínicas.

1. Antioxidante. 2. Envelhecimento. 3. *Camellia sinensis*.
4. Catalase. 5. Chá-verde. 6. Extratos vegetais. 7. Metaloproteinases.
8. Radiação UV. 9. Superóxido dismutase. I. Weffort-Santos,
Almeriane Maria II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 615.32

NOTA BIOGRÁFICA

O autor é Farmacêutico Bioquímico Industrial graduado pela Universidade Federal do Paraná em 2000. Durante a graduação, de março de 1997 a agosto de 1999, foi aluno de iniciação científica no Laboratório de Controle de Qualidade da mesma instituição de ensino, no qual realizou estudos referentes à qualidade de medicamentos e atividades antimicrobianas de extratos vegetais utilizando métodos farmacopeicos. Em fevereiro de 2001, iniciou sua carreira como farmacêutico responsável na Farmácia e Drogeria Nissei. Em junho de 2001 ingressou na empresa Natura, realizando, dentre outras atividades, o desenvolvimento de novos produtos cosméticos. Ainda no setor cosmético, em agosto de 2006 iniciou suas atividades na área de Tecnologia de Produtos da empresa O Boticário, onde trabalha até hoje. Em 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, área de concentração Análises Clínicas, tendo desenvolvido um estudo *in vitro* relacionando o potencial antioxidante de extratos vegetais e seus efeitos sobre fibroblastos submetidos à radiação UV, cujos resultados estão apresentados nesta dissertação de mestrado.

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, Camila,
à minha querida filha, Julia,
aos meus adorados pais, Gilson e Cleia, e irmã, Patrícia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu criador, que me proporcionou realizar este trabalho.

A Camila, minha eterna companheira, pelo incentivo, compreensão e amor durante todos estes anos.

À minha filha Julia, pelo olhar fraterno e abraço carinhoso que sempre me confortam e me fazem perseverar nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Gilson e Cleia, exemplos de determinação, que me educaram e me prepararam para a vida, e que a cada dia me fortalecem com suas palavras e gestos.

À minha irmã Patrícia, sempre solícita, por suas palavras precisas e pelo apoio e auxílio dispensados ao longo de minha vida inteira.

A todos os familiares e amigos, de um modo geral, que compreenderam minha ausência e sempre me apoiaram nesta caminhada.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Almeriane Maria Weffort-Santos, pela amizade, ensinamentos e incondicional apoio, e por acreditar neste trabalho em todos os momentos.

Ao Prof^o. Dr^o. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo extrato fluido de chá-verde e pela amizade e presteza demonstradas desde a época de graduação.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo, cumplicidade, e, principalmente, a Flávia, Ivanna, Carlos, Adélia e Brenda, sempre dispostos a me ouvir e a contribuir com o meu trabalho.

Aos meus amigos de todas as horas, Pedro, Tiago, Danielle e Maria Carolina, que compartilharam minhas angústias e me aconselharam em todos os momentos desta caminhada.

Ao Dr. Gustavo Dieamant e Dra. Samara Eberlin, pela realização de testes que foram fundamentais para a finalização deste trabalho, e pela atenção e disponibilidade dispensadas.

A toda equipe de Tecnologia de O Boticário, Carlos Praes, Daniela, Melânia, Priscila, Luciana, Thayanne, Grazielle e Ruandro, pelos ensinamentos e incentivo durante os últimos anos.

A Luana, Valeska, Prof. Aguinaldo e Marcelo Marcante, pelas análises estatísticas realizadas.

A Regina Montrezol, pelas constantes orientações e por seu otimismo contagiante.

Às colegas do laboratório de Hematologia, Fernanda, Luciana, Monique, Geni e Irene, pela valiosa ajuda durante este período de trabalho.

Ao Boticário, pelo apoio financeiro e por me permitir realizar este projeto de mestrado.

A Universidade Federal do Paraná, instituição que muito respeito e admiro, pela infraestrutura concedida para a realização da pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Radicais livres e estresse oxidativo	01
1.2. Antioxidantes	04
1.2.1. Antioxidantes enzimáticos	05
1.2.2. Antioxidantes não-enzimáticos.....	06
1.3. Pele e seu envelhecimento	08
1.4. Radiação UV e seus efeitos	16
1.5. Extratos vegetais	21
1.5.1. <i>Camellia sinensis</i>	23
1.5.2. <i>Ilex paraguariensis</i>	25
1.5.3. <i>Helianthus annuus</i>	26
1.5.4. <i>Ginkgo biloba</i>	26
1.5.5. <i>Zingiber officinale</i>	27
1.5.6. <i>Vitis vinifera</i>	27
1.5.7. <i>Artemisia umbelliformis</i>	28
1.6. Métodos analíticos	28
1.6.1. Métodos químicos	28
1.6.2. Métodos biológicos	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Soluções	32
3.2. Extratos vegetais	33
3.2.1. Preparo de extrato fluido de chá-verde	34
3.3. Células	34
3.4. Método de redução do DPPH*	35
3.5. Método de redução do complexo fosfomolibdênico	36
3.6. Determinação do perfil cromatográfico e do teor de EGCG	36
3.7. Ensaio de viabilidade e citotoxicidade para células McCoy	37
3.8. Toxicidade induzida por radiação UV	37

3.9. Toxicidade induzida por H₂O₂	38
3.10. Avaliação da atividade protetora celular	38
3.11. Mensuração de enzimas metaloproteinases (MMP)	39
3.12. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes	40
3.13. Estudos estatísticos	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Avaliação da atividade antioxidante	42
4.2. Determinação do perfil cromatográfico e do teor de EGCG	48
4.3. Efeito dos extratos de chá-verde, girassol e erva-mate sobre células McCoy	50
4.4. Toxicidade induzida por radiação UV	55
4.5. Efeito de extratos vegetais sobre células McCoy irradiadas	57
4.6. Toxicidade induzida pelo H₂O₂	60
4.7. Efeito de extratos vegetais sobre células McCoy tratadas com H₂O₂	62
4.8. Efeito dos extratos de chá-verde sobre células humanas	66
4.9. Mensuração de enzimas metaloproteinases (MMP)	68
4.10. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes	73
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	77
6. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de redução do oxigênio à água gerando várias espécies reativas de oxigênio.	03
Figura 2 - Conversão do oxigênio em água em sistemas enzimáticos biológicos.....	06
Figura 3 - Estrutura tridimensional da pele, demonstrando suas três camadas, epiderme (e suas subcamadas), derme e hipoderme... ..	09
Figura 4 - Penetração dos diferentes tipos de radiação UV em peles humana e murina.....	18
Figura 5 - Efeitos da radiação UV em queratinócitos e fibroblastos.....	20
Figura 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroglicólico de chá-verde avaliada pelo método de redução do DPPH*	43
Figura 7 - Atividade antioxidante dos extratos comerciais de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico	45
Figura 8 - Perfil cromatográfico dos extratos hidroglicólico e fluido de chá-verde.....	49
Figura 9 - Efeito <i>in vitro</i> do extrato hidroglicólico de chá-verde e do propilenoglicol sobre a proliferação de células McCoy.	52
Figura 10 - Efeito <i>in vitro</i> do extrato fluido de chá-verde sobre a proliferação de células McCoy.	53
Figura 11 - Efeito <i>in vitro</i> do extrato de girassol sobre a proliferação de células McCoy..	54
Figura 12 - Efeito <i>in vitro</i> do extrato de erva-mate sobre a proliferação de células McCoy.	54
Figura 13 - Efeito da radiação UV sobre células McCoy.....	56
Figura 14 - Efeito dos extratos comerciais de chá-verde, girassol e erva-mate sobre células McCoy após irradiação UV.. ..	58
Figura 15 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde sobre células McCoy após irradiação UV.....	59
Figura 16 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre células McCoy após irradiação UV.	60
Figura 17 - Efeito do H ₂ O ₂ sobre células McCoy.. ..	61
Figura 18 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde sobre células McCoy após exposição ao H ₂ O ₂	63
Figura 19 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre células McCoy após exposição ao H ₂ O ₂	64
Figura 20 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde e propilenoglicol sobre fibroblastos humanos após irradiação UV.....	67
Figura 21 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre fibroblastos humanos após irradiação UV.....	68
Figura 22 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-1 em fibroblastos humanos após irradiação UV.....	70
Figura 23 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-9 em fibroblastos humanos após irradiação UV.....	71

Figura 24 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-13 em fibroblastos humanos após irradiação UV.....	72
Figura 25 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre a atividade de SOD e CAT em fibroblastos humanos após irradiação UV.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais metaloproteinases e seus substratos.	12
Tabela 2 - Composição dos extratos comerciais usados no trabalho	34
Tabela 3 - Capacidade antioxidante dos extratos de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelo método da redução do DPPH*, usando-se o ácido ascórbico como referência.	44
Tabela 4 - Capacidade antioxidante dos extratos de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelos métodos da redução do DPPH* e do complexo fosfomolibdênico.	46
Tabela 5 - Concentrações dos extratos de chá-verde, erva-mate e girassol utilizadas nos ensaios com células McCoy, baseadas nos valores de EC ₅₀	55

RESUMO

A exposição excessiva às radiações ultravioleta (UV) pode ocasionar alterações na pele e acelerar o processo natural de envelhecimento. O excesso de radicais livres que contribui para o estresse oxidativo, o metabolismo desregulado das metaloproteinases (MMP) e a depleção de antioxidantes enzimáticos são alguns dos fatores que contribuem para com o fotoenvelhecimento. Várias plantas possuem substâncias dotadas de ação antioxidante que, indiretamente, podem atenuar o processo de envelhecimento. Considerando a crescente procura por substâncias naturais para compor formulações farmacêuticas e cosméticas na prevenção e combate ao envelhecimento precoce, neste trabalho avaliou-se o potencial antioxidante de extratos comerciais de *Camellia sinensis* (chá-verde), *Ginkgo biloba* (ginkgo), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Helianthus annuus* (girassol), *Vitis vinifera* (uva), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Artemisia umbelliformis* (artemísia) e sua relação com efeitos na proteção de fibroblastos irradiados e expostos ao H₂O₂, bem como na quantificação de MMP e das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. Os resultados confirmaram o potencial antioxidante desses extratos e demonstraram uma influência significativamente positiva sobre os processos relacionados ao fotoenvelhecimento ao protegerem fibroblastos de danos provocados por radiação UV *in vitro*, particularmente para o extrato de chá-verde, com diminuição da produção de MMP, em contraste com o aumento dos níveis de enzimas antioxidantes endógenas. Ainda, ao comparar-se o perfil de ação de um extrato padrão com o de um extrato comercial de chá-verde, observou-se que a intensidade dos efeitos benéficos pode estar diretamente relacionada ao modo de preparação dos ativos.

Palavras-chave: antioxidante, envelhecimento, *Camellia sinensis*, catalase, chá-verde, extratos vegetais, metaloproteinases, radiação UV, superóxido dismutase.

ABSTRACT

Over exposition to ultraviolet light can lead to functional and esthetic changes in the skin, and contribute to accelerate the aging process. Photoaging may be the result of free radical generation in excess, disruption of the metalloproteinase (MMP) metabolism and depletion of endogenous antioxidant defenses. A variety of substances in plants has antioxidant capacity that may be beneficial for the aging events. The increasing search for naturally occurring agents to supplement and enrich pharmaceutical preparations as an approach for combating and preventing the aging process led us to explore the antioxidant potential of the *Camellia sinensis* (green tea), *Ginkgo biloba* (ginkgo), *Ilex paraguariensis* (yerba mate), *Helianthus annuus* (sunflower), *Vitis vinifera* (grape), *Zingiber officinale* (ginger) and *Artemisia umbelliformis* (artemisia) commercial extracts, and compare their effectiveness in protecting fibroblasts from the damage induced by UV light and H₂O₂. To do so, we have studied their effects upon the survival of irradiated and H₂O₂-treated fibroblasts, measured the MMP levels, and the catalase and superoxide desmutase endogenous production. The results have confirmed their antioxidant potential and demonstrated, particularly for the green tea extract, significant protection against ultraviolet-induced damage by decreasing the MMP levels while increasing the production of the endogenous antioxidants. Furthermore, after comparing the results obtained by a standard green tea extract, we suggest that the intensity of the beneficial effects are related to the way these extracts are prepared.

Key words: antioxidant, aging, *Camellia sinensis*, catalase, green tea, plant extracts, metalloproteinases, UV light, superoxide dismutase.

1. INTRODUÇÃO

A Terra é o único planeta do sistema solar que conhecidamente contém oxigênio molecular (O_2) em sua atmosfera e o recicla por meio dos processos de fotossíntese e respiração. No entanto, o O_2 enquadra-se em um paradoxo, uma vez que é essencial à vida ao mesmo tempo em que, em alguns de seus estados reduzidos, pode dar origem a substâncias muito tóxicas às células e aos tecidos do organismo humano (Scandalios, 2005).

As células utilizam a redução de O_2 em H_2O para produzir energia e, nesse processo, ocorre a liberação de radicais livres (RL), moléculas instáveis resultantes de funções metabólicas básicas, como a respiração. Por possuírem um elétron desemparelhado em seu orbital mais externo, estas espécies químicas são altamente reativas e atuam como agentes redutores quando doam um elétron ou como agentes oxidantes ao ganharem um elétron em diferentes condições (Ratnam et al., 2006; Jay et al., 2006).

1.1. Radicais livres e estresse oxidativo

Os RL são formados em todas as organelas e compartimentos intracelulares e sua geração é fundamental para a homeostase de células e tecidos, uma vez que eles podem ser produzidos pelos fagócitos e atuar contra agentes invasores, podem ter origem citossólica e regular fatores de crescimento envolvidos em respostas proliferativas e, ainda, podem desempenhar funções de sinalização celular (Valko et al., 2007; Tahara, Matsuo e Kaneko, 2001; Finkel e Holbrook, 2000). Assim, cada organela e/ou compartimento possui alvos de dano oxidativo, além de abrigarem mecanismos próprios para eliminação do excesso destes RL (Shin et al., 2008). Tem-se a mitocôndria como a maior fonte de RL intracelulares, com produção durante o processo de respiração celular, na cadeia transportadora de elétrons (Lin et al., 2003; Finkel e Holbrook, 2000).

Vários estudos mostram que células e organismos envelhecidos possuem níveis aumentados de oxidantes danosos ao ácido desorribonucleico (ADN). Provavelmente pela sua proximidade da fonte geradora principal de agentes oxidantes, ou por causa de seu sistema de reparo limitado, o ADN mitocondrial é geralmente considerado mais sensível ao dano oxidativo do que o ADN nuclear (Finkel e Holbrook, 2000).

Dados recentes revelam que fibroblastos humanos cultivados em ambiente com baixos níveis de oxigênio exibem vida útil prolongada. Por outro lado, células cultivadas na presença de altas taxas de oxigênio apresentam vida útil menor, com um processo acelerado de encurtamento de telômeros (Vaziri e Benchimol, 1996). Embora discussões prévias tenham abordado a geração endógena de espécies reativas de oxigênio como consequência das atividades metabólicas normais, vários estímulos ambientais como a radiação solar, agentes químicos ou mesmo a hipertermia, podem gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a um desequilíbrio na homeostase de células e tecidos (Finkel e Holbrook, 2000).

O organismo está normalmente em equilíbrio entre a produção e a degradação de RL. Quando existe um desequilíbrio entre as espécies reativas produzidas e as reservas antioxidantes, cria-se o já mencionado estresse oxidativo (Chow, 2002), que provoca danos importantes em nível celular: (1) RL atacam as membranas celulares; (2) danificam a mitocôndria, prejudicando a produção de energia; (3) interagem com as moléculas de proteína, danificando sistemas metabólicos cruciais, e (4) fragmentam o ADN, provocando mutações variadas e, muitas vezes, divisões celulares descontroladas.

Quando o estresse é severo, a sobrevivência depende da habilidade das células adaptarem-se ou resistirem a ele, e reparar ou remover as moléculas danosas e danificadas. Alternativamente, as células podem responder ao dano entrando em processo de apoptose (Portugal et al., 2007; Finkel e Holbrook, 2000).

Considerando-se que os RL atacam e lesam o ADN presente no organismo dez mil vezes por dia e que, dessas fragmentações, a maior parte é corrigida por enzimas reparadoras, estima-se que somente cerca de 1 % escapam ao controle enzimático. O dano não reparado contribui definitivamente para o envelhecimento precoce do organismo em questão e, ainda, corrobora para o desenvolvimento de inúmeras patologias crônicas severas, como o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e doenças auto-imunes (Hu et al., 2000; Kaur, Kapila e Agrawal, 2007; Ratnam et al., 2006; Timothy, 2000).

Como recentemente revisado por Portugal (2007) e Scandalios (2005), devido à facilidade de sua interação com células e tecidos, é importante

caracterizar as principais ERO e conhecer o seu potencial destrutivo. Primeiramente, cumpre salientar que a reatividade do O_2 pode ser aumentada através da adição de um elétron ou por meio da transferência de energia, dando origem ao oxigênio singlete (1O_2). A completa redução do O_2 à água requer quatro elétrons (Figura 1), sendo que as espécies reduzidas de oxigênio incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$).

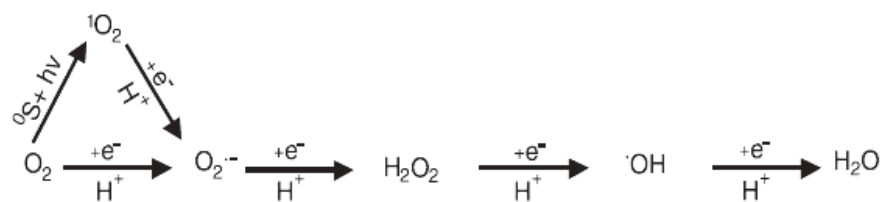


Figura 1 - Reação de redução do oxigênio à água gerando várias espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Scandalios, 2005.

O 1O_2 é obtido após ação da luz em presença de um fotossintetizador, o qual transfere sua energia ao oxigênio e o deixa com dois elétrons emparelhados. Ele pode, então, reagir com cromóforos e inúmeros compostos contendo ligações carbono-carbono, como o caroteno ou os ácidos graxos (Scandalios, 2005).

Já o ânion $O_2^{\cdot-}$ pode ser formado em diversas reações de fotooxidação, pela reação de Mehler (em cloroplastos) e, também, em reações com o ozônio (O_3). Vários efeitos tóxicos atribuídos ao radical $O_2^{\cdot-}$ podem ser devidos à reação deste, catalisada por um metal, com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para produção do radical hidroxil (Scandalios, 2005; Valko et al., 2007).

Conforme descrito por Piao (2008), Valko (2007), Ratnam (2006), Jay (2006) e seus respectivos colaboradores, o H_2O_2 pode ser formado por dismutação, beta-oxidação e em respostas contra patógenos; tem baixa reatividade e seus efeitos não estão associados ao ataque direto a componentes celulares. Já o radical $OH\cdot$ pode ser gerado em defesa contra patógenos, reações de peróxido de hidrogênio com ânion superóxido (Haber-Weiss) e pela reação de Fenton (peróxido em presença de ferro). Este é o

radical de oxigênio mais reativo e reage com biomoléculas capazes de ceder elétrons, como enzimas, açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos ou fosfolípidos de membrana, levando à sua desorganização, sendo amplamente destrutivo e potencialmente mutagênico em sistemas biológicos.

Não se pode deixar de citar a contribuição deletéria das espécies reativas de nitrogênio, por meio da ação do monóxido de nitrogênio ou óxido nítrico e, principalmente, pela possibilidade de sua combinação com o ânion superóxido, formando peróxi-nitrito. A decomposição desta espécie reativa é capaz de gerar um composto oxidante com reatividade similar à do radical hidroxil (Katiyar e Elmets, 2001).

O organismo é exposto diária e continuamente a agentes poluentes e raios ultravioleta (UV), os quais produzem um grande número de agressores oxidantes capazes de prejudicar principalmente as membranas biológicas das células e, em particular, as da pele (Nicolay e Paillet, 2002). Por possuir elevada superfície de contato e ser constituída por diversas camadas de células que contém proteínas, lípidos e ADN, a pele torna-se um dos principais alvos de ataque dos RL. Por este motivo, deve ser deles protegida constantemente, através do uso adequado de vestimentas, da aplicação tópica ou mesmo pela ingestão de substâncias antioxidantes reconhecidamente eficazes (Kohen, 1999).

1.2. Antioxidantes

Dados epidemiológicos têm contribuído significativamente para que os agentes antioxidantes sejam utilizados na profilaxia e terapêutica de doenças variadas. São observadas diferenças importantes quanto à incidência de certas doenças entre etnias que possuem estilos de vida e vivem em condições ambientais distintas. Isto tem sido explicado, pelo menos em parte, pela dieta antioxidante adotada pela população. Na França, por exemplo, onde o consumo de vinho tinto é elevado, há baixo índice de mortalidade decorrente de doenças cardiovasculares, uma vez que sabidamente neste tipo de vinho encontram-se substâncias antioxidantes importantes, como o resveratrol (Ratnam et al., 2006).

Com o objetivo de minimizar os efeitos danosos das ERO, os organismos, ao longo de sua evolução, desenvolveram sistemas antioxidantes

enzimáticos e não enzimáticos. No primeiro grupo estão enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (GSH-Px), as quais protegem diretamente contra o radical O_2^{\bullet} e o H_2O_2 , neutralizando-os ou convertendo-os em espécies menos reativas (Ratnam et al., 2006; Anderson e Phillips, 1999). Entre as defesas não-enzimáticas estão as vitaminas C e E, a glutathiona, o ácido úrico, o ubiquinol, a melatonina e o beta caroteno (Laguerre et al., 2007; Scandalios, 2005).

1.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Sabe-se que as enzimas antioxidantes são agentes muito eficazes no tratamento de insultos agudos que provocam estresse oxidativo, sendo que a SOD e a CAT estão entre os mais potentes antioxidantes encontrados na natureza (Ratnam et al., 2006).

A SOD foi isolada e caracterizada em uma infinidade de organismos vivos. Nos seres humanos, existem três tipos desta enzima, chamadas de Cu/ZnSOD citossólica, MnSOD mitocondrial e SOD extracelular, as quais são responsáveis pela dismutação de dois radicais O_2^{\bullet} em H_2O_2 (Augusto, 2006; Ratnam et al., 2006; Scandalios, 2005). A SOD, assim como a maioria das enzimas antioxidantes, depende essencialmente de co-fatores externos para que possa desempenhar suas atividades e possui meia vida curta. Na epiderme humana, a atividade da Cu/ZnSOD parece ser de cinco a dez vezes menor que a da MnSOD; é relatado ainda que, se comparada com outros tecidos, a atividade da SOD é relativamente menor na pele (Thiele e Dreher, 2005).

A catalase é um tetrâmero com quatro grupamentos heme encontrado em todos os organismos aeróbicos. Esta enzima ocorre abundantemente no corpo humano, com alta atividade no fígado, eritrócitos e pulmões (Ratnam et al., 2006; Scandalios, 2005). Predominantemente presente nos peroxissomos, é responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 sem a produção de RL (Scandalios, 2005; Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). Estudos indicam que há atividade elevada desta enzima na epiderme humana, o que não acontece na derme (Shindo et al., 1994).

O H_2O_2 pode ser eliminado pela ação da glutathiona peroxidase presente no citossol, na mitocôndria ou no meio extracelular. Sua ação é converter o

H_2O_2 em H_2O e os hidroperóxidos lipídicos oriundos da membrana, em álcoois estáveis (Fridovich, 1998; Anderson e Philipps, 1999; Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). A ação desta enzima é desempenhada através da utilização da glutatona reduzida (GSH), em reação catalisada pela glutatona peroxidase. Após a doação de elétrons, a GSH passa a sua forma oxidada (GSSG), mas poderá ser regenerada através da glutatona redutase, com transferência do hidrogênio do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). A Figura 2 mostra, de forma esquemática, a interação das enzimas antioxidantes, onde RL, como por exemplo o $\text{O}_2^{\cdot-}$, são destituídos de seu poder oxidante, resultando finalmente em H_2O .

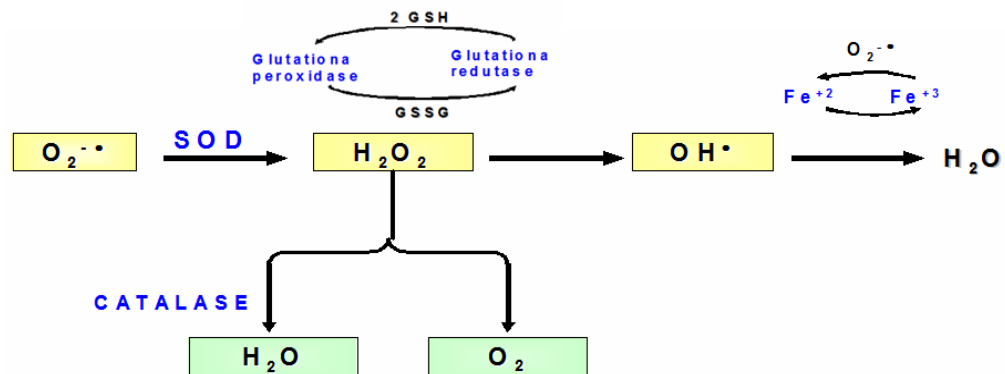


Figura 2 - Conversão do oxigênio em água em sistemas enzimáticos biológicos. O O_2 convertido em $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ser inativado espontaneamente ou, mais rapidamente, pela enzima SOD, formando H_2O_2 que, por sua vez, pode ser convertido em água pela ação da catalase. O H_2O_2 pode também ser reduzido através do NADPH, em reação mediada pela GSH. O envolvimento do íon Fe^{+2} gera, por meio da Reação de Fenton, além do íon Fe^{+3} , OH^{\cdot} , um radical livre extremamente reativo com moléculas biológicas. Adaptado de Arbos, 2004.

1.2.2. Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes hidrofílicos encontrados no sangue circulante, como a glutatona, o ácido úrico, a albumina, a haptoglobina e a hemopexina, ou nos fluidos intersticiais, agem diretamente neutralizando os RL ou, indiretamente, através da sua participação em sistemas enzimáticos (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999).

A vitamina C, ou ácido L-ascórbico, é uma substância hidrofílica, cuja função principal é proteger lipoproteínas da oxidação (May, 1998). Além de ser

altamente antioxidante, seqüestrando agentes oxidantes como OH^\bullet , H_2O_2 e ácido hipocloroso, é capaz de regenerar a vitamina E e torná-la ativa novamente (Lupo, 2001). Apresenta, também, importante ação antienvhecimento por atuar na síntese e manutenção das fibras de colágeno (Ehrlich et al., 2006; Boyera, Galey e Bernard, 1998).

Já a vitamina E, ou α -tocoferol, encontra-se localizada tanto na membrana celular como nas lipoproteínas circulantes. Bloqueia a peroxidação lipídica por remover radicais peroxil, além de O_2^\bullet , OH^\bullet e $^1\text{O}_2$ (Lupo, 2001; Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). Esta vitamina é amplamente utilizada nas áreas farmacêutica e cosmética por suas propriedades fotoprotetora, antiinflamatória e antitumoral (Thiele e Ekanayake-Mudiyanselage, 2007; Lupo, 2001).

Os carotenóides, pigmentos responsáveis pela coloração de certos alimentos, devido ao sistema de duplas conjugadas, também oferecem proteção contra os efeitos deletérios de RL (Rao e Agarwal, 1999). O β -caroteno, por exemplo, constitui a maior fonte de vitamina A e age como antioxidante por inibir a oxidação da fosfatidilcolina, impedindo a peroxidação lipídica (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). Já o licopeno, um carotenóide insaturado responsável pela coloração avermelhada das frutas, apresenta, dentre outras atividades, elevado potencial redutor, sendo um agente antioxidante efetivo capaz de inibir a resposta eritematosa induzida por radiação UV (Darvin et al., 2008).

Outras substâncias naturais podem desempenhar papel importante no aporte antioxidante externo, tanto por via oral quanto por via tópica, como por exemplo as catequinas presentes no chá-verde (Yoo et al., 2008; Farris, 2007; Bixby et al., 2005); os polifenóis da erva-mate (Bastos et al., 2006; Bixby et al., 2005; Filip et al., 2000) e do girassol (Arabshahi-D, Devi e Urooj, 2007; Costa, Gallego e Tomaro, 2002); os flavonóides do ginkgo (Sener et al., 2006; Silva et al., 2005; Goh e Barlow, 2002) e da artemísia (Jung et al., 2008; Liu et al., 2004; Juteau et al., 2002); o gingerol presente no gengibre (Stoilova et al., 2007) e as antocianinas da uva (Baydar, Özkan e Yaşar, 2007; Garcia-Alonso, Guidarelli e Periago, 2007; Luther et al., 2007).

1.3. Pele e seu envelhecimento

A pele é o maior órgão do corpo humano, compreendendo aproximadamente 5 % do seu peso total. Forma uma eficiente barreira permeável, que é constantemente renovada através de um processo biológico chamado queratinização (De Polo, 1998; Rubin e Viglioglia, 1989).

Além da proteção contra agressões ambientais, como temperatura e radiação UV, a pele tem, ainda, a função de prevenir a penetração de agentes nocivos, bem como evitar a perda de água. Excreta materiais sebáceos e suor através das glândulas sebáceas e sudoríparas, respectivamente, e controla a perda de fluidos, sais, hormônios e outros materiais endógenos. Participa da termoregulação do corpo através da evaporação de água pelas glândulas sudoríparas (Rawlings et al., 2008; De Polo, 1998).

A pele humana é constituída pela epiderme, derme e hipoderme, conforme demonstrado na Figura 3. A epiderme consiste em um epitélio multiestratificado, formada por estrato córneo, estrato lúcido, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa (Souza, 2003), que se renovam periodicamente. A estratificação é o resultado da mobilização dos queratinócitos da camada basal até a mais superficial (queratinização), que é continuamente formada pelo processo de mitose celular. Além dos queratinócitos, outras células estão presentes na epiderme: melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel.

A epiderme tem a sua função protetora através da queratina, uma proteína que cornifica a superfície da pele. É esta camada que serve como membrana permeável para as substâncias sólidas, líquidas e gasosas (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982).

O estrato córneo é a camada mais externa da pele, formada por fileiras de células mortas, anucleadas e constituídas por queratina, como ilustrado a seguir. As fileiras mais superficiais estão em processo de descamação contínua. O estrato lúcido é encontrado onde a pele é mais grossa, como a palma das mãos e a planta dos pés, sendo a camada mais profunda da capa córnea. É acidófila e compacta, rica em enzimas. Suas células não têm capacidade de divisão celular, mas detêm a função de sintetizar queratina.

A camada espinhosa, por sua vez, é constituída de várias fileiras de células unidas entre si através de desmossomos, ou seja, espessamentos da

membrana celular que se unem entre si pelo cimento intercelular. Entre as células espinhosas, encontram-se as células de Langerhans, que apresentam receptores para imunoglobina E em sua superfície e captam antígenos exteriores.

A última camada da epiderme é a basal ou germinativa, responsável por lhe dar suporte e estabelecer a união com a derme. Esta camada dá origem às camadas epidérmicas por reprodução continuada como já referido e nela estão os melanócitos, células que produzem a melanina, que é transferida para os queratinócitos através dos dendritos (Rubin e Viglioglia, 1989; Souza, 2003).

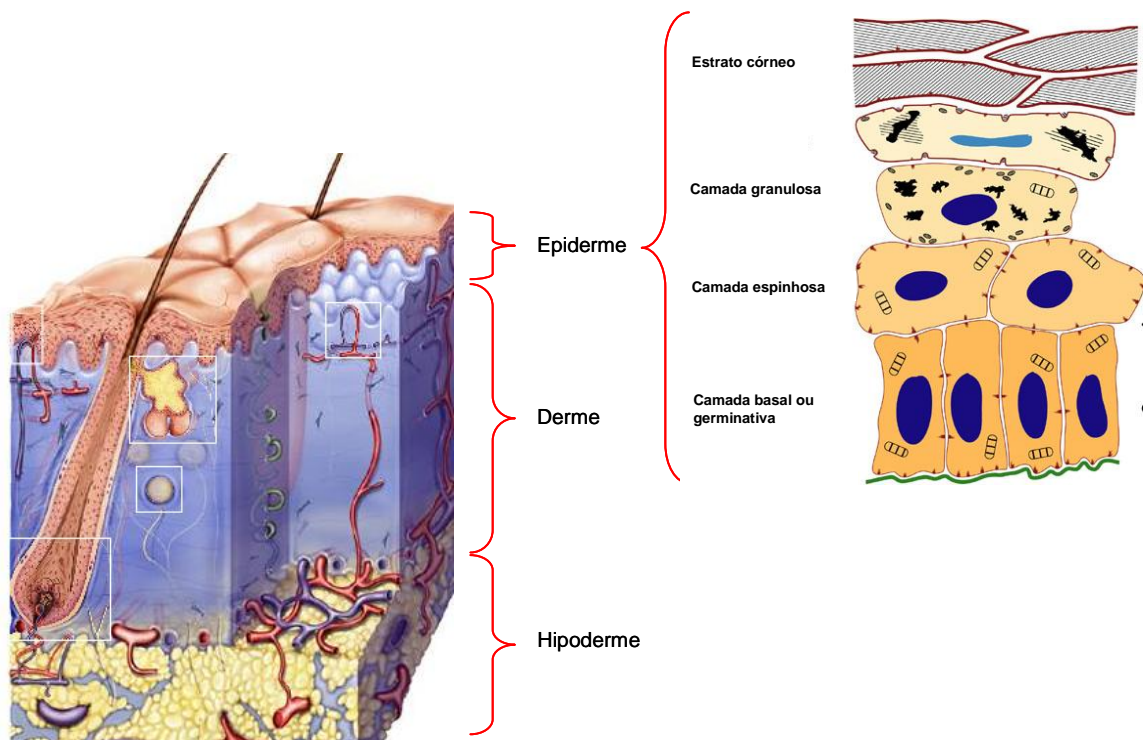


Figura 3 - Estrutura tridimensional da pele, demonstrando suas três camadas, epiderme, derme e hipoderme. Em destaque, estão as subcamadas da epiderme.

A junção derme-epiderme não é formada por um plano liso e, sim, por uma região ondulada composta por papilas que aumentam a superfície de contato entre a derme e a epiderme. Nesta região, há facilidade de difusão de nutrientes e fatores de crescimento (citocinas). No envelhecimento natural da

pele existe uma redução desta superfície de contato, tornando mais difícil a difusão de substâncias. Nesta junção, observa-se grande quantidade de proteínas, tais como laminina, colágenos IV, V e VII, glicoproteínas, além dos hemidesmossomos, regiões especializadas que ocorrem nas membranas adjacentes capazes de formar uma ponte entre duas células vizinhas, por onde se conectam os filamentos intermediários, gerando uma estrutura de grande força (Schaefer e Redelmeier, 1996).

A derme é um tecido fibroso (fibras colágenas, elásticas e reticulinas) e é mais espessa que a epiderme. Contém os apêndices de anexos cutâneos córneos (pêlos e unhas) e glandulares (glândulas sebáceas e sudoríparas), além da matriz extracelular que contém, entre outras substâncias, os glicosaminoglicanos (GAG). Esta camada também desempenha função protetora, constituindo-se na segunda linha de defesa contra traumatismos e, mantendo contato com o sistema vascular cutâneo, irriga a epiderme, um tecido avascular. Tipos celulares residentes na derme incluem fibroblastos, células endoteliais e mastócitos; em condições de inflamação ou cicatrização, macrófagos, linfócitos e neutrófilos também podem ser observados (Azulay e Azulay, 2006; Schaefer e Redelmeier, 1996).

Os fibroblastos são células fusiformes e estreladas, com núcleo volumoso e citoplasma claro, com retículo endoplasmático nítido e granular; têm grande ação enzimática, sendo responsáveis pela síntese e degradação das proteínas do tecido conectivo e de vários fatores solúveis que funcionam como mensageiros para a epiderme, vasos e outras células. Respondem a vários mediadores imunológicos, incluindo as interleucinas 1 (IL-1) alfa e beta, que estimulam a síntese de outras citocinas e proteínas (Azulay e Azulay, 2006). Os fibroblastos produzem colágeno, laminina, fibronectina, dentre outros componentes do tecido conectivo (Schaefer e Redelmeier, 1996). O colágeno, proteína amplamente distribuída nos tecidos conjuntivos, corresponde a aproximadamente 75 % do peso seco da derme, sendo que mais de 70 % refere-se ao colágeno do tipo I e, em torno de 15 %, ao colágeno do tipo III (Azulay e Azulay, 2006).

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), que compreendem uma família de aproximadamente vinte enzimas proteolíticas, são responsáveis pela degradação das macromoléculas da matriz extracelular, incluindo o

colágeno (Azulay e Azulay, 2006). Sua produção é regulada por diversos fatores, dentre eles os subprodutos da cascata oxidativa, citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios, hormônios e neuromediadores, estimulados, em parte, durante os processos de cicatrização de feridas, angiogênese, invasão tumoral, metástase e agressões extrínsecas, como por exemplo, ação da radiação UV (Mauch, Herron e Bauer, 2001).

Mais especificamente, as MMP são enzimas do tipo elastase, dependentes de zinco, reativas e inespecíficas, detectadas em diversos tipos celulares, incluindo monócitos, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos e neutrófilos, encontrando-se intimamente ligadas ao processo de degradação de fibras colagênicas e elásticas presentes na derme humana (Shin et al., 2008; Polte e Tyrrell, 2004; Rasoamanantena et al., 1993).

Sabe-se que a capacidade elastolítica depende do tipo celular e de sua origem; as MMP secretadas pelos fibroblastos, por exemplo, são capazes de hidrolisar praticamente todas as proteínas, incluindo as proteínas estruturais do tecido conjuntivo (Isnard et al., 2001; Lee et al., 1999). Por outro lado, as colagenases possuem certa especificidade e são capazes de reagir com um número limitado de substratos (Lee et al., 1999), conforme ilustrado na Tabela 1. A atividade de MMP é finamente regulada em três níveis principais: síntese via transcrição, ativação do zimogênio e inibição da atividade proteolítica por inibidores específicos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP).

De maneira similar às MMP, os TIMP são sintetizados por fibroblastos residentes na derme e atuam localmente, com a função específica de bloquear a atividade das MMP, prevenindo, desta forma, a digestão da matriz extracelular. Quatro TIMP foram descritos, dentre os quais TIMP-1 e TIMP-2 foram mais amplamente estudados. TIMP-1 é estimulado, em parte, por fatores de crescimento, enquanto TIMP-2 é expresso de forma constitutiva (Mattila et al., 1998).

Por fim, a hipoderme está situada logo abaixo da derme e, dentre as funções que desempenha, destaca-se sua ação como isolante do calor, conservando a temperatura corporal, e seu comportamento similar a uma verdadeira “almofada”, atuando no amortecimento de traumas. Ainda, a

hipoderme serve como reserva energética através do depósito de substâncias graxas (Rubin e Viglioglia, 1989; Wilkinson e Moore, 1982).

Tabela 1 - Principais metaloproteinases e seus substratos.

Enzimas	Substratos
MMP-1 (colagenase intersticial)	Colágenos I, II, III, VII e X
MMP-2 (gelatinase A)	Gelatina, colágenos I, IV, VII e XI, fibronectina, elastina e laminina
MMP-3 (estromelisina 1)	Gelatina, fibronectina, elastina, laminina, colágenos II, IV, IX e X e agrecanas
MMP-7 (matrilisina)	Agrecanas e fibronectina
MMP-8 (colagenase neutrofílica)	Colágenos I, II, III, proteínas de ligação e agrecanas
MMP-9 (gelatinase B)	Gelatina, colágenos IV, V, XIV, elastina e agrecanas
MMP-10 (estromelisina 2)	Agrecanas
MMP-11 (estromelisina 3)	Fibronectina
MMP-12 (metaloelastase macrofágica)	Elastina
MMP-13 (colagenase 3)	Colágenos I, II e III
MMP-14	Colágenos I, II, III e laminina
MMP-18 (colagenase 4)	Colágeno I

Adaptado de Rocquet e Bonté, 2002.

Com o avançar da idade, ocorrem modificações na pele e duas teorias principais foram estabelecidas para explicar o envelhecimento não só da pele, mas de todo o organismo. A primeira, que representa o envelhecimento cronológico ou intrínseco, envolve um processo pré-ordenado, geneticamente determinado. Suporte a esta teoria vem de experimentos com os telômeros, cuja porção terminal encurta a cada ciclo mitótico; quando esses telômeros alcançam comprimento crítico, as células ou param de se multiplicar ou entram em apoptose (Vaziri e Benchimol, 1996). Ainda, células de órgãos (explantes primários), quando transferidas para sistema de cultura, não conseguem proliferar indefinidamente (Campisi, 1996). A segunda teoria implica modificações acumulativas causadas por fatores externos (Yasui e Sakurai, 2003), principalmente as radiações UV, que representam o envelhecimento actínico ou fotoenvelhecimento (Seo e Chung, 2006).

O fotoenvelhecimento causa dano irreversível à pele e as principais conseqüências são as rugas profundas e extensas, além de perceptíveis alterações na pigmentação cutânea; cortes histológicos de uma pele fotoenvelhecida revelam um acúmulo de material elastótico na derme reticular, processo este denominado elastose solar (Lewis et al., 2004). Já o envelhecimento intrínseco é caracterizado por rugas suaves e finas sobre a pele e achados histológicos mostram que há diminuição da matriz extracelular e da população celular, redução na produção de elastina e desintegração das fibras elásticas (Seo e Chung, 2006).

Alterações e deficiências do colágeno, maior componente estrutural da pele, têm sido sugeridas como a causa principal da formação de rugas, tanto na pele fotoenvelhecida como naquela que sofreu apenas o processo natural de envelhecimento. Uma vez que fibras de colágeno e elastina são responsáveis pela força e resistência da pele, seu desarranjo durante a exposição solar, por exemplo, deixará a pele com aspecto envelhecido (Seo e Chung, 2006; Wulf et al, 2004).

Considerando-se as diferentes camadas da pele, sabe-se que a epiderme sofre algumas alterações súbitas, porém significativas, durante o processo de envelhecimento: há perda de 10 a 50 % de sua espessura entre as idades de 30 e 80 anos; ocorre atrofia principalmente na camada espinhosa; observam-se mudanças nas características das células germinativas (células tronco, por exemplo) presentes na camada basal; há achatamento evidente da junção derme-epiderme, ocasionando um decréscimo de aproximadamente 35 % de sua superfície de contato; ocorre, também, uma “discrasia epidermal”, na qual as células basais mostram-se heterogêneas em tamanho e aumentadas em número (Wulf et al., 2004).

Já na derme, dentre os fenômenos observados durante o envelhecimento, há a substituição progressiva das fibrilas normais por outras afiladas, degradadas e não-funcionais, gerando uma massa amorfa e homogênea; os fibroblastos adquirem atividades anormais, produzindo fibras de colágeno e elastina também anormais; observa-se, ainda, um decréscimo na atividade e no número de fibroblastos, com presença de infiltrados inflamatórios e alteração nos vasos sanguíneos; a proporção entre os colágenos tipos I e III, encontrados predominantemente nesta camada, altera-

se e provoca conseqüente enrijecimento da pele; a forma da derme papilar altera-se progressivamente sugerindo uma degradação de colágeno; a matriz extracelular – composta por glicosaminoglicanos e proteoglicanos - vai perdendo sua capacidade de retenção de água (Wulf et al., 2004).

Existem inúmeros fatores que contribuem para o processo de envelhecimento, como os genéticos (a idade de aparição e o número de cabelos brancos, localização e profundidade das rugas e precocidade das primeiras manifestações da idade estão codificados geneticamente), as condições ambientais (hábitos e costumes de diferentes países interferem no padrão de envelhecimento da população (Nouveau-Richard, 2005); as agressões ambientais (frio, baixa umidade, vento, agentes poluentes (Tahara, Matsuo e Kaneko, 2001; Kohen, 1999); os fatores nutritivos (carência de vitaminas A, E, C, e de oligoelementos como cobre, selênio, zinco); os fatores mecânicos (tração repetida dos músculos subcutâneos do rosto aprofunda as rugas); a carência de hormônios estrogênicos na mulher (acentua o envelhecimento da pele na menopausa (Seo e Chung, 2006) e as radiações UV, hoje tidas como as maiores responsáveis pelo fotoenvelhecimento (Shin et al., 2008; Seo e Chung, 2006; Polte e Tirrell, 2004).

Com o envelhecimento, o organismo humano tem o seu potencial de óxido-redução alterado e suas respostas imunes desreguladas, o que pode ocasionar o aparecimento de doenças crônicas degenerativas relacionadas à idade, como a doença de Parkinson e a de Alzheimer. Níveis de óxido-redução celulares baixos levam à ativação de fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B (Scandalios, 2005; Hu et al., 2000). Estes fatores são responsáveis pelo desencadeamento de diversos sinais extracelulares relacionados à inflamação, oncogênese e apoptose, processos que estão intimamente ligados ao envelhecimento (Hu et al., 2000; Kohen, 1999).

Sabe-se, também, que, com o passar dos anos, as atividades de diversas células e tecidos decaem, o que promove um desequilíbrio significativo entre a produção e a degradação, caracterizando-se o processo de senescência. Lee (1999) relata que há perda significativa de elasticidade da pele após a quarta década de vida. É descrito que a atividade da enzima SOD tende a decrescer com a idade, enquanto as atividades da catalase e da

glutathione peroxidase mantém-se inalteradas (Tahara, Matsuo e Kaneko, 2001).

Neste contexto, é citado que a expressão das MMP aumenta e, por conseqüência, a quantidade de colágeno é reduzida (Seo e Chung, 2006). As principais MMP presentes na pele, dos tipos 1, 2, 9 e 13, têm sua atividade aumentada durante o envelhecimento cronológico, podendo ser estimuladas também pela radiação UV (Mauch, Herron e Bauer, 2001; Rocquet e Bonté, 2002). Relata-se, ainda, que MMP dos tipos 1, 2 e 9 apresentam-se aumentadas em casos de tumores e metástases (Shin et al., 2008; Polte e Tyrrell, 2004; Demeule et al., 2000).

Inúmeros estudos estão sendo conduzidos com interesse na interação entre as MMP e seus possíveis inibidores. É proposta a aplicação de inibidores específicos na superfície da pele humana com o objetivo de se observar efeitos benéficos frente aos danos causados pela exposição à radiação UVA. A inibição destas enzimas por variados extratos botânicos tem sido avaliada, pois, considerando-se suas propriedades antioxidantes, busca-se encontrar substâncias efetivas no combate às rugas e ao envelhecimento (Lee et al., 1999).

Embora as características, efeitos e usos dos antioxidantes já tenham sido comentados anteriormente, é oportuno enfatizar a importância que certas substâncias, particularmente as vitaminas, possuem na prevenção do envelhecimento. A pele utiliza predominantemente a vitamina C para proteger o ambiente celular aquoso, enquanto o tocoferol, ou vitamina E, é útil na proteção das estruturas lipídicas, incluindo membranas. Em muitos sistemas biológicos, essas vitaminas atuam sinergicamente, pois quando a vitamina E é oxidada pelos RL, é regenerada na membrana pela vitamina C. Previamente já se tinha comprovado que a vitamina C aplicada topicamente reduz o fotodano produzido pelas radiações UVA e UVB. Recentemente, o papel crítico que o tocoferol desempenha na proteção antioxidante da bicamada lipídica e das proteínas do estrato córneo foi revisado (Lin et al., 2003).

Sabe-se que a vitamina E, independente da via de administração ser oral ou tópica, possui propriedades antitumorigênica, fotoprotetora e estabilizante de barreira. Avanços nos estudos dos mecanismos de ação, penetração, bioconversão e fotoproteção do tocoferol na pele humana têm

levado ao desenvolvimento de numerosas formulações de produtos cosméticos para tratamento cutâneo (Thiele e Ekanayake-Mudiyanselage, 2007).

Conforme Boyera (1998), o papel da vitamina C na promoção da vitalidade e homeostase cutâneas, bem conhecido há séculos, é o de promover a síntese da rede normal do colágeno por meio da manutenção das condições ideais para atuação das enzimas lisina e prolina hidroxilase. Além disso, a vitamina C atua como um cofator, prevenindo a oxidação do Ferro, evitando a auto-oxidação das enzimas citadas.

Além das enzimas antioxidantes produzidas pelo organismo, existe a melanina, um pigmento que confere proteção natural à pele frente às radiações UV. Produzida pelos melanócitos, células dendríticas localizadas na epiderme, a melanina é capaz de difundir e/ou absorver a radiação UV, além de captar os RL formados, minimizando assim os danos celulares. Vários fatores influenciam na melanogênese, como a nutrição (especialmente ingestão de metais, aminoácidos e vitaminas), fatores endócrinos e, adicionalmente, o envelhecimento cronológico, no qual se percebe claramente uma produção irregular de melanina, bem como a distribuição heterogênea desta na pele, causando manchas visualmente perceptíveis (Rubin e Viglioglia, 1989).

Sabendo-se que, com o passar dos anos, a proteção conferida pela melanina torna-se deficiente e que a produção de enzimas antioxidantes endógenas, principalmente a SOD, encontra-se reduzida, torna-se importante conhecer o potencial de agentes externos (p.ex.: radiações UV) para que se possa prevenir a pele e o organismo contra efeitos indesejáveis a eles relacionados.

1.4. Radiação UV e seus efeitos

Sabe-se que o sol consiste em uma fonte de energia fundamental para a sobrevivência do homem e demais seres vivos, participando, direta ou indiretamente, da maioria dos ciclos biológicos, através da luz visível, radiação infravermelha e UV por ele emitidas (Cruz, 2005).

Quando em contato com a pele humana, a radiação UV presente nos raios solares apresenta efeitos benéficos, como a ativação da pró-vitamina D₃ para posterior síntese de vitamina D, a qual auxilia na prevenção de raquitismo em crianças e da osteoporose em adultos (Gold, 2007; Stary, Robert e Sarasin,

1997). É útil, também, no tratamento de doenças cutâneas, como acne, psoríase, eczemas e vitiligo, através da terapia fotodinâmica, que utiliza tanto a radiação UVA quanto a UVB, com resultados terapêuticos satisfatórios (Munavalli e Weiss, 2008; Gold, 2007; Asawanonda e Nateetongrunsa, 2006). Por outro lado, há uma documentação vasta e crescente com relação a efeitos nocivos provocados pela exposição descuidada às radiações UV, particularmente com referência ao envelhecimento precoce.

A exposição da pele humana normal à radiação UV resulta em inúmeras mudanças na derme, como eritema, envelhecimento e, até mesmo, câncer (Polte e Tyrrell, 2004). Altas doses de UVA induzem peroxidação lipídica em membranas de fibroblastos humanos, o que resulta em propagação do dano oxidativo celular e desencadeamento de outros processos como, por exemplo, liberação de MMP-1 (Shin et al., 2008; Polte e Tyrrell, 2004).

Recentemente sugeriu-se que, em decorrência do fotoenvelhecimento, há excessiva produção de MMP de matriz, contribuindo substancialmente para que ocorra dano ao tecido conjuntivo (Shin et al., 2008; Seo e Chung, 2006; Polte e Tyrrell, 2004). A radiação UV induz, à princípio, aumento da produção de MMP-1, a qual atua principalmente na degradação do colágeno e, secundariamente, na síntese e secreção de MMP-2, -3 e -9 na derme; estas MMP irão agir na alteração do colágeno após a ação da MMP-1 (Lee, Chung e Cho, 2005). É descrito, ainda, que a radiação UVB induz a produção de MMP-1, -3 e -9 em células normais de epiderme humana *in vivo* e a radiação UVA é conhecida por induzir a expressão de MMP-1 em fibroblastos dermais *in vivo* e expressão de MMP-1, -2 e -3 em cultura (Seo e Chung, 2006).

Demonstrou-se que o oxigênio singlete gerado após exposição à radiação UV pode funcionar como um mediador inflamatório pela produção de IL-1 e IL-6 (Polte e Tyrrell, 2004). Descreve-se, ainda, que a exposição à radiação UVA torna os processos inflamatórios mais recorrentes na derme, o que acentua ainda mais as conseqüências da ação das MMP (Lee et al., 1999).

A luz do sol é composta por um espectro magnético contínuo dividido em três partes principais: luz UV (45 %), visível (5 %) e infravermelho (50 %). Por sua vez, a luz UV divide-se em UVA, UVB e UVC, de acordo com o seu comprimento de onda (Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Latonen e Laiho, 2005).

A radiação UVA é a que mais nos atinge (cerca de 95 %) e que mais penetra na pele, conforme pode-se observar na Figura 4. É responsável pelo bronzeamento imediato, o qual é causado pelo escurecimento da melanina na epiderme. Seu excesso pode causar queimaduras em peles sensíveis e danificar estruturas da derme, causando o envelhecimento cutâneo prematuro (Jung et al., 2008; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Hazane et al., 2005).

Conforme já citado, os sinais de fotodano mais comuns incluem alteração da espessura da pele, elastose dermal, fragmentação das fibras colágenas, aumento de MMP e aparecimento de infiltrados inflamatórios (Yaar e Gilchrest, 2007; Afaq e Mukhtar, 2006). Esta radiação é, ainda, capaz de induzir a formação de RL, os quais podem danificar proteínas, lipídeos e sacarídeos como anteriormente referido (Kaur, Kapila e Agrawal, 2007; Kochanek et al., 2000). Além disso, a exposição prolongada à radiação UVA altera a permeabilidade de vasos sanguíneos, desregula o sistema imune, causa danos ao ADN, podendo levar também ao câncer (Lübeck, 2008; Yaar e Gilchrest, 2007; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006).

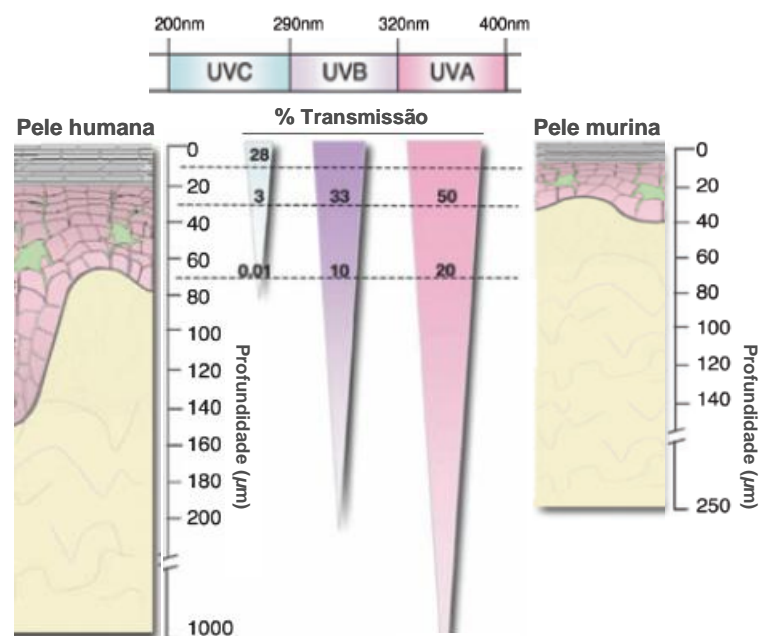


Figura 4 - Penetração dos diferentes tipos de radiação UV em peles humana e murina. Embora haja diferença significativa entre a espessura dos dois tipos de pele, percebe-se que as radiações UVA e UVB são capazes de penetrar e afetar células diferenciadas do estrato córneo, camadas intermediárias e camada germinativa das peles humana e murina. A radiação UVC, extremamente reativa, não chega à superfície terrestre. Adaptado de Timares et al., 2008.

A radiação UVB é menos penetrante que a UVA, porém é mil vezes mais potente em ocasionar queimaduras na pele (Mahmoud et al., 2008; Herrling, Jung e Fuchs, 2006; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006). Pode danificar o ADN, uma vez que é absorvida pelos anéis aromáticos desta molécula e, se não houver reparação eficiente, pode ocasionar mutações nas bases que o compõem. A radiação pode, também, gerar estresse oxidativo, ocasionado pelo aumento na produção de RL, o que pode levar à lipoperoxidação e mais danos diretos ao ADN (Latonen e Laiho, 2005).

Esses eventos, quando associados, podem resultar em fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (Kaur, Kapila e Agrawal, 2007; Afaq e Mukhtar, 2006; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Latonen e Laiho, 2005). É imprescindível enfatizar que os casos de câncer de pele estão aumentando consideravelmente nos últimos anos devido à exposição exacerbada aos raios solares (Olds et al., 2008; Timares, Katiyar e Elmets, 2008; Emri, Horkay e Remenyik, 2006; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Poon, Barnetson e Halliday, 2003).

A radiação UVC, por sua vez, apesar de ser altamente tóxica e mutagênica, é absorvida e neutralizada na estratosfera, não chegando à superfície da Terra. Sabe-se que o grau de injúria celular e tecidual das radiações depende de inúmeras variáveis como o comprimento de onda, a dose e as próprias características do alvo biológico afetado (Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006).

Como bem representado no esquema da Figura 5 e recentemente revisado por Rabe e colegas (2006), as radiações UV causam efeitos relevantes, diretos e indiretos, na matriz extracelular e, pela sua importância no contexto deste trabalho, serão mais detalhados a seguir.

Evidências acumuladas em estudos *in vitro* indicam que as radiações UV mimetizam as ações de ligantes de receptores via geração de ERO. Neste sentido, quinze minutos de exposição à radiação UV são suficientes para ativar, em queratinócitos e fibroblastos, os receptores do fator de crescimento epidermal (EGF), da IL-1 e do fator de necrose tumoral (TNF- α). Acredita-se que as ERO oxidam e, simultaneamente, inibem fosfatases tirosina-quinases que têm a função de diminuir a expressão desses receptores. A expressão exacerbada desses receptores levaria à ativação de quinases transmissoras de

sinais por toda a pele, incluindo o fator de transcrição nuclear denominado Proteína Ativadora 1 (AP-1), cuja ativação é dependente de ferro e é responsável pela transcrição de várias MMP da matriz extracelular, incluindo as MMP-1, -3 e -9, cuja expressão ocorre em queratinócitos epidérmicos e fibroblastos dermais. Acredita-se que a presença de ERO, portanto, contribua diretamente com o dano oxidativo do tecido, como também interfira nos mecanismos de transmissão de sinais celulares envolvidos na expressão de genes que regulam o metabolismo do colágeno.

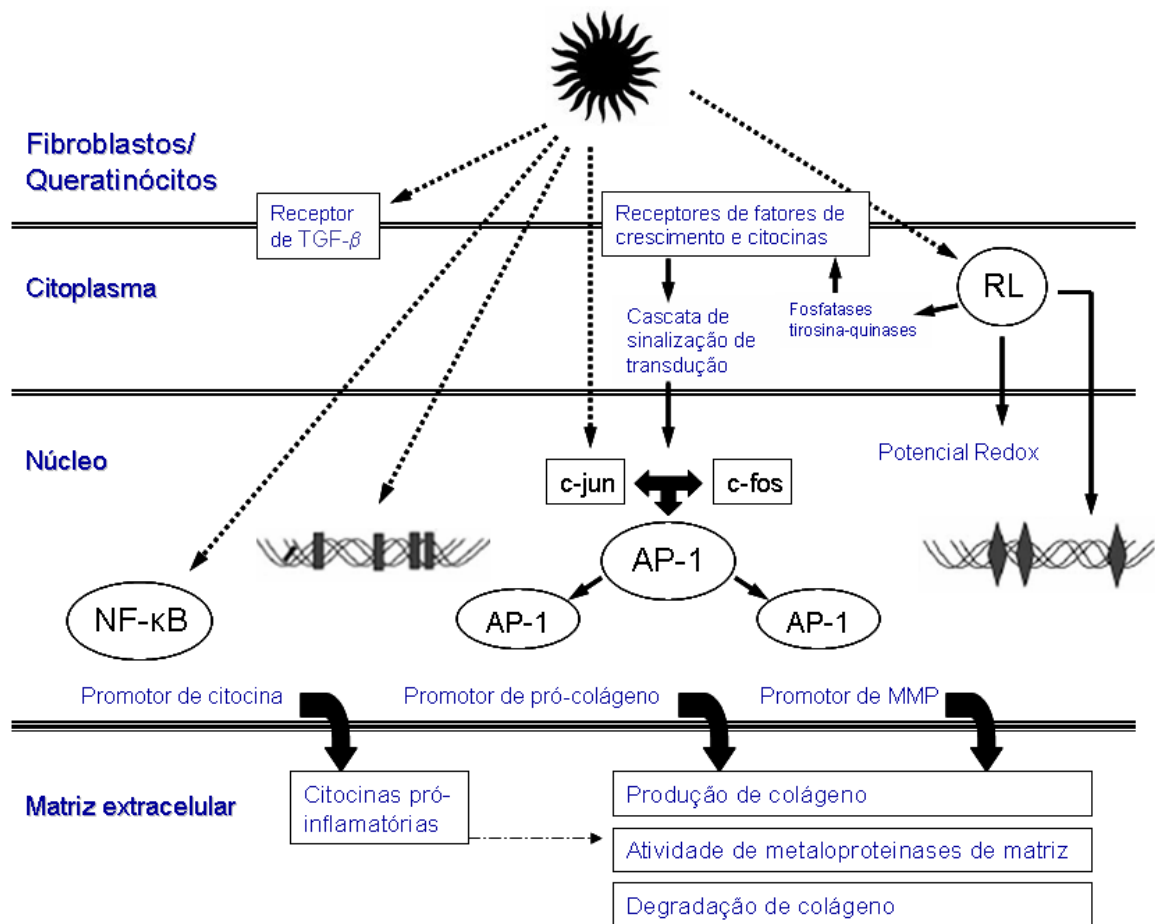


Figura 5 - Efeitos da radiação UV em queratinócitos e fibroblastos. A radiação UV provoca eventos biológicos no citoplasma, núcleo e matriz extracelular, causando danos em células epidermais e dermais, cujos mecanismos estão detalhados no texto. Adaptado de Rabe et al., 2006.

Da mesma forma, a radiação UV ativa o fator de transcrição NF-κB por um mecanismo independente de ferro, o qual estimula a transcrição de

citocinas inflamatórias, as quais, por sua vez, promovem a migração de leucócitos para a pele, particularmente neutrófilos, que são ricos em colagenase (MMP-8). Interessante observar que este fator estimula a expressão de MMP-9 numa dose de radiação UV muito inferior à necessária para desenvolver eritema (Fisher et al., 1996). Ainda, parece haver relação dose-resposta entre a exposição à luz UV e a indução da síntese de MMP, no contexto de que uma exposição insuficiente para causar queimadura na pele é suficiente para facilitar a degradação de seu colágeno, contribuindo com o envelhecimento. Exposições de cinco a quinze minutos ao sol do meio-dia em dias alternados são suficientes para manter os níveis de MMP elevados.

A pele envelhecida tem uma produção de colágeno reduzida. Na exposição à luz UV, a quantidade de pró-colágeno reduz-se drasticamente, tornando-se inclusive ausente após 24 horas da exposição *in vivo* e tanto AP-1 quanto TNF- β parecem estar envolvidos neste processo.

AP-1 compõe-se de duas subunidades, c-Fos, constitutivamente expressa, e c-Jun, induzida pela luz UV. A indução de expressão exacerbada da unidade c-Jun em cultura de fibroblastos por radiação UV leva à diminuição da expressão de colágeno tipo I; em contraste, observa-se diminuição dos níveis de TGF- β e de seu receptor, tanto na derme como na epiderme, o qual é um promotor da síntese de colágeno. Observou-se que quando fibroblastos da derme são expostos ao colágeno tipo I previamente degradado por MMP, *in vitro* (Varani et al., 2002) ou *in vivo* (Fligiel et al., 2003), ocorre diminuição da síntese de pró-colágeno I, indicando que o colágeno danificado pela radiação UV pode atuar como um inibidor de sua própria síntese.

Conforme já citado, o fotoenvelhecimento é a sobreposição do dano induzido pela exposição crônica à radiação UV ao envelhecimento intrínseco já programado, o que acentua os danos à pele, deixando-a menos firme, menos elástica, com mais rugas e manchas, menos hidratada e mais susceptível a irritações (Jung et al., 2008; Yaar e Gilchrest, 2007; Kochanek et al., 2000).

1.5. Extratos vegetais

Há um crescente interesse em construir múltiplas estratégias de defesa para proteger a pele do estresse oxidativo gerado pelas radiações. Dentre elas, podem ser citadas a proteção cutânea com filtros solares estáveis de ação

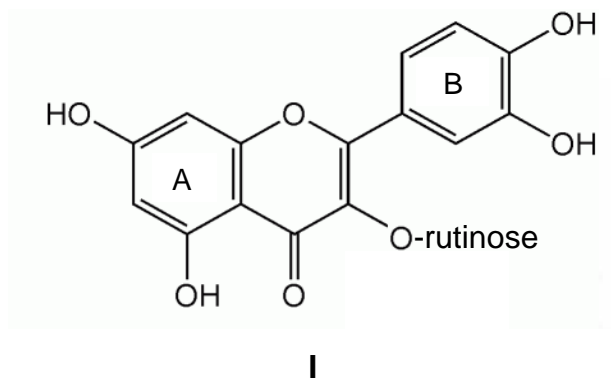
ampla (UVA e UVB), a utilização de roupas adequadas e exposição ao sol somente em horários de menor intensidade de radiação (Palm e O'Donoghue, 2007; Ting, Vest e Sontheimer, 2003), bem como a reposição adequada de substâncias antioxidantes, sejam vitaminas ou compostos naturais presentes em espécies vegetais em geral (Kaur, Kapila e Agrawal, 2007).

De acordo com Hostettman e Terreaux (2000), há aproximadamente 400.000 espécies de plantas superiores espalhadas pelo mundo, produzindo metabólitos secundários de natureza química diversa, o que representa uma possibilidade de descoberta de novos e importantes agentes antioxidantes de origem vegetal (Mosquera et al., 2007).

O uso de medicina alternativa tem crescido de forma expressiva, principalmente quanto à utilização de suplementos orais e tópicos baseados em combinações dermatológicas de ingredientes botânicos (Baumann, 2007). Vários compostos isolados de plantas e vegetais, de estrutura química distinta, promovem ação antioxidante, em potencial aqueles que possuem, na sua estrutura, um grupamento fenólico, como por exemplo os taninos (Demirezer et al., 2001, Lin, Hsu e Lin, 2001; Gil et al., 2000), cumarinas (Kontogiorgis e Hadjipavlou-litina, 2003; Fabre et al., 2000) e antraquinonas (Demirezer et al., 2001).

Na última década, especial atenção foi dada ao potencial antioxidante dos flavonóides, os quais compõem o maior grupo de plantas com atividades biológicas, com mais de 5.000 representantes já extraídos e identificados (Arct e Pytkowska, 2008). São destacadas, ainda, suas propriedades anticarcinogênica e protetora do ADN (Hadi et al., 2007; Khan e Mukhtar, 2007), antiviral e antibacteriana (Hanasaki, Ogawa e Fukui, 1994), além da associação com a redução do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Burns et al., 2000) e do envelhecimento precoce (Yamamoto, 2001).

O termo flavonóide engloba um grupo de compostos fenólicos com estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado, representado abaixo pela rutina (I) (Filho, Silva e Boveris, 1999). As propriedades antiradicalar e quelante de metais desempenhadas pelos flavonóides são devidas à sua estrutura polifenólica, com vários radicais hidroxila, que apresentam grande habilidade de doar elétron e hidrogênio (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002).



Vários extratos vegetais contendo quantidades padronizadas de substâncias polifenólicas - sejam flavonóides, catequinas e/ou ácidos fenólicos – e disponíveis comercialmente têm sido amplamente utilizados nas áreas farmacêutica e cosmética com finalidades particularmente voltadas à prevenção e/ou combate do envelhecimento precoce (Katiyar e Elmets, 2001; Lupo, 2001). Dentre esses, destacam-se aqueles preparados do chá-verde, erva-mate, girassol, *Ginkgo biloba*, gengibre, uva e artemísia.

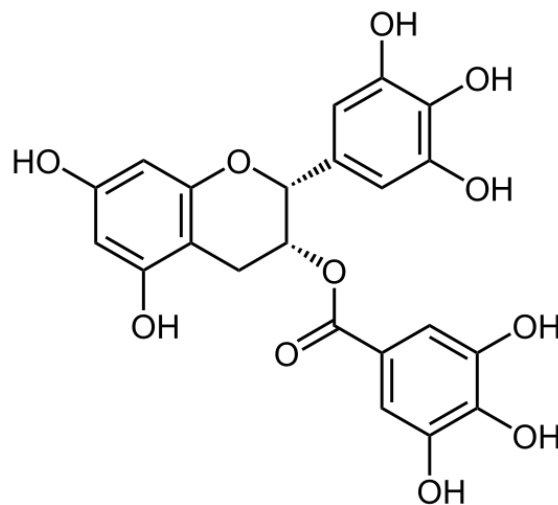
1.5.1. *Camellia sinensis*

O consumo de chás e bebidas preparadas a partir de folhas de *C. sinensis* (família Theacea) é conhecido há, pelo menos, 50 séculos. Os chás da *Camellia sinensis* podem ser obtidos por não fermentação (chá-verde), fermentação completa (chá-preto) e semifermentação (Chen et al., 2007). O chá-verde, conhecido também como chá-da-índia e chá-da-china, é a segunda bebida mais consumida no mundo, só perdendo para a água (Khan e Mukhtar, 2007; Afaq e Mukhtar, 2006).

As folhas não fermentadas da *C. sinensis* possuem proteínas, ácido ascórbico, cafeína, teofilina, teobromina, ácido cafeico, óleos voláteis, vitaminas do complexo B, taninos, saponinas, além de polifenóis na forma de monômeros de flavonóis (catequinas), flavononas, catecóis, epicatecóis livres e esterificados pelo ácido gálico (Chen, Zhang e Xie, 2005; Wei et al., 1999). A quantidade de polifenóis presentes na planta varia de 20 a 40 %, dependendo da subespécie da planta e de sua localização geográfica (Hsu, 2005). Dentre

as catequinas presentes no chá-verde, as mais conhecidas são a (-) epicatequina (EC), a (-)epigallocatequina (EGC), a epicatequina-3-galato (ECG) e a epigallocatequina-3-galato (EGCG) (II), com destaque para esta última, a qual é encontrada em maior quantidade e está relacionada a inúmeras atividades biológicas, dentre elas o tratamento de patologias neurodegenerativas, como o Mal de Parkinson e o de Alzheimer (Guo et al., 2007; Weinreb, Amit e Youdim, 2007; Wei et al., 1999).

Estudos científicos têm demonstrado que os polifenóis do chá-verde são eficientes antioxidantes tópicos, moduladores de diferentes grupos de genes e estão intimamente relacionados com a transdução de sinais, além de conferir proteção significativa contra os danos causados pela radiação UV (Yoo et al., 2008; Yusuf et al., 2007; Bixby et al., 2005; Hsu, 2005; Ting, Vest e Sontheimer, 2003).



II

Os efeitos de fotoproteção observados nos polifenóis do chá-verde, principalmente na EGCG, podem ser mediados por estimulação e melhora do sistema endógeno de defesa antioxidante, prevenção de fotodano de macromoléculas (ADN, proteínas e/ou lipídeos) e inibição de caminhos de sinais de transdução responsáveis por inflamação e pela manutenção da homeostase da matriz extracelular (Wu et al., 2009; Coimbra et al., 2006;

Vayalil, Elmets e Katiyar, 2003; Riso et al., 2002). Dentre os caminhos de sinais de transdução mais alterados pelos polifenóis do chá-verde são citados a regulação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (Yusuf et al., 2007). É bem descrita, ainda, a capacidade dos polifenóis do chá-verde em inibir as MMP da matriz extracelular, com consequente efeito antienvhecimento (Vayalil et al., 2004; Annabi et al., 2002; Demeule et al., 2000).

O grande interesse no estudo do chá-verde como agente quimioprotetor no câncer de pele é baseado em vários estudos epidemiológicos que sugerem o potencial anticarcinogênico deste em outros órgãos como pulmão, mama, estômago, cólon, dentre outros (Khan e Mukhtar, 2007; Yusuf et al., 2007; Pinnell, 2003). Acredita-se que os mecanismos de ação anticarcinogênica dos polifenóis de chá-verde estejam relacionados com a ação antioxidante, inibição da expressão de oncogenes e indução da apoptose (Pinnell, 2003; Alexis, Jones e Stiller, 1999). As propriedades protetoras do chá-verde contra o processo de fotocarcinogênese vêm sendo descritas, com a caracterização de mecanismos relacionados à resposta imune do organismo e controle do processo de angiogênese (Farris, 2007; Katiyar, Elmets e Katiyar, 2007).

1.5.2. *Ilex paraguariensis*

Popularmente conhecida como mate ou chimarrão, a *I. paraguariensis* (família Aquifoliaceae) é utilizada na medicina alternativa de vários países da América do Sul e, mais recentemente, tem ganhado também popularidade na América do Norte. Consumida há séculos, é muito utilizada por suas propriedades estimulantes, diuréticas e adjuvantes no processo de perda de peso (Lunceford e Gugliucci, 2005).

As folhas de mate possuem, em sua composição, alcalóides, flavonóides, vitaminas, taninos, ácido clorogênico e saponinas; o nível de polifenóis é maior do que aquele encontrado no chá-verde e no vinho tinto (Lunceford e Gugliucci, 2005). Quanto às suas propriedades biológicas, já foi demonstrado que a *I. paraguariensis* apresenta elevado potencial antioxidante (Bastos et al., 2006; Bixby et al., 2005; Filip et al., 2000), além de atividade antienvhecimento, mediada através da inibição do processo de glicação (Lunceford e Gugliucci, 2005).

1.5.3. *Helianthus annuus*

Conhecido popularmente como girassol, o óleo de *H. annuus* (família Asteraceae) possui ácidos graxos responsáveis por várias ações biológicas, dentre elas o potencial antioxidante. Sua estabilidade é intermediária e depende do pH e da temperatura (Arabshahi-D, Devi e Urooj, 2007). Em extratos glicólicos de sementes de girassol são encontrados inúmeros polifenóis, os quais podem agir capturando RL (Gallego, Benavídes e Tomaro, 1996).

Foi descrito que, em resposta à exposição a doses controladas de radiação UV, os cotilédones de girassol são capazes de aumentar a produção de substâncias antioxidantes solúveis (p.ex.: glutathiona reduzida), bem como enzimas endógenas (p.ex.: catalase), caracterizando sua capacidade de responder efetivamente contra agressores externos (Costa, Gallego e Tomaro, 2002).

1.5.4. *Ginkgo biloba*

Estudos demonstram que, na Ásia, o *G. biloba* (família Ginkgoaceae) e seus derivados continuam a ser consumidos com o propósito de se obter vitalidade e bem-estar. Comprovadamente, o *Ginkgo* pode desempenhar funções anticarcinogênica, neuroprotetora, antiinflamatória, antienvhecimento, além de promover a melhora da circulação sanguínea e da condição cerebral (Ramassamy, 2006; Goh e Barlow, 2002; Chaudiere e Ferrari-iliou, 1999). Estudos relatam, ainda, que o *G. biloba* é capaz de proteger o organismo contra efeitos deletérios ocasionados por radiação UV através da redução do estresse oxidativo (Sener et al., 2006). A ação anticarcinogênica deve-se a uma série de fatores, apresentando atividade comprovada contra os RL, indução de apoptose de células cancerígenas, recuperação do ADN danificado e sinergia com a radio/quimioterapia (Eli e Fasciano, 2006). Foi evidenciado, ainda, que extratos etanólicos de folhas de *Ginkgo* são potencialmente antioxidantes por causa da alta concentração de rutina e quercitina (Silva et al., 2005; Goh e Barlow, 2002). Sabe-se, também, que nas folhas desta planta podem ser encontradas altas concentrações de flavonóides, terpenos e ácidos fenólicos (Goh e Barlow, 2002).

1.5.5. *Zingiber officinale*

O *Z. officinale* (família Zingiberaceae), também chamado de gengibre, é utilizado como especiaria há mais de 2.000 anos. Suas raízes e os compostos fenólicos delas obtidos (gingerol e seus derivados) apresentam elevada atividade antioxidante. É bem descrito o efeito estimulante do gengibre na digestão, reforçado recentemente pela atuação nos sucos intestinais, facilitando a digestão de gorduras (Stoilova et al., 2007).

São conhecidas inúmeras indicações tradicionais do *Z. officinale*, dentre elas, o uso em gripes e resfriados, em desordens digestivas, disfunções hormonais e no reumatismo. Possui, ainda, atividades antiinflamatórias, analgésicas, anticarcinogênicas (Lee et al., 2008) como quimioprotetor, cardiotônicas, além de inibir a agregação plaquetária (Manju e Nalini, 2005).

1.5.6. *Vitis vinifera*

A *V. Vinifera*, popularmente conhecida como uva (família Vitaceae), é uma das frutas mais cultivadas no mundo, sendo utilizada milenarmente na produção de vinhos. Recentemente, tornou-se popular por ser fonte nutricional de substâncias antioxidantes (Baydar, Özkan e Yaşar, 2007; Garcia-Alonso, Guidarelli e Periago, 2007; Luther et al., 2007), principalmente flavonóides e antocianinas (Orak, 2007). Dentre os componentes polifenólicos da uva, destaca-se o resveratrol, o qual tem demonstrado ações antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais, antienvhecimento e anticarcinogênica (Iacopini et al., 2008).

Diversas são as atividades de seus componentes, que incluem a inibição de MMP-2, -9 e -12 (Demeule et al., 2000), como citoprotetora (Garcia-Alonso, Guidarelli e Periago, 2007; Iwasaki, Matsui e Arakawa, 2004), antienvhecimento (Rho e Kim, 2006; Sangeetha et al., 2005) e antimicrobiana (Luther et al., 2007). Encontram-se relatadas também as propriedades quemopreventivas e terapêuticas dos polifenóis no tratamento do câncer por meio da proteção do ADN (Baumann, 2007; Hadi et al., 2007; Tomaino et al., 2006; Carini et al., 1998).

1.5.7. *Artemisia umbelliformis*

A *A. umbelliformis* (família Asteraceae), conhecida popularmente como artemísia, é rica em flavonóides e possui inúmeros relatos de indicações tradicionais para problemas cardiovasculares, regeneração de tecido conjuntivo, aparência da pele, sistema imune, câncer e até arterioesclerose (Liu et al., 2004). Ainda, são destacadas na literatura suas atividades antibacterianas (Juteau et al., 2002), antioxidantes (Liu et al., 2004; Juteau et al., 2002), citoprotetora e antitumoral (Efferth et al., 2007).

1.6. Métodos analíticos

1.6.1. Métodos químicos

Considerando os diversos benefícios antioxidantes decorrentes do consumo, associados às atividades farmacológicas promovidas pelas plantas, é cada vez maior a busca de componentes de origem vegetal pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Entretanto, até o momento, a atividade antioxidante de uma substância não pode ser mensurada diretamente, mas através dos seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado. A maioria desses métodos usa processos oxidativos, que envolvem a adição de um agente iniciador, como a temperatura, agitação ou uma pressão parcial de O₂, um metal de transição ou mesmo exposição à luz, para acelerar o processo e uma fonte específica de RL. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação, ou sua extensão, medido adequadamente (Laguerre et al., 2007; Antolovich et al., 2002).

Muitos métodos e modos de se expressar a atividade antioxidante de extratos obtidos de plantas e vegetais têm sido utilizados, onde o efeito de várias concentrações é comparado ao efeito exercido por uma substância de referência, como as vitaminas C ou E, ou mesmo um composto natural, como a quercitina e a rutina (Buenger et al., 2006; Antolovich et al., 2002).

O DPPH*, ou 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando a difenilpicril hidrazina (Koleva et al., 2002). Esta reação de redução pode ser acompanhada espectrometricamente em 518 nm, pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança da coloração violeta

escura original da solução para amarela, descorando à medida que a reação com a solução teste se processa. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH[•] residual, mensurado após certo tempo, corresponde inversamente à capacidade antioxidante da substância analisada (Mensor, 2001).

O método do DPPH[•] mostra-se como uma alternativa rápida, pois ocorre em aproximadamente trinta minutos, de custo praticável por utilizar reagentes acessíveis e por não necessitar de equipamentos sofisticados. Além disso, neste método, a eficiência antioxidante é mensurada em temperatura ambiente, eliminando-se o risco potencial de degradação térmica de algumas das substâncias analisadas (Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto, 1998; Bondet, Brand-Williams e Berset, 1997; Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995).

Já o ensaio do fosfomolibdênio baseia-se na redução do Mo⁺⁶ para Mo⁺⁵, com subsequente formação de um complexo fosfato-Mo⁺⁵, distinto por sua coloração verde em pH ácido, com absorção máxima em 695 nm (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999). Em contraste com o método do DPPH[•], esta reação se processa em temperatura elevada e por tempo prolongado (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

1.6.2. Métodos biológicos

Dentre os vários métodos utilizados para avaliação da viabilidade celular, há aqueles que utilizam corantes capazes de reagir com diferentes estruturas das células. Especificamente para corar um ADN viável, pode-se utilizar o cristal violeta, com posterior quantificação por espectrofotometria. Neste teste, promove-se lesão controlada em células mantidas em condições ideais de cultivo *in vitro* após terem sido previamente expostas ao agente em estudo, com posterior verificação da capacidade protetora celular (Saotome, Morita e Umeda, 1989).

Conforme já citado, durante o envelhecimento, a perda de tecido ocorre principalmente como resultado do desequilíbrio entre a ativação e a inibição da atividade proteolítica (Isnard et al., 2002; Lahmann et al., 2001). Sabe-se, ainda, que enzimas do tipo elastase têm sido detectadas em diversos tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos, fibroblastos, condrócitos e até

neutrófilos, principalmente após contato com injúrias como radiação UV, infecções, agentes químicos, dentre outros. Dentre as proteases envolvidas, endopeptidases do tipo elastase desempenham um papel importante (Homsy et al., 1989; Robert, 1988), sendo que esta classe de enzimas compreende a maioria das metaloproteinases presentes na pele, principalmente as MMP-1,-2,-9 e -13 (Shapiro, 1998; Isnard et al., 2002).

Muitos avanços têm sido feitos nesta área, uma vez que inúmeras técnicas podem ser usadas, isolada ou conjuntamente, para observação dos efeitos relacionados à produção de metaloproteinases. Utilizando-se zimografia, PCR-RT, citometria de fluxo, “Western Blot” ou Elisa, pode-se evidenciar claramente o efeito de extratos, radiação UV, agentes químicos e até medicamentos sobre estas enzimas, tão importantes e relacionadas com inúmeros processos metabólicos (Shin et al., 2008; Buechner et al., 2008; Lee, Chung e Cho, 2005; Isnard et al., 2005; Polte e Tyrrell, 2004).

Ainda, as enzimas antioxidantes SOD e CAT, que compõem o sistema de defesa endógeno do organismo humano, apresentam redução de sua atividade com o passar da idade, o que pode gerar um desequilíbrio oxidativo em células e tecidos. Sabe-se, ainda, que há uma depleção destas enzimas após insultos agudos externos, como, por exemplo, a radiação UV, contribuindo ainda mais para com o desequilíbrio oxidativo (Shin et al., 2008; Seo e Chung, 2006; Polte e Tyrrell, 2004).

Assim, no presente trabalho, procurou-se estudar a relação entre a atividade antioxidante de vários extratos de plantas tradicionais e sua capacidade de proteger linhagens celulares contra danos oxidativos. Para tanto, utilizou-se uma associação de metodologias baseadas em sistemas *in vitro* e, quando possível, buscou-se esclarecer os mecanismos de ação envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo

Investigar as propriedades antioxidantes de extratos de *Camellia sinensis* (chá-verde), *Ginkgo biloba*, *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Helianthus annuus* (girassol), *Vitis vinifera* (uva), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Artemisia umbelliformis* (artemísia) e observar sua relação com atividades antienvhecimento.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante de extratos comerciais de chá-verde, *Ginkgo*, erva-mate, girassol, uva, gengibre e artemísia usando os métodos do DPPH[•] e do complexo fosfomolibdênio;
- ✓ Selecionar os três extratos que apresentarem atividade antioxidante mais significativa e avaliar seus efeitos sobre fibroblastos murinos McCoy;
- ✓ Avaliar a capacidade protetora dos extratos selecionados contra os efeitos induzidos pela radiação UV e pelo H₂O₂ sobre fibroblastos murinos McCoy;
- ✓ Avaliar a capacidade protetora dos extratos selecionados sobre fibroblastos dérmicos humanos normais submetidos à radiação UV;
- ✓ Avaliar a influência dos extratos selecionados sobre a atividade de metaloproteinases em fibroblastos dérmicos humanos normais submetidos à radiação UV;
- ✓ Avaliar a influência dos extratos selecionados sobre a atividade de enzimas antioxidantes em fibroblastos dérmicos humanos normais submetidos à radiação UV;
- ✓ Comparar os resultados dos extratos de chá-verde hidroglicólico, obtido comercialmente, e fluido, preparado farmacopeicamente, em todos os ensaios realizados;
- ✓ Estabelecer a relação entre o potencial antioxidante dos extratos selecionados com os efeitos sobre parâmetros relacionados ao envelhecimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck ou Sigma, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água obtida pelo sistema MiliQ. As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas por (1) calor úmido (121 °C, 30 min, 1 atm) ou (2) filtração (filtros com poros de 0,22 µm – Sterifill, Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente - TA, 4 a 8 °C ou a -25 °C), ao abrigo de luz, conforme indicado. Os ensaios realizados em condições de esterilidade foram manipulados em câmara de fluxo laminar vertical TROX, modelo FLVQ TAM 12.

3.1. Soluções

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150 mM), Na_2HPO_4 (150 mM) e NaCl (154 mM) em água. Após ajuste do pH para 7,2–7,4 com solução de NaOH 1 N, procedeu-se a esterilização em autoclave e armazenamento a 4 – 8 °C.

Solução de azul de Trypan a 0,4%

Azul de Trypan em pó (0,4 g) foi diluído em 100 ml de PBS.

Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

RPMI 1640 (Himedia, Japão) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante para preparo de um litro e suplementado com 2,25 g/l de bicarbonato de sódio, 500 U/ml de penicilina G e 300 µg/ml de sulfato de estreptomicina. O meio foi, então, esterilizado por filtração e mantido a -10 °C. Quando em uso, foi armazenado a 4 – 8 °C por, no máximo, 14 dias. Para a manutenção dos cultivos celulares, RPMI 1640 foi suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Cripion, São Paulo).

Solução de tripsina a 0,25 %

Tripsina (Worthington Biochemical Corporation), 195 unidades/mg de proteína, foi dissolvida na proporção de 1:400 em PBS, esterilizada por filtração e mantida a -25 °C.

Solução de tripsina-EDTA a 0,05 %

Diluiu-se a solução de tripsina a 0,25 % na proporção 1:5 com PBS contendo 0,02 g de EDTA dissódico, obtendo-se uma solução de tripsina a 0,05 %.

Solução de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a 0,01 M*

Quarenta miligramas de DPPH* foram diluídos volumetricamente em 10 ml de metanol P.A.. A solução foi armazenada em geladeira e ao abrigo da luz.

Solução de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a 0,3 mM*

Três mililitros da solução de DPPH* a 0,01 M foram diluídos volumetricamente em 100 ml de etanol absoluto. A solução foi armazenada em geladeira e ao abrigo da luz.

Solução-reagente para ensaio do complexo fosfomolibdênico

Em balão volumétrico de 25 ml, transferiu-se 0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio, completando-se o volume com q.s. de água destilada. A solução foi utilizada imediatamente após o preparo.

Solução de H₂O₂ a 500 µM

Adicionou-se 15 µl de Peróxido de Hidrogênio (Vetec) a 30% em 985 µl de PBS. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a 4 – 8 °C ao abrigo da luz.

3.2. Extratos vegetais

Extratos glicólicos de *Camellia sinensis* (chá-verde), *Ginkgo biloba*, *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Helianthus annuus* (girassol), *Vitis vinifera* (uva), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Artemisia umbelliformis* (artemísia), contendo as especificações da Tabela 2 e disponíveis comercialmente, foram utilizados neste trabalho.

Tabela 2 - Composição dos extratos comerciais usados no trabalho.

Matéria-prima	Composição	Substância(s) Ativa(s)	Teor (%)*
Extrato de chá-verde	Glicerina, água, extrato de folha de <i>Camellia sinensis</i> , sorbato de potássio, benzoato de sódio	Taninos e Catequinas	1,0 - 2,0 (taninos) 0,2 - 0,8 (catequinas)
Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	Glicerina, butilenoglicol, água, extrato de folha de <i>Ginkgo biloba</i>	Rutina	mínimo 0,2
Extrato de erva-mate	Glicerina, extrato de folha de <i>Ilex paraguariensis</i>	Polifenóis totais	0,8 - 2,1
Extrato de girassol	Butilenoglicol, extrato de semente de <i>Helianthus annuus</i>	Polifenóis totais	1,3 - 3,5
Extrato de uva	Propilenoglicol, água, extrato de semente de <i>Vitis vinifera</i> , sorbato de Potássio	Oligômeros de Proantocianidinas	mínimo 0,4
Extrato de gengibre	Glicerina, água, extrato de raiz de <i>Zingiber officinale</i> , sorbato de potássio, benzoato de sódio	6-gingerol	mínimo 0,01
Extrato de artemisia	Glicerina, água, extrato de folha de <i>Artemisia umbelliformis</i> , sorbato de potássio, benzoato de sódio	Ácido Clorogênico	mínimo 0,025

* concentrações indicadas pelos fornecedores, de acordo com o lote.

3.2.1. Preparo de extrato fluido de chá-verde

Folhas secas de *Camellia sinensis* foram obtidas comercialmente na área central de Curitiba, PR e identificadas por meio de cortes histológicos sob microscopia de luz. Para preparação do extrato fluido, 200 g do material foram triturados e, em seguida, macerados em etanol/água (50:50) em funil de separação a temperatura ambiente por 8 dias. O extrato foi então, filtrado em papel de filtro comum e mantido a -25 °C. Para uso nos experimentos, o extrato fluido foi diluído nos reagentes específicos de cada ensaio de acordo com as concentrações finais requeridas. Nos testes que envolveram cultivo celular, as soluções de trabalho foram esterilizadas por filtração.

3.3. Células

Fibroblastos de camundongo da linhagem McCoy, adquiridos do Instituto Adolfo Lutz, foram mantidos a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal inativado (Cripion), 500 U/ml de penicilina G e 300 µg/ml de sulfato de estreptomicina. A cada 3-4 dias, 10⁵ células/ml foram subcultivadas em garrafas de 25 cm² (TPP, Suíça) após tripsinização, em

volume final de 10 ml. Para a avaliação da atividade de enzimas e proteção ao ADN, foram utilizados fibroblastos dérmicos humanos (Clonetics™ NHDF - *Normal Human Dermal Fibroblasts*, CC-2511) adquiridos da Cambrex/Lonza (Walkersville, MD), os quais foram cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, a 37 °C em presença de 5 % de CO₂, utilizando o meio de cultura FBM (*Fibroblast Basal Medium*) CC-3131 (Cambrex/Lonza) suplementado com 2 % (v/v) de Soro Bovino Fetal (Fetal Bovine Serum, CC-4101J), 0,1 % de uma associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (Gentamicin Sulfate/Amphotericin-B, CC-4081J), 0,1 % de insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J) e 0,1 % de fator de crescimento de fibroblastos humanos (rhFGF-B – *recombinant human Fibroblast Growth Factor-B*, CC 4065-J). O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e, ao atingirem aproximadamente 80 % de confluência, as células foram tripsinizadas, semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1x10⁵ células/poço ou em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1x10⁴ células/poço para posterior irradiação e incubação com os extratos. Os ensaios com fibroblastos humanos foram realizados pelo Instituto de Bioengenharia da Pele EVIC Brasil, São Paulo, SP e pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular da empresa Chemyunion, Sorocaba, SP.

3.4. Método de redução do DPPH*

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Mensor (2001). Para o preparo dos tubos de amostras e controles utilizou-se uma solução de DPPH* 0,3 mM, preparada no momento das análises. A vitamina C, utilizada como padrão, e os extratos foram diluídos em etanol absoluto, de forma a se obter soluções com concentrações crescentes. Após preparação das soluções-teste, 2,5 ml de cada solução reagiu com 1 ml da solução etanólica de DPPH*. Trinta minutos após o início da reação, procedeu-se a avaliação da redução do radical livre pelas substâncias antioxidantes presentes no meio, com mudança da coloração violeta original para amarela, lendo-se as absorvâncias em 518 nm (espectrofotômetro UV-Vis Varian - Cary 50 Conc). Foi usado como branco uma solução contendo 2,5 ml de extrato e 1,0 ml de etanol, e um controle composto por 2,5 ml de etanol e 1,0 ml de DPPH*. Todos os ensaios foram

realizados em triplicata e, para o cálculo dos resultados, utilizou-se a média das triplicatas. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi obtida de acordo com a equação abaixo:

$$(1) \quad AA\% = 100 - \frac{[(\text{absorvância amostra} - \text{absorvância branco}) \times 100]}{(\text{absorvância do controle})}$$

3.5. Método de redução do complexo fosfomolibdênio

Alíquotas de 0,3 ml das soluções dos extratos na concentração de 10 mg/ml foram combinadas em tubos Eppendorf com 1 ml da solução-reagente. Os tubos foram incubados em banho seco (Dryblock - BS30) a 95 °C por 90 minutos. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e a formação do complexo fosfomolibdênio, de cor verde, em cada solução foi mensurada em 695 nm (espectrofotômetro Shimadzu UV-1601). O tubo branco foi preparado com 1 ml da solução-reagente e 0,3 ml de água. Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR%) em comparação com ácido ascórbico puro (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

3.6. Determinação do perfil cromatográfico e do teor de EGCG

A quantificação de EGCG nos extratos de chá-verde fluido e hidroglicólico foi obtida por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tanto, utilizou-se o equipamento Agilent Series 1100, com bomba quaternária e detector UV DAD. Usou-se coluna Supelco (Supelcosil LC 18 DB, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 0,8 ml/min e volume de injeção de 10 µl. Foram utilizados reagentes grau HPLC, sendo a fase móvel constituída de metanol e ácido fórmico 0,1 %, com gradiente inicial de 10:90 e 90:10 após 16 minutos de corrida. As soluções a 10 µg/ml do extrato fluido em água e a solução a 100 µg/ml do extrato hidroglicólico em metanol/água (1:1) foram analisadas em 280 nm, durante 20 minutos (Danrong, Yuqiong e Dejiang, 2009; Fu et al., 2008; Peng et al., 2008). Solução de epigallocatequina-3-galato (DSM) pura, a 100 µg/ml, foi usada como padrão. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa *ChemStation*, versão Chem32.

3.7. Ensaios de viabilidade e citotoxicidade para células McCoy

A viabilidade e a citotoxicidade de células McCoy foram avaliadas utilizando-se o teste com azul de Trypan (Merchant, Kahn e Murphy, 1964), no qual fibroblastos foram diluídos convenientemente em solução de azul de Trypan 0,4 % e observados em câmaras de Neubauer Improved, sob microscopia óptica (Olympus CH30). As células classificadas como viáveis apresentaram-se íntegras, incolores e redondas, enquanto as não-viáveis mostraram-se coradas em azul. Os resultados estão apresentados em porcentagem de células viáveis.

3.8. Toxicidade induzida por radiação UV

Células McCoy (5×10^5 células/frasco de 10 cm^2 de área de superfície, volume de 3 ml) foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Quando apresentaram cerca de 80 % de área de confluência, após cerca de 24 horas, foram irradiadas com 6, 12, 24, 36, 48 e 96 J/cm^2 de radiação UVA/UVB em um simulador específico (Suntest CPS+, Atlas). Em seguida, foram re-incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após tripsinização, as células foram observadas em hemocitômetro e sua viabilidade avaliada com solução azul de Trypan (Merchant, Kahn e Murphy, 1964). Os resultados estão apresentados como a porcentagem média \pm desvio padrão (DP) de células recuperadas e viáveis, obtidas em pelo menos três experimentos independentes, de acordo com as seguintes equações:

$$(2) \quad \% \text{ Células recuperadas} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ células tratadas recuperadas}}{\text{n}^\circ. \text{ de células recuperadas no controle}} \times 100$$

$$(3) \quad \% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ células tratadas viáveis recuperadas}}{\text{n}^\circ. \text{ total de células tratadas recuperadas}} \times 100$$

Para avaliação do efeito protetor contra os danos provocados pela radiação UV, antes da irradiação, as células foram expostas a concentrações específicas dos extratos por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.9. Toxicidade induzida por H₂O₂

Fibroblastos da linhagem McCoy (5×10^5 células/frasco de 10 cm^2 de área de superfície em 3 ml) foram incubados a 37°C . Quando apresentaram cerca de 80 % de confluência, foram tratados por 30 minutos a 37°C , com 1,5; 2,5; 5 e $10 \mu\text{M}$ de H₂O₂. Em seguida, foram re-incubados a 37°C por 24 horas. Após tripsinização, as células foram observadas em hemocítômetro e sua viabilidade avaliada com solução azul de Trypan (Merchant, Kahn e Murphy, 1964). Os resultados estão apresentados como a porcentagem média \pm DP de células recuperadas e viáveis, obtidas em pelo menos três experimentos independentes, de acordo com as equações (1) e (2) citadas no item anterior. Para avaliação do efeito protetor contra os danos provocados pela H₂O₂, antes da exposição, as células foram expostas a concentrações específicas dos extratos por 24 horas a 37°C .

3.10. Avaliação da atividade protetora celular

Este teste foi realizado pelo Instituto de Bioengenharia da Pele EVIC Brasil, São Paulo, SP. Resumidamente, fibroblastos dérmicos humanos normais (1×10^5 células/poço em placas de 24 poços) foram incubados com concentrações dos extratos comercial e fluido de chá-verde, previamente determinadas através da técnica de MTT, descrita por Mosmann (1983), e mantidas em contato com as células por 24 horas, a 37°C e em presença de 5 % de CO₂. O meio de cultura foi removido e reservado, as células lavadas com PBS e, então, irradiadas com de 5 J/cm^2 de radiação UVA/UVB emitidas pelo simulador MULTIPORT® 601 (Solar Light). Após irradiação, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com $200 \mu\text{l}$ /poço de PBS. Adicionou-se, então, $100 \mu\text{l}$ de solução reagente (0,1 % de cristal violeta em solução 1:1 de ácido sulfúrico e ácido acético glacial P.A., Labsynth) em cada poço da placa de 96 poços, com incubação por 10 minutos em TA. A solução reagente foi desprezada cuidadosamente por inversão da placa e as células lavadas com água destilada até que o sobrenadante permanecesse claro. As placas foram, então, secas naturalmente. Em seguida, as células foram solubilizadas com $100 \mu\text{l}$ /poço de metanol (P.A., Labsynth), procedendo-se a mensuração do corante liberado no meio, de coloração violeta, em 540 nm em leitora de microplacas. Os resultados estão apresentados como a porcentagem

relativa dos valores médios das absorvâncias, obtidas em pelo menos três experimentos independentes, de acordo com a seguinte equação:

$$(4) \quad \% \text{ Proteção ao ADN} = \frac{\text{absorvância amostra}}{\text{absorvância do controle irradiado}} \times 100$$

3.11. Mensuração de enzimas metaloproteinases (MMP)

Este ensaio foi realizado pelo Instituto de Bioengenharia da Pele EVIC Brasil, São Paulo, SP. Em resumo, fibroblastos dérmicos humanos normais (1×10^5 células/poço em placas de 24 poços) foram incubados com concentrações dos extratos comercial e fluido de chá-verde, previamente determinadas através da técnica de MTT (Mosmann, 1983), e mantidas em contato com as células por 24 horas, a 37 °C e em presença de 5 % de CO₂. O meio de cultura foi removido e reservado, as células lavadas com PBS e então irradiadas com 3 J/cm² de radiação UVA/UVB emitidas por um simulador MULTIPORT® 601 (Solar Light). Em seguida, o meio de cultura foi devolvido independentemente em cada poço e as células re-incubadas por 24 horas a 37 °C e em presença de 5 % de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi usado para avaliação da atividade das MMP por meio de ensaio de ligação competitiva (ELISA), utilizando o sistema comercial Quantikine® Human MMP-1, MMP-9, MMP-13 Immunoassay (R&D Systems). Para tanto, foram adicionados 100 µl de diluente de ensaio provido pelo sistema comercial em cada poço da placa de 96 poços e 100 µl de amostra, padrão ou controle. As placas foram então mantidas em agitador orbital digital CT150 (Cientec) por 2 horas. Na seqüência, os poços foram lavados com solução tampão de lavagem proveniente do sistema comercial e incubados com 200 µl/poço de solução de anticorpos específicos, com agitação por 2 horas em TA. A placa foi, então, novamente lavada e foram adicionados 200 µl/poço de solução substrato (revelador colorimétrico), com posterior incubação por 20 minutos ao abrigo da luz e em TA. Finalmente, 50 µl/poço de solução de bloqueio foram adicionados e a absorvância a 450 nm foi, então, determinada em leitora de microplacas. Os

resultados foram obtidos com base em curvas de concentrações (ng/ml ou pg/ml) conhecidas dos padrões de MMP-1, MMP-9 e MMP-13.

3.12. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Este ensaio foi gentilmente realizado pelo Dr. Gustavo Dieamant e Dra. Samara Eberlin, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da empresa Chemyunion, Sorocaba, SP. Em resumo, fibroblastos dérmicos humanos normais (1×10^5 células/poço em placas de 24 poços) foram incubados com concentrações dos extratos comercial e fluido de chá-verde, previamente determinadas através da técnica de MTT (Mosmann, 1983), e mantidas em contato com as células por 24 horas, a 37 °C e em presença de 5 % de CO₂. O meio de cultura foi removido e reservado, as células lavadas com PBS e então irradiadas com de 3 J/cm² de radiação UVA/UVB emitidas pelo simulador MULTIPORT® 601 (Solar Light). Em seguida, o meio de cultura inicial foi devolvido em cada poço e as células re-incubadas por 48 horas a 37 °C e em presença de 5 % de CO₂. Na sequência, para obtenção do lisado celular, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS, re-suspendidas em tampão de lise (*RIPA Buffer, Pierce*) e incubadas em banho de gelo por 5 minutos. As células foram, então, centrifugadas a 4°C e o sobrenadante cuidadosamente transferido para um microtubo plástico e mantido refrigerado. O lisado celular foi usado imediatamente para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes por meio de ensaio de ligação competitiva (ELISA), utilizando o sistema comercial Catalase Assay e Superoxide Dismutase Assay (Cayman Chemical Co.). Para mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD), 10 µl das amostras e das soluções padrões, 200 µl da solução de tetrazolium e 20 µl da solução de xantina oxidase foram adicionados aos poços da placa de 96 poços. A placa foi incubada por 20 minutos sob agitação e a absorvância lida em 450 nm. A atividade da SOD foi obtida com base na concentração conhecida dos padrões de SOD (U/ml). Já para mensuração da enzima catalase (CAT), 100 µl de PBS, 30 µl de metanol, 20 µl das amostras ou do padrão de formaldeído e 20 µl de H₂O₂ foram adicionados aos poços da placa de 96 poços, a qual foi incubada por 20 minutos sob agitação. Em seguida, 30 µl de uma solução de hidróxido de potássio foram adicionados para cessar a reação. O cromógeno (30 µl) foi adicionado aos poços e a placa incubada por mais 10 minutos. Por

fim, uma solução de periodato de potássio (10 µl) foi adicionada, a placa incubada por 5 minutos e a leitura feita em 540 nm. A atividade da CAT foi calculada com base na concentração conhecida dos padrões de formaldeído (µM), com utilização de equação específica.

3.13. Estudos estatísticos

Os resultados estão apresentados como a média \pm 1 desvio padrão (DP). Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste “t” de Student e a Análise de Variância (ANOVA) e, quando apropriado, o teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando-se os programas *JMP*, versão 7.0, *R*, versão 2.7.2 e *GraphPad-Instat*, versão 2007. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos vegetais, por apresentarem diferentes substâncias em sua composição, são capazes de desempenhar inúmeras atividades biológicas nos seres humanos. Dentre estas, destacam-se as antioxidantes, protetoras do ADN e antiinflamatórias, as quais indiretamente podem retardar ou mesmo prevenir o desenvolvimento de várias doenças de curso crônico (Kaur, Kapila e Agrawal, 2007; Ratnam et al., 2006; Timothy, 2000; Hu et al., 2000). Ainda, o seu emprego em formulações cosméticas vem sendo explorado na qualidade de coadjuvantes no combate ao envelhecimento, particularmente aquele decorrente da exposição excessiva a fatores comprovadamente responsáveis pelo seu aparecimento precoce. Muitas dessas ações estão relacionadas às estruturas polifenólicas de seus componentes, exemplificados por taninos, ácidos fenólicos e flavonóides.

Neste sentido, considerando o crescente emprego de extratos vegetais, os quais muitas vezes não utilizam o processo de preparo recomendado pela farmacopéia, um dos objetivos do presente trabalho foi estudar as propriedades antioxidantes de extratos comerciais de *Camellia sinensis* (chá-verde), *Ginkgo biloba* (ginkgo), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Helianthus annuus* (girassol), *Vitis vinifera* (uva), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Artemisia umbelliformis* (artemísia) e relacioná-las com ações ligadas ao antienvelhecimento, as quais foram testadas em sistemas de cultivo celular *in vitro*.

Assim, em um primeiro momento, avaliou-se o potencial antioxidante de extratos comerciais dessas plantas pelos métodos químicos do DPPH• e do complexo fosfomolibdênico. Em seguida, seus efeitos na proteção de fibroblastos contra insultos físico (induzido por radiação UV) e químico (induzido pelo H₂O₂) foram investigados. Finalmente, buscou-se esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nessas atividades por meio da quantificação de MMP e avaliação da atividade de enzimas antioxidantes endógenas, cujos resultados obtidos serão mostrados e discutidos a seguir.

4.1. Avaliação da atividade antioxidante

Como já referido na introdução deste trabalho, muitos métodos e modos de se expressar a atividade antioxidante de extratos obtidos de plantas e vegetais têm sido utilizados, nos quais o efeito de várias concentrações é

comparado àquele exercido por substâncias de referência. Dentre esses se destacam os métodos de redução do DPPH• (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Mensor, 2001) e de redução do complexo fosfomolibdênico (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999), que fornecem resultados confiáveis, reproduzíveis, de fácil execução, além de utilizar reagentes acessíveis e não necessitar de equipamentos sofisticados.

Neste trabalho, para o ensaio do DPPH•, foram considerados apenas os resultados obtidos após 30 minutos do início da reação, Ainda, para que os resultados pudessem ser diretamente comparados, estabeleceu-se a EC₅₀, ou seja, a concentração de cada extrato analisado capaz de reduzir 50% dos radicais DPPH• presentes no tubo reator. A referida EC₅₀ foi calculada por meio da equação da reta ($y=ax+b$) resultante de gráficos estabelecidos entre a concentração e a atividade antioxidante obtidas individualmente para cada extrato, como ilustrado para o extrato de chá-verde na Figura 6.

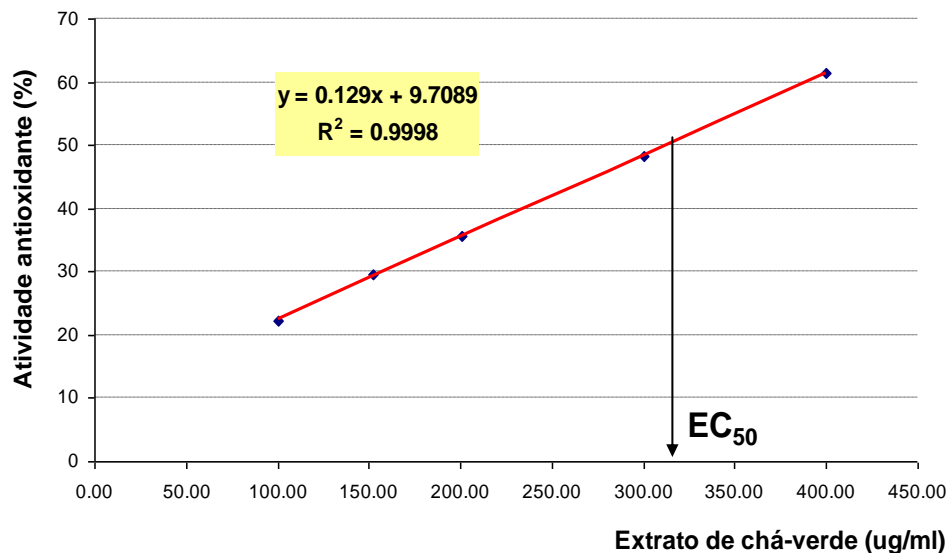


Figura 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroglicólico de chá-verde avaliada pelo método de redução do DPPH•. A concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH• (EC₅₀) foi obtida por meio da equação da reta.

Os resultados de EC₅₀ de cada extrato em teste estão apresentados na Tabela 3, os quais demonstraram que o extrato comercial de chá-verde apresentou atividade antioxidante significativamente maior que os demais (n=3, $p<0,01$); já os extratos de girassol e erva-mate demonstraram ter potencial antioxidante muito próximo, porém maior quando comparados com o apresentado pelos extratos de gengibre e artemísia (n=3; $p<0,01$), enquanto os de uva e ginkgo ocuparam posição intermediária.

Tabela 3 - Capacidade antioxidante dos extratos de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelo método da redução do DPPH*, usando-se o ácido ascórbico como referência.

Extratos	EC₅₀ (µg/ml)	
Chá-verde (comercial)	313,33 ± 10,63	A*
Girassol	602,53 ± 44,68	B
Erva-mate	675,8 ± 33,54	B
Uva	3161,22 ± 346,90	C
Ginkgo	3305,39 ± 363,55	C
Artemísia	7909,62 ± 924,98	D
Gengibre	40003,38 ± 4046,90	E
Ácido ascórbico	5,03 ± 0,55	F

* Resultados classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p<0,05$).

Quando a capacidade antioxidante desses mesmos extratos foi avaliada pelo ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico (Figura 7) e relacionada ao desempenho demonstrado pelo ácido ascórbico, para o qual se atribuiu 100 % de atividade, os seguintes valores, em ordem decrescente, foram obtidos: chá-verde, $21,86 \pm 1,23$ %; erva-mate, $21,33 \pm 1,55$ %; girassol, $11,60 \pm 0,55$ %; ginkgo, $6,05 \pm 0,24$ %; uva, $4,29 \pm 0,68$ %; gengibre, $1,99 \pm 1,76$ %; e, finalmente, artemísia, $1,19 \pm 1,63$ %.

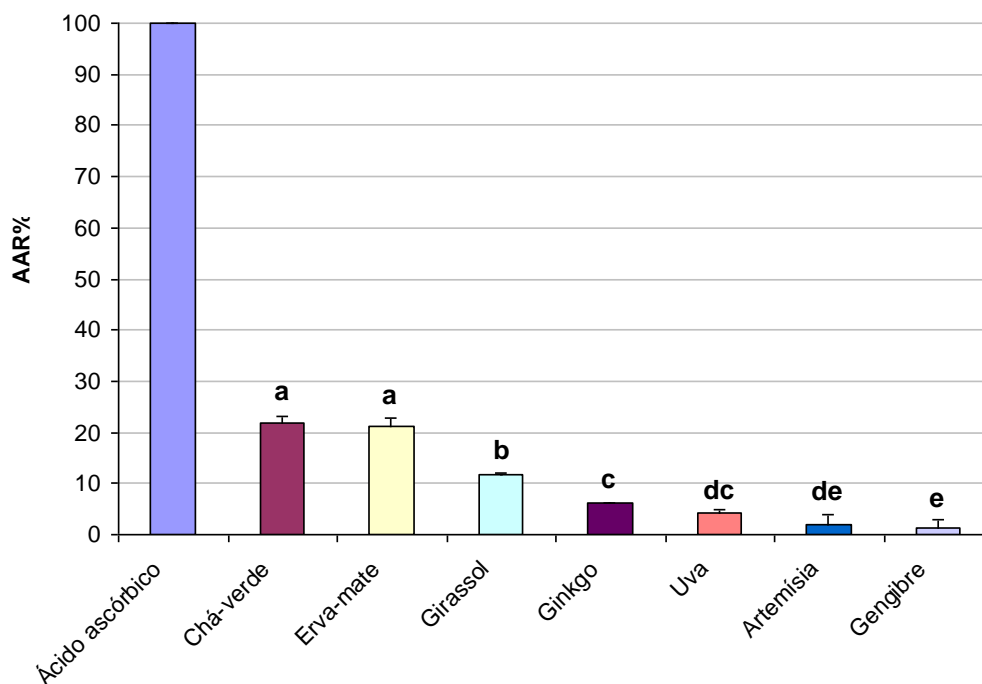


Figura 7 - Atividade antioxidante dos extratos comerciais de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Soluções dos extratos das plantas indicadas (10 mg/ml) foram tratados com solução reagente por noventa minutos a 95 °C e sua absorvância obtida em 695 nm. Cada coluna representa a média±DP da capacidade antioxidante em relação a atividade desempenhada pelo ácido ascórbico (AAR) obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Resultados classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$).

Como observado no método anterior, o extrato de chá-verde demonstrou potencial antioxidante significativamente maior em relação a todos os outros extratos avaliados ($n=3$; $p < 0,05$). Entretanto, quando comparados estatisticamente entre si, as posições desses extratos com relação à capacidade antioxidante foram alteradas, ou seja, os extratos de chá-verde e erva-mate apresentaram semelhança em termos de potencial antioxidante, seguidos pelo de girassol, o qual passou a ocupar uma posição intermediária. Na sequência, vieram os extratos de uva e ginkgo e, por último, os de artemísia e gengibre. Os resultados obtidos nos dois métodos antioxidantes estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Capacidade antioxidante dos extratos de chá-verde, girassol, erva-mate, uva, ginkgo, artemísia e gengibre, avaliada pelos métodos da redução do DPPH* e do complexo fosfomolibdênico.

Extratos	DPPH	Complexo fosfomolibdênico
Chá-verde	A	A*
Erva-mate	B	A
Girassol	B	B
Uva	C	C
Ginkgo	C	DC
Artemísia	D	DE
Gengibre	E	E

* Resultados classificados com letras distintas são diferentes entre si ($p < 0,05$)

Neste momento, torna-se oportuno um comentário sobre a capacidade antioxidante apresentada pelo extrato comercial de uva, observada em ambos os métodos, ocupando somente uma posição intermediária, sem muito destaque, dentre as amostras testadas. A mídia tem sido pródiga em comentários sobre os benefícios do consumo de vários tipos de uvas, particularmente em bebidas e produtos cosméticos, destacando seu efeito antioxidante na prevenção de doenças crônicas, como a aterosclerose, por exemplo, ou na manutenção da firmeza da pele, contribuindo no combate do envelhecimento precoce. Um número crescente de estudos vem apontando as proantocianidinas como as responsáveis por esses efeitos benéficos, uma vez que já se demonstrou que, além da ação antiradicalar, elas estão envolvidas na proteção do ADN, na inibição de enzimas relacionadas à degradação da matriz celular e na fotoproteção (Orak, 2007, Baumann, 2007; Hadi et al., 2007; Carini et al., 1998). Assim, os resultados obtidos foram, de certa forma, frustrantes, uma vez que tivemos o cuidado de usar nos experimentos um extrato comercial padronizado em proantocianidinas.

As duas metodologias usadas neste estudo baseiam-se na transferência de elétron e hidrogênio dos antioxidantes aos substratos definidos, DPPH* e Mo^{+6} , havendo grande dependência da estrutura dos antioxidantes em análise, ou seja, um aumento do número de grupos hidroxil e metóxi no anel fenólico faz com que ocorra um aumento na habilidade de redução das substâncias em

teste (Loo, Jain e Darah, 2008; Koleva et al., 2002; Prieto, Pineda e Aguilar, 1999). Nas folhas de chá-verde são encontrados inúmeros polifenóis, principalmente catequinas, os quais têm sido relatados como eficientes antioxidantes (Hsu, 2005; Ting, Vest e Sontheimer, 2003; Zhao, Guo e Xin, 2001). Da mesma forma, há relatos sobre o potencial antioxidante dos extratos preparados das folhas de girassol e erva-mate, onde estão presentes flavonóides, taninos e ácido clorogênico, dentre outros componentes, os quais demonstraram relevante ação antioxidante (Marques e Farah, 2009; Deladino et al., 2008). Já os inúmeros polifenóis presentes nas sementes de girassol estão relacionados ao aumento de substâncias antioxidantes solúveis, como a glutathione reduzida e outras enzimas endógenas, como a catalase, caracterizando, pelo menos em parte, sua capacidade de responder contra agressores externos (Costa, Gallego e Tomaro, 2002) e, adicionalmente, aos efeitos sobre o estresse oxidativo, através da redução significativa de RL do meio (Gallego, Benavídes e Tomaro, 1996).

Vários relatos indicam a presença de uma infinidade de compostos nos extratos vegetais capazes de colaborar na eliminação de RL, o que, por um lado, permite que um amplo espectro de proteção antiradicalar seja atingido (Marques e Farah, 2009; Almajano et al., 2008; Iacopini et al., 2008; Grassman, Hippeli e Elstner, 2002; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002). Neste contexto, os flavonóides extraídos do chá-verde, da erva-mate e de uvas já demonstraram ser substâncias efetivamente superiores quanto à capacidade de proteger a pele contra o estresse oxidativo (Arct e Pytkowska, 2008). Por outro lado, a presença de diferentes substâncias com potencial antioxidante nesses extratos dificulta a comparação. Ainda, é preciso se ter em mente que os métodos do DPPH[•] e do fosfomolibdênio utilizados são importantes enquanto ensaios de comparação, porém o potencial antioxidante de misturas em sistemas biológicos pode interagir de diferentes formas e a extrapolação dos resultados obtidos em sistemas *in vitro* para a complexidade fisiológica existente nos seres vivos pode ficar comprometida. De qualquer forma, nossos resultados corroboram com vários estudos prévios como revisto na introdução deste trabalho, uma vez que esses extratos, em particular os de chá-verde, girassol e erva-mate, contêm substâncias polifenólicas em maior concentração do que os demais, como apresentado na Tabela 2, na seção de Material e Métodos.

Como diferenças significativas e discrepantes na ação antioxidante do extrato comercial de chá-verde em comparação aos demais extratos e, particularmente à vitamina C, foram observadas nos dois métodos utilizados, decidiu-se preparar um extrato fluido de chá-verde, observando-se a metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira, 4ª edição (2002), para o qual obteve-se uma EC_{50} de $53,33 \pm 5,69 \mu\text{g/ml}$ no método do DPPH*, e uma AAR de $94,63 \pm 1,25 \%$ no ensaio do complexo fosfomolibdênico, evidenciando ter este extrato um potencial antioxidante muito próximo ao da vitamina C e significativamente superior àquele demonstrado pelo extrato adquirido no mercado ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Esses resultados mostram também, de forma efetiva, a importância de se ter um controle de qualidade rigoroso sobre as matérias-primas de origem vegetal, particularmente aquelas indicadas ou prescritas como dotadas de ação antioxidante, a fim de que sua aplicação atinja a eficiência desejada.

4.2. Determinação do perfil cromatográfico e do teor de EGCG

Em função dos resultados de atividade antioxidante apresentados pelos extratos fluido e comercial de chá-verde e tendo-se conhecimento do papel relevante que estruturas polifenólicas têm no desempenho antioxidante de extratos vegetais, decidiu-se analisar o perfil cromatográfico desses extratos, usando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nos cromatogramas mostrados na Figura 8, observou-se não só a presença de várias substâncias com estrutura polifenólica em ambos os extratos, como também diferenças em sua composição. Dentre essas estão as catequinas, destacadas com as setas. Usando padrão puro, foi possível identificar, em ambos os extratos, com tempos de retenção de 9,618 e 9,636 minutos, nos extratos comercial e fluido, respectivamente, a EGCG. O doseamento dessa substância, de acordo com a metodologia descrita no item 3.6, da seção de Material e Métodos, revelou teores de $1,58 \pm 0,05$ e $0,27 \pm 0,05 \%$, respectivamente, para os extratos de chá-verde fluido e comercial, aqui e doravante denominado hidroglicólico. Interessante notar que, pelo método do DPPH*, obteve-se para esse extrato uma EC_{50} de $53,33 \pm 5,69 \mu\text{g/ml}$, a qual foi cerca de seis vezes inferior ao demonstrado por aquele, coincidentemente a mesma proporção encontrada no doseamento de EGCG.

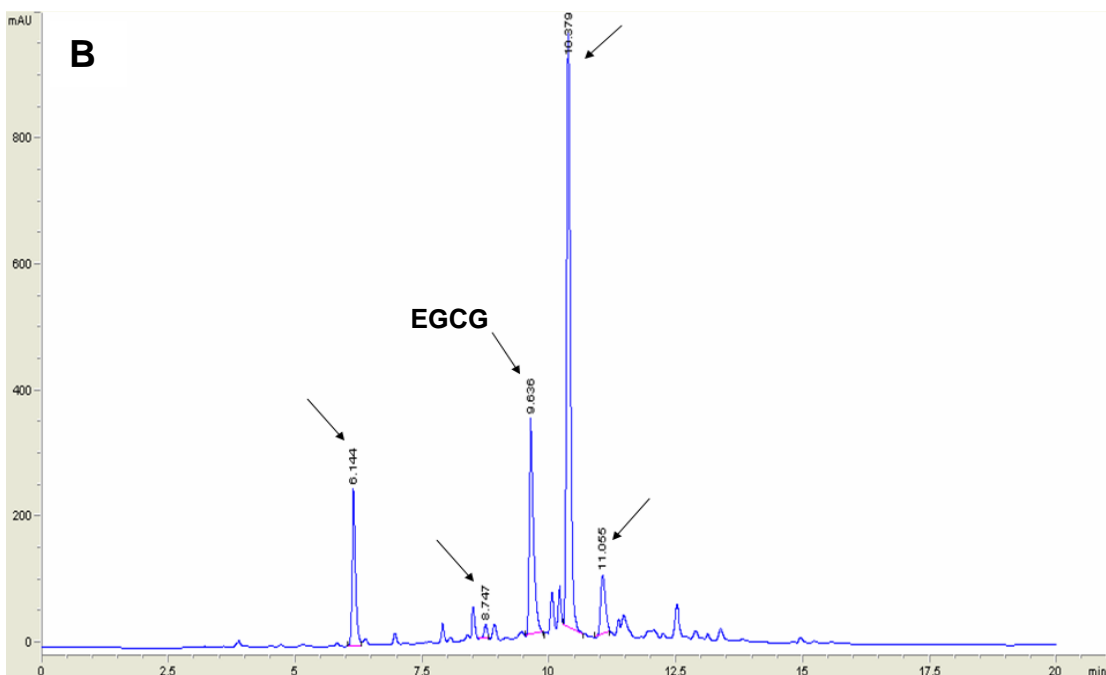
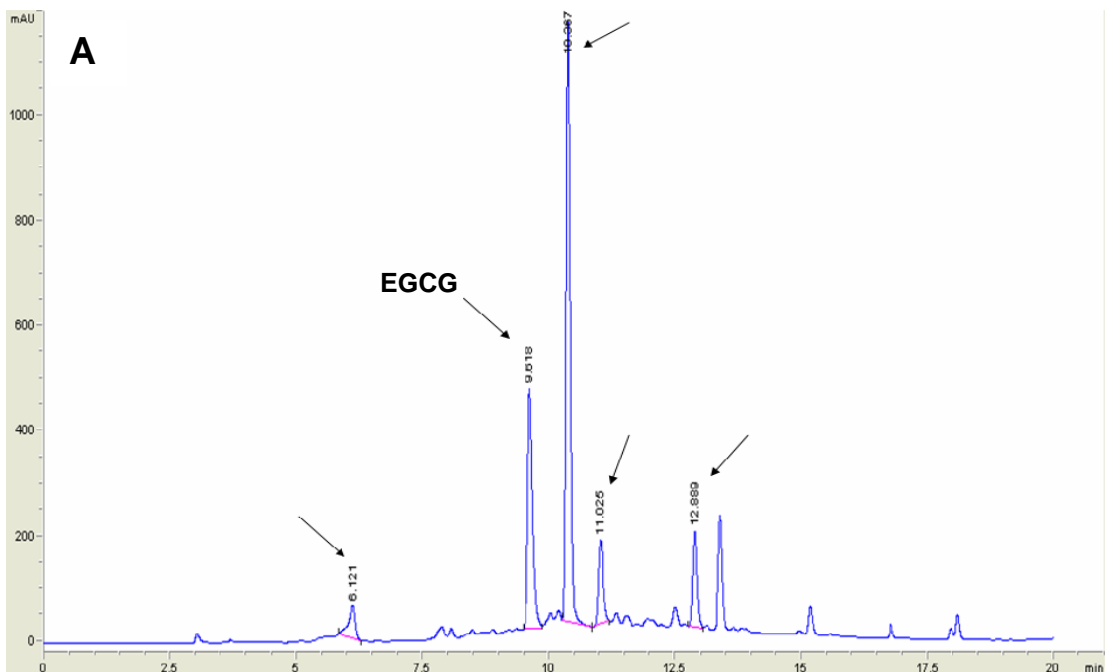


Figura 8 - Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcológico (A) e fluido (B) de chá-verde. As setas indicam catequinas. Soluções a 10 µg/ml do extrato fluido em água e a 100 µg/ml do extrato hidroalcológico em metanol/água (1:1) foram analisadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de UV em 280 nm, usando-se coluna Supelcosil LC 18 DB (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel constituída de metanol e ácido fórmico 0,1%. A epigalocatequina-3-galato (EGCG) foi identificada com auxílio de solução-padrão a 100 µg/ml, preparada a partir de epigalocatequina-3-galato comercial extraída de chá-verde.

Com estes resultados, é possível sugerir que as discrepâncias de comportamento antioxidante observadas para os extratos podem estar, pelo menos no que se refere às substâncias fenólicas, relacionadas não só às diferenças na composição dessas moléculas, como também ao teor de EGCG, a qual é, sem dúvida, a mais estudada e para qual a eficiência antioxidante tem sido direcionada.

4.3. Efeito dos extratos de chá-verde, girassol e erva-mate sobre células McCoy

Os resultados obtidos nos experimentos de atividade antioxidante claramente evidenciaram um comportamento superior dos extratos de chá-verde, girassol e erva-mate em relação aos demais, independente da metodologia empregada. Considerando o potencial biológico e os objetivos deste trabalho, que incluem seu uso como coadjuvantes na prevenção do envelhecimento precoce, investigou-se o comportamento de células McCoy quando expostas a doses crescentes desses extratos. Estas células são fibroblastos de camundongos que proliferam de forma rápida e uniforme quando adequadamente cultivadas, servindo de modelo experimental inicial para o estudo da ação de substâncias de origem vegetal de uso tópico (Gordon e Quan, 1965).

Entretanto, sabe-se que a realização de ensaios biológicos *in vitro* que envolvem cultivo celular exige testes preliminares para avaliação de toxicidade das substâncias que entrarão em contato com as células. Neste contexto, o ensaio que utiliza o corante azul de Trypan é muito útil, pois permite observar este efeito sobre as células em estudo, as quais, possuindo membrana citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (Merchant, Kahn e Murphy, 1964). Desta forma, células viáveis, após alguns minutos em contato com o corante, apresentam-se incolores, geralmente esféricas e refringentes, em contraste com as danificadas ou mortas, as quais se coram em azul.

Assim, células McCoy foram expostas, por 24 horas a 37 °C, a concentrações derivadas da EC₅₀ obtidas para os extratos de chá-verde, erva-mate e girassol, conforme a Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Concentrações dos extratos de chá-verde, erva-mate e girassol utilizadas nos ensaios com células McCoy, baseadas nos valores de EC₅₀.

Extratos	EC₅₀* (µg/ml)	EC₅₀/10 (µg/ml)	EC₅₀/100 (µg/ml)	EC₅₀/1000 (µg/ml)
Chá-verde (fluido)	53,33	5,35	0,54	0,05
Chá-verde (hidroglicólico)	313,33	31,33	3,13	0,31
Girassol	602,53	60,25	6,02	0,60
Erva-mate	675,80	67,58	6,75	0,67

* valores médios extraídos da Tabela 3.

Os efeitos foram avaliados em hemocítômetro, após tripsinização das células, quanto à viabilidade e ao número recuperado. Os resultados estão apresentados sob a forma de curvas dose-resposta, ilustradas nas Figuras 9-A, 10, 11 e 12.

É preciso esclarecer que, como o propilenoglicol (PG) é um veículo cosmético frequentemente presente em preparações de extratos comerciais, para se excluir qualquer interferência que este composto poderia causar nos efeitos em estudo, em paralelo e usando essencialmente as mesmas condições experimentais, seus efeitos sobre células McCoy foram também avaliados em doses equivalentes àquelas usadas nos ensaios com o extrato hidroglicólico de chá-verde. Esses resultados estão apresentados na Figura 9-B.

De acordo com a dose utilizada, efeitos ora semelhantes ora distintos entre os extratos estudados com relação ao número de células recuperadas e sua viabilidade foram observados. Por exemplo, para todos os extratos, somente na menor concentração testada (EC₅₀/1000) não se observou efeito tóxico, com o número de células recuperadas nas culturas e a sua viabilidade permanecendo muito próximos daqueles obtidos para as respectivas populações não tratadas, aqui e doravante denominadas população ou grupo controle (Figuras 9-A e 10). Com relação ao efeito sobre a proliferação celular, somente o extrato de erva-mate mostrou-se significativamente inibidor, com somente 83,50 ± 2,61 % das células recuperadas em relação ao controle ($p < 0,05$; n=3).

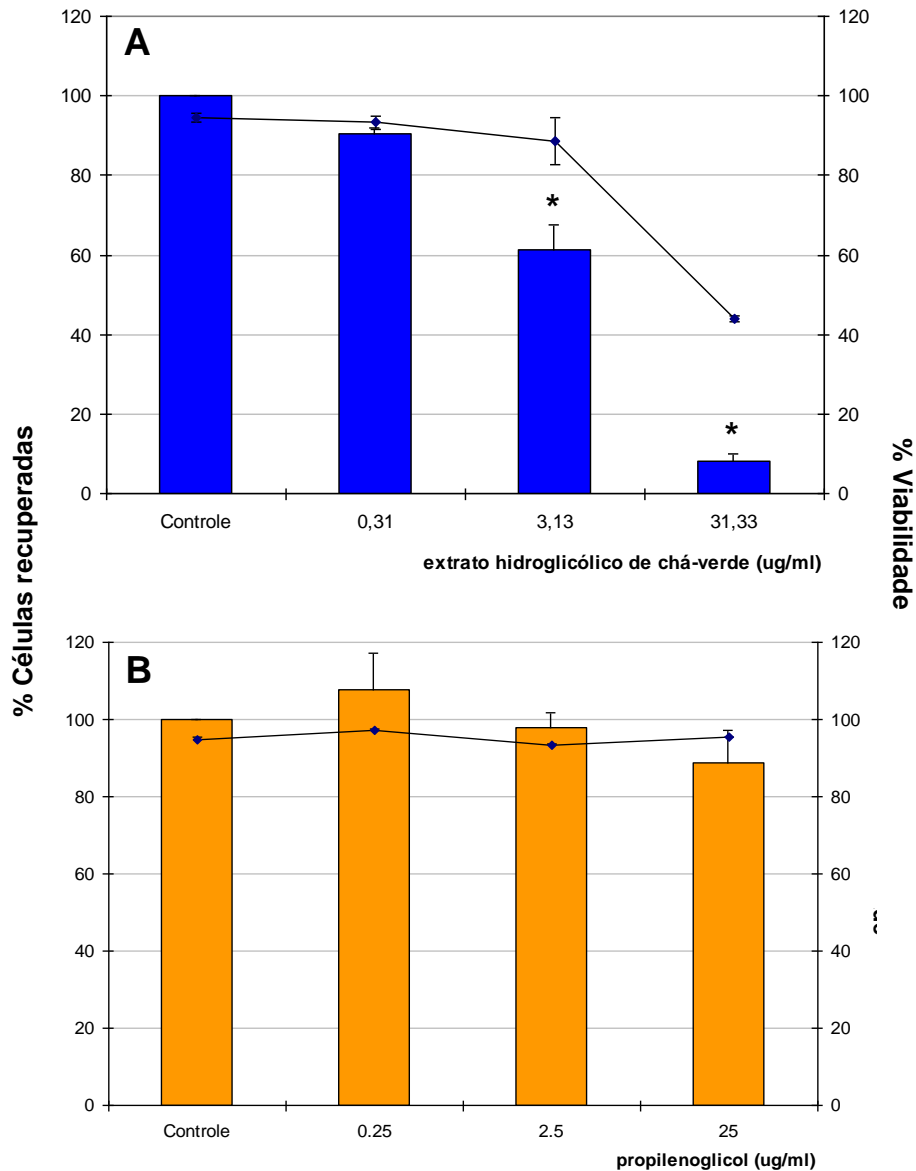


Figura 9 - Efeito *in vitro* do extrato hidroglicólico de chá-verde e do propilenoglicol sobre a proliferação de células McCoy. Células McCoy (10^6 células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos até atingirem 80% de confluência. Em seguida, doses indicadas do extrato hidroglicólico de chá-verde (A) ou de propilenoglicol (B) foram adicionadas. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem de viabilidade média \pm 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Já nas concentrações que representam a $EC_{50}/100$, para o extrato de girassol (Figura 11), tanto a taxa de recuperação ($85,07 \pm 2,21$ %) como a viabilidade das células ($87,86 \pm 3,73$ %) foram significativamente menores do que as observadas para o controle, indicando toxicidade desse extrato para as

células McCoy nessa dose. Da mesma forma, inibição significativa da proliferação celular foi observada após tratamento com os extratos de erva-mate (Figura 12) e de chá-verde (hidroglicólico e fluido), com somente $11,03 \pm 2,21 \%$, $61,34 \pm 6,28 \%$ e $56,12 \pm 5,55 \%$ das células recuperadas, respectivamente, em relação aos grupos controle ($p < 0,05$; $n = 3$ para todos). Entretanto, o tratamento com o extrato de erva-mate revelou-se acentuadamente tóxico, pois nenhuma célula viável foi recuperada após incubação, em contraste com os achados referentes aos extratos de chá-verde, onde mais de 88 % das células recuperadas permaneceram viáveis, sugerindo um efeito inibidor real da proliferação celular.

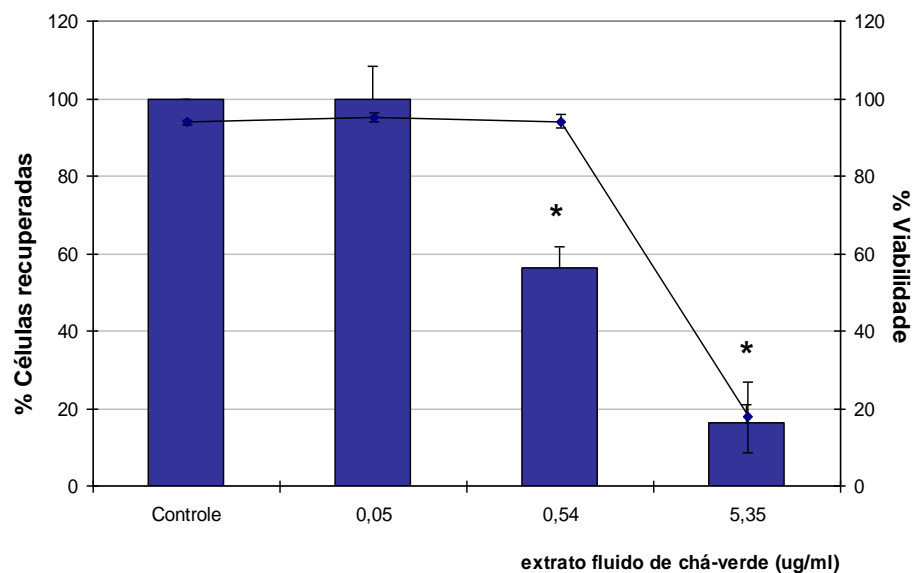


Figura 10 - Efeito *in vitro* do extrato fluido de chá-verde sobre a proliferação de células McCoy. Células McCoy (10^6 células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos até atingirem 80% de confluência. Em seguida, doses indicadas do extrato fluido de chá-verde foram adicionadas. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem de viabilidade média \pm 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

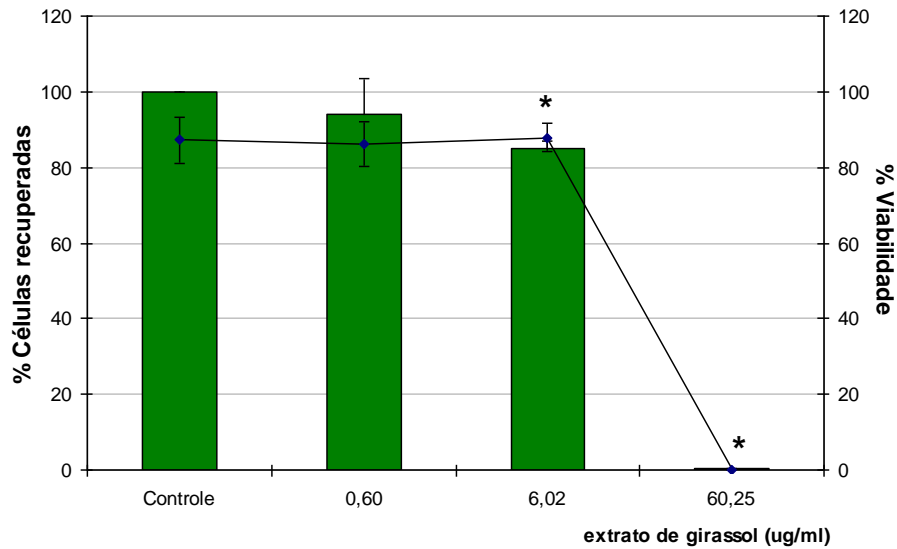


Figura 11 - Efeito *in vitro* do extrato de girassol sobre a proliferação de células McCoy. Células McCoy (10^6 células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos até atingirem 80% de confluência. Em seguida, doses indicadas do extrato de girassol foram adicionadas. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem de viabilidade média \pm 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

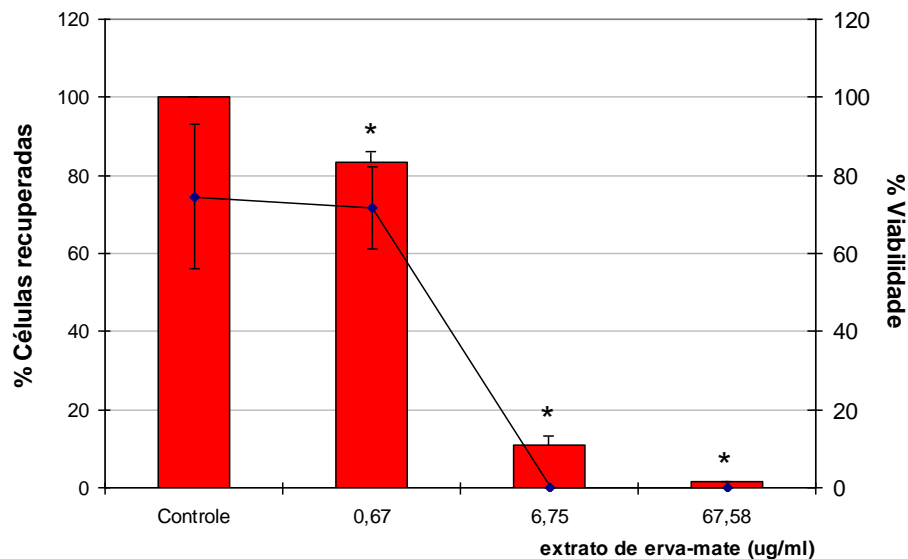


Figura 12 - Efeito *in vitro* do extrato de erva-mate sobre a proliferação de células McCoy. Células McCoy (10^6 células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos até atingirem 80% de confluência. Em seguida, doses indicadas do extrato de erva-mate foram adicionadas. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem de viabilidade média \pm 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Nas concentrações referentes à $EC_{50}/10$, observou-se redução significativa no número de células para todos os extratos quando comparados aos controles. Ou seja, nestas concentrações, a taxa de recuperação celular para o extrato fluido de chá-verde foi de somente $16,15 \pm 4,64$ %, de $8,11 \pm 2,01$ % para o hidroglicólico, de $1,51 \pm 0,16$ % para o extrato de erva-mate, e de $0,44 \pm 0,10$ % para o extrato de girassol ($p < 0,05$; $n=3$ para todos). Com relação à viabilidade dessas populações, enquanto para ambos os extratos de chá-verde, respectivamente, somente $17,74 \pm 9,12$ % e $44,03 \pm 0,73$ % das células recuperadas encontravam-se viáveis, para os outros dois nenhuma célula viável foi observada.

Os dados obtidos nesta série de experimentos mostraram, como vários outros estudos, que inúmeras substâncias presentes em extratos vegetais podem, de fato, levar diversas linhagens celulares à morte quando utilizados em altas concentrações (Aoshima e Ooshima, 2009; Ratnam et al., 2006; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002). Por exemplo, Fedeli e colaboradores (2004) evidenciaram, em células sanguíneas de peixe, que os taninos são capazes de proteger o ADN somente em baixas concentrações. Entretanto, esses resultados permitiram selecionar concentrações inócuas às células McCoy e que seriam utilizadas nos ensaios de toxicidade induzida por radiação UV e H_2O_2 subsequentes, ou seja, $0,05 \mu\text{g/ml}$ para o extrato fluido de chá-verde, $0,31 \mu\text{g/ml}$ para o de chá-verde hidroglicólico, $0,60 \mu\text{g/ml}$ para o extrato de girassol e $0,67 \mu\text{g/ml}$ para o de erva-mate, todas correspondentes às respectivas $EC_{50}/1000$.

4.4. Toxicidade induzida por radiação UV

A pele constitui-se em uma interface entre o meio interno do organismo vivo e o meio ambiente, agindo como uma barreira para impedir ou limitar os danos causados por vários agentes exógenos de natureza química, biológica ou física. Dentre esses, está a radiação UV, a qual provoca a geração de RL; estes, por sua vez, induzem estresse oxidativo nas células expostas, resultando em dano celular seguido de possível morte por necrose ou apoptose.

Uma metodologia *in vitro* muito explorada quando se deseja avaliar o potencial protetor de substâncias sobre estruturas celulares e, em particular,

sobre o ADN, propõe provocar danos às células de interesse por meio da simulação de radiação UV (Honda et al., 2008; Polte e Tyrrell, 2004). Ainda, a literatura cita que doses de radiação UV entre 5 e 100 J/cm² sobre células cultivadas *in vitro* podem simular os danos causados pela exposição excessiva aos raios solares (Struwe et al., 2007; Heo et al., 2001; Labat-Robert et al., 2000).

No contexto do nosso trabalho, com o objetivo de se avaliar o papel protetor que os extratos de chá-verde, girassol e erva-mate poderiam exercer, células McCoy foram cultivadas por 24 horas a 37 °C, com o objetivo de atingir ≥80 % de confluência; em seguida, foram irradiadas com doses selecionadas e controladas de radiação UV, conforme descrito na seção de Material e Métodos, com a finalidade de se estabelecer a dose necessária para causar efeito sobre a proliferação celular, porém sem influir em sua viabilidade. Na sequência, após 24 horas de repouso a 37 °C, o número de células recuperadas e sua viabilidade foram avaliados e os resultados estão demonstrados na Figura 13.

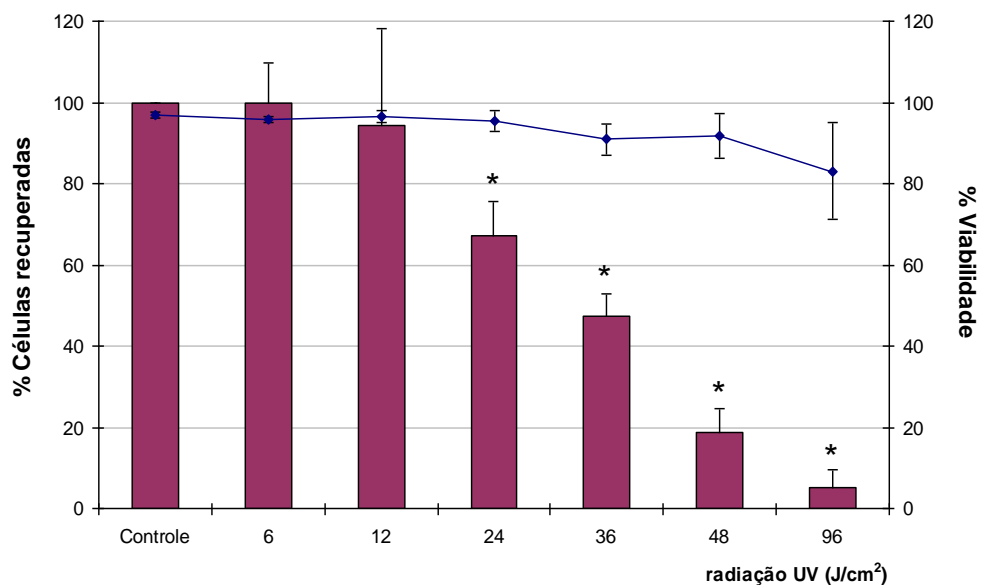


Figura 13 - Efeito da radiação UV sobre células McCoy. Células McCoy (10^6 células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos até atingirem 80% de confluência. Em seguida, os frascos foram submetidos às doses indicadas de radiação UV. Cada barra representa a porcentagem média \pm 1DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem média de viabilidade \pm 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. * $p < 0,05$ em relação ao controle não irradiado.

Como esperado, a radiação UV demonstrou habilidade em diminuir, de acordo com a dose, o número de células McCoy recuperadas nas condições experimentais propostas. Esta queda não foi acompanhada de declínio na viabilidade celular em todas as doses ensaiadas, cujos valores permaneceram acima de 90 %, muito próximos dos valores encontrados para a população controle, para a qual se observou $97,02 \pm 0,72$ %.

Máximo efeito inibidor da proliferação foi observado para 96 J/cm^2 , com somente $5,28 \pm 4,25$ % de células recuperadas. Nesta dose, a viabilidade da população foi de $83,00 \pm 11,94$ %. Já a 24 e 36 J/cm^2 , foi possível a recuperação de $67,07 \pm 8,63$ e $47,46 \pm 5,52$ % das células, respectivamente. Com esta série de experimentos, estabeleceu-se que a dose de 36 J/cm^2 , por reduzir em cerca de 50 % a população inicial, mas com preservação da sua viabilidade, seria a empregada para se estudar os efeitos dos extratos vegetais sobre células McCoy após irradiação UV.

4.5. Efeito de extratos vegetais sobre células McCoy irradiadas

Já está bem estabelecido que os antioxidantes têm a propriedade de aumentar a resistência do organismo frente à irradiação, proporcionando proteção contra as espécies reativas de oxigênio (Yoo et al., 2008; Kaur, Kapila e Agrawal, 2007; Ratnam et al., 2006; Scandalios, 2005). Tendo em vista a significativa capacidade antioxidante demonstrada pelos extratos de chá-verde, girassol e erva-mate nos ensaios do DPPH• e do complexo fosfomolibdênico, investigou-se sua ação sobre o comportamento de células McCoy irradiadas. Para tanto, essas células previamente confluentes foram expostas por 24 horas aos extratos nas concentrações estabelecidas no item 4.3 desta seção. Em seguida, foram irradiadas com a dose de 36 J/cm^2 e re-incubadas por mais 24 horas a 37°C . Os resultados desses experimentos estão ilustrados na Figura 14.

O tratamento com extrato de chá-verde hidroglicólico a $0,31 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ($\text{EC}_{50}/1000$) foi suficiente para inibir a ação deletéria da radiação UV sobre células McCoy. Ainda, cerca de 17 % a mais de células foram recuperadas, quando em comparação com células irradiadas e não tratadas com o extrato, sugerindo um efeito citoprotetor e estimulante da proliferação. Já os extratos de girassol e erva-mate, embora ricos em substâncias antioxidantes e capazes de

responder efetivamente contra agressores externos (Bastos et al., 2006; Lunceford e Gugliucci, 2005; Costa, Gallego e Tomaro, 2002; Gallego, Benavides e Tomaro, 1996), não demonstraram ser eficientes em proteger as células McCoy do dano imposto pela radiação UV, pelo menos no modelo experimental proposto.

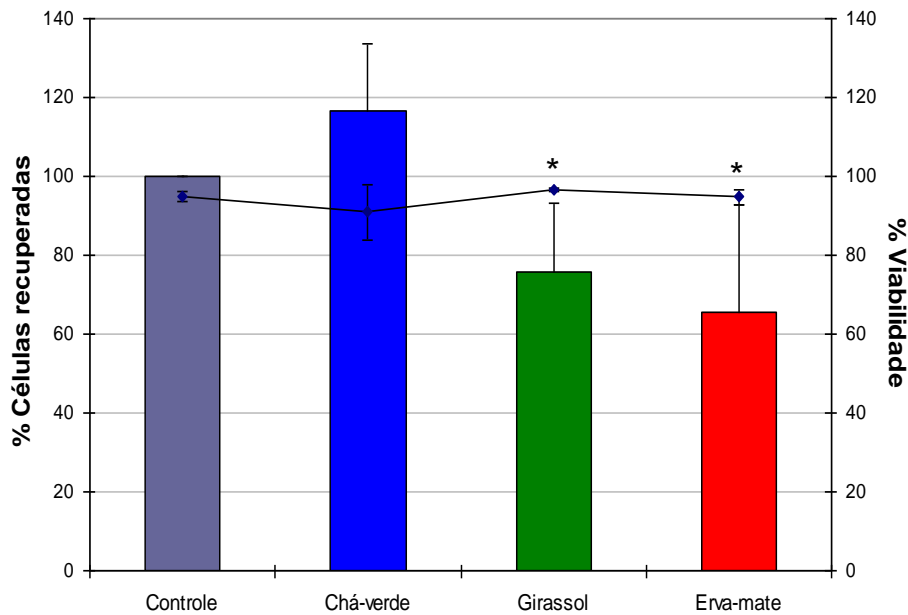


Figura 14 - Efeito dos extratos comerciais de chá-verde, girassol e erva-mate sobre células McCoy após irradiação UV. Células McCoy foram previamente expostas por 24 horas a doses de 0,31 µg/ml do extrato hidroglicólico de chá-verde, 0,60 µg/ml do extrato de girassol, e 0,67 µg/ml do extrato de erva-mate e, em seguida, irradiadas com 36 J/cm² de radiação UV. Cada barra representa a porcentagem média ± DP de células recuperadas de, pelo menos, três experimentos independentes, após 24 horas a 37 °C. A curva representa a porcentagem de viabilidade média ± 1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. **p*<0,05 em relação ao extrato de chá-verde.

Assim, com a finalidade de se investigar com mais detalhes os efeitos demonstrados pelo chá-verde, células McCoy foram tratadas com concentrações intermediárias, não-tóxicas, dos extratos hidroglicólico e fluido, equivalentes às respectivas EC₅₀/250 e EC₅₀/500. Os resultados, ilustrados nas Figuras 15 e 16, confirmaram os efeitos previamente observados e significativos contra a radiação UV (n=3; *p*≤0,05).

Para as concentrações de 0,62 e 1,25 µg/ml do extrato hidroglicólico, foram recuperadas $1,25 \pm 0,05 \times 10^6$ e $1,27 \pm 0,09 \times 10^6$ células, respectivamente, correspondendo a um valor aproximadamente 25 % maior em número de células recuperadas quando comparado com o grupo controle. Na concentração de 0,31 µg/ml também foi observada proteção significativa, com um aumento em torno de 19 % das células recuperadas quando em comparação com o controle.

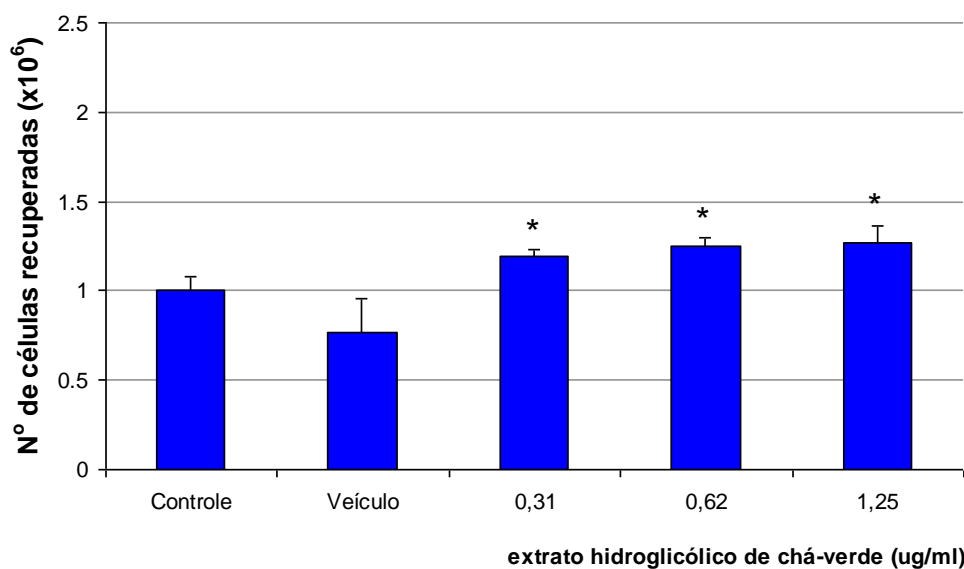


Figura 15 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde sobre células McCoy após irradiação UV. Células McCoy, previamente expostas por 24 horas a 37°C às doses descritas do extrato hidroglicólico de chá-verde, foram irradiadas com 36 J/cm² de radiação UV e re-incubadas a 37°C por mais 24 horas. Cada barra representa o número médio±DP de células recuperadas de, pelo menos, três experimentos independentes. *p≤0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

Como já foi relatado, o extrato comercial possui em sua composição alta concentração de PG como veículo; embora os dados não estejam apresentados, este foi testado, de forma isolada, no mesmo protocolo experimental e nenhum efeito foi observado, sugerindo que os responsáveis pela ação descrita são exclusos constituintes do extrato de chá-verde.

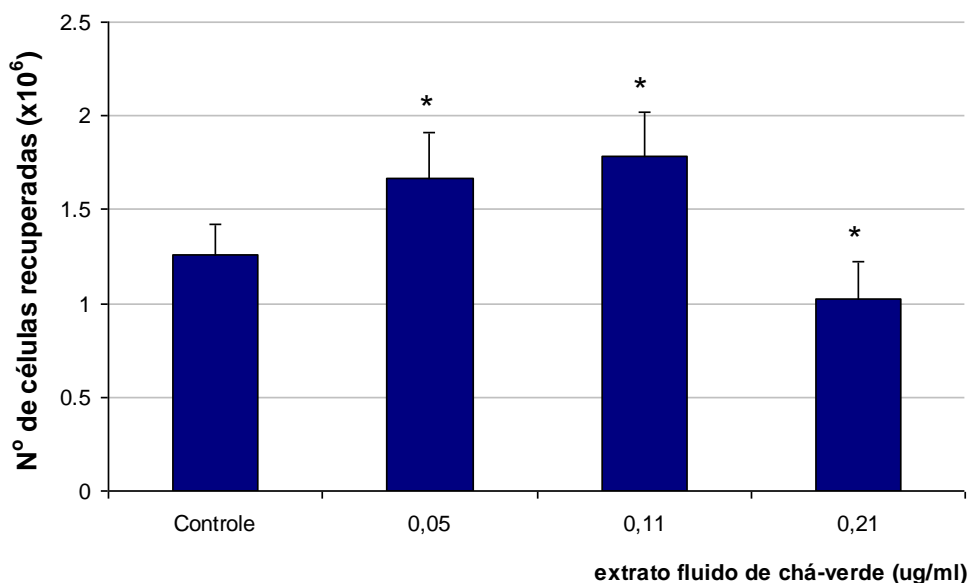


Figura 16 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre células McCoy após irradiação UV. Células McCoy, previamente expostas por 24 horas a 37°C às doses descritas do extrato fluido de chá-verde, foram irradiadas com 36 J/cm² de radiação UV e re-incubadas a 37°C por mais 24 horas. Cada barra representa o número médio±DP de células recuperadas de, pelo menos, três experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle irradiado, não tratado.

Já para o extrato fluido, foi verificado um efeito dependente da dose que permitiu a recuperação, para as concentrações de 0,05 e 0,11 µg/ml, de $1,67 \pm 0,24 \times 10^6$ e $1,78 \pm 0,23 \times 10^6$ células McCoy, respectivamente, representando incrementos significativos de 33 e 42 % de células recuperadas em relação ao controle ($n=3$; $p \leq 0,05$). Efeito interessante foi observado quando as células foram pré-tratadas com 0,21 µg/ml de extrato fluido, onde se recuperou apenas $1,02 \pm 0,17 \times 10^6$ células, ou seja, somente 81,7 % da população inicialmente irradiada, em comparação com o controle.

Assim como observado para o potencial antioxidante, os efeitos obtidos com o extrato fluido de chá-verde foram mais intensos do que aqueles evidenciados com o extrato hidroglicólico, provavelmente porque se trata de um extrato mais concentrado em substâncias fitoquímicas ativas.

4.6. Toxicidade induzida pelo H₂O₂

Da mesma forma como a radiação UV, o peróxido de hidrogênio também é capaz de lesar membranas e organelas celulares, podendo ocasionar danos

irreversíveis às células (Piao et al., 2008; Steenkamp et al., 2005; Polte e Tyrrell, 2004; Singh, 2000).

Com o objetivo de investigar se esses mesmos extratos poderiam proteger células McCoy de um insulto químico, uma nova série de experimentos foi realizada. Para tanto, concentrações crescentes de H₂O₂ foram inicialmente avaliadas para se estabelecer a dose necessária para interferir na proliferação celular, porém com preservação da viabilidade. Células McCoy foram, então, expostas a várias concentrações de peróxido de hidrogênio por 30 minutos e, em seguida, avaliadas quanto ao número e viabilidade. Os resultados estão apresentados na Figura 17.

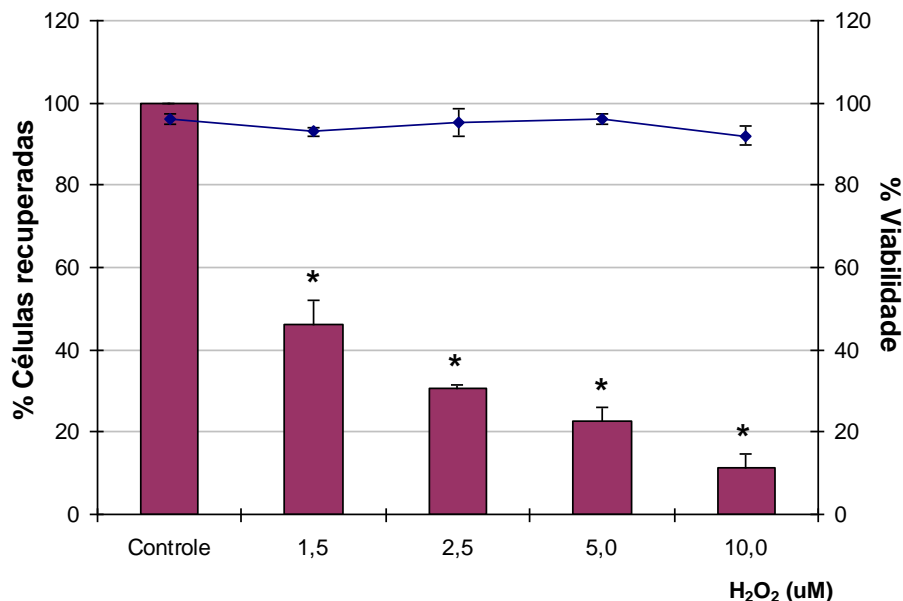


Figura 17 - Efeito do H₂O₂ sobre células McCoy. Células McCoy (10⁶ células/frasco) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e antibióticos até atingirem cerca de 80% de confluência. Em seguida, foram tratadas com as concentrações indicadas de H₂O₂ por 30 minutos e re-incubadas por mais 24 horas a 37°C. Cada barra representa a porcentagem média±1DP de células McCoy recuperadas após tripsinização de, pelo menos, três experimentos independentes. A curva representa a porcentagem média de viabilidade±1DP dessas células, obtida após tratamento com azul de Trypan. **p*<0,05 em relação ao controle não tratado.

Semelhante ao observado nos experimentos envolvendo radiação UV, porém de forma muito mais drástica, o H₂O₂ também interferiu significativamente, de acordo com a dose, no número de células recuperadas

(n=3; $p<0.05$). Por exemplo, na menor dose utilizada, 1,5 μM , somente $46,04 \pm 5,91$ % das células foram recuperadas. Máximo efeito inibidor da proliferação foi observado a 10 μM , com menos de 12 % de células recuperadas. Entretanto, nesta mesma dose, a viabilidade da população foi de $92,03 \pm 2,42$ %. Já nas doses intermediárias de 2,5 e 5,0 μM , foi possível a recuperação de somente $30,79 \pm 0,85$ e $22,47 \pm 3,36$ % das células, respectivamente, porém com viabilidade superior, em ambos os casos, a 95 %. Em nenhuma dose, portanto, se observou declínio na viabilidade celular, a qual permaneceu muito próxima dos valores encontrados para a população controle, para a qual aqui também se atribuiu o valor de 100 %.

Com esta série de experimentos, estabeleceu-se que a dose de 1,5 μM de H_2O_2 , por reduzir em cerca de 50 % a população inicial, com preservação da sua viabilidade, seria a empregada para se estudar os efeitos de extratos de plantas sobre células McCoy contra insulto químico.

4.7. Efeito de extratos vegetais sobre células McCoy tratadas com H_2O_2

Grassman e colaboradores (2002) descreveram que o ânion superóxido e o H_2O_2 são substâncias que podem se difundir por grandes distâncias e até mesmo atravessar membranas. Em seu livro, Augusto Ohara (2006) relata que Rogério Meneghini e seu grupo sugeriram, já na década de 80, que o H_2O_2 atravessaria a membrana celular chegando ao núcleo, onde geraria radical hidroxil *in situ*, em razão dos metais de transição (Fe^{+2}) ligados ao ADN, levando à lesão desta biomolécula.

Alguns estudos sugerem, também, que baixas concentrações de catequinas, principalmente EGCG e ECG extraídas do chá-verde são capazes de capturar o H_2O_2 e inibir substancialmente danos ao ADN *in vitro*, além de aumentar a viabilidade celular, sugerindo um importante papel destas moléculas na atividade antioxidante do chá-verde (Coyle et al., 2008; Wei et al., 1999).

Esses relatos nos levaram a investigar os efeitos dos extratos hidroglicólico e fluido de chá-verde, ambos contendo EGCG conforme demonstrado no item 4.2 desta seção, quanto à capacidade de proteger células McCoy contra danos provenientes de exposição aguda ao H_2O_2 . Os resultados estão demonstrados nas Figuras 18 e 19.

Um efeito protetor significativo, representado pelo aumento da atividade proliferativa e independente da presença do PG, foi observado para o extrato hidroglicólico em comparação ao grupo controle ($2,61 \pm 0,60 \times 10^6$), após exposição ao H_2O_2 somente a $1,25 \mu\text{g/ml}$, com $3,14 \pm 0,50 \times 10^6$ células recuperadas ($n=3$; $p<0,05$). Em contraste, nas doses menores houve um declínio significativo na proliferação celular ($n=3$; $p<0,05$), sugerindo que a exposição prévia a baixas concentrações do extrato não preveniu os efeitos deletérios do H_2O_2 sobre as células fibroblásticas.

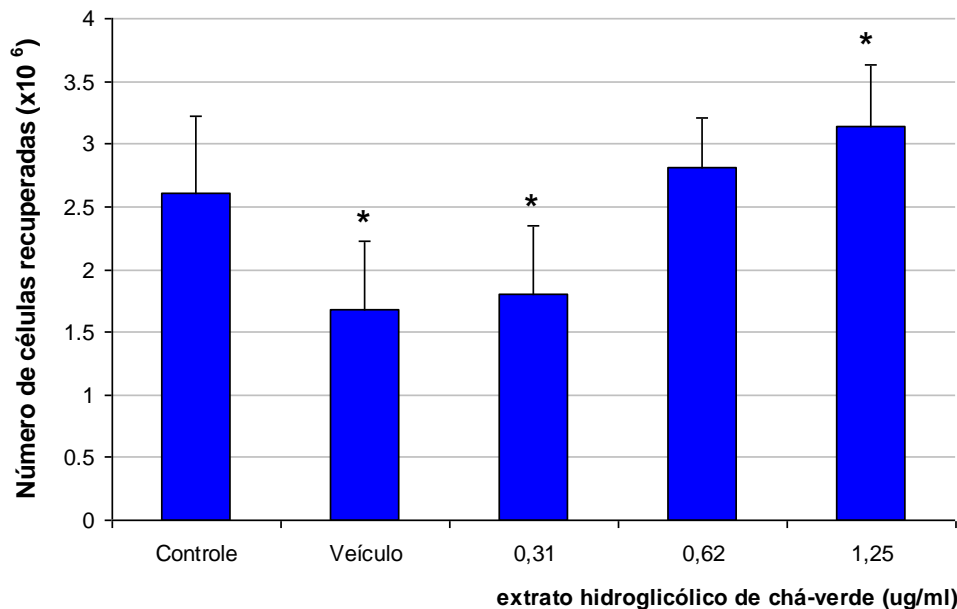


Figura 18 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde sobre células McCoy após exposição ao H_2O_2 . Células McCoy, previamente expostas por 24 horas a 37°C às doses indicadas do extrato hidroglicólico de chá-verde, foram tratadas com $1,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 por 30 minutos. Em seguida, foram re-incubadas por mais 24h a 37°C . Cada barra representa o número médio \pm DP de células recuperadas de, pelo menos, três experimentos independentes. * $p\leq 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Com relação ao extrato fluido (Figura 19), ao contrário do que foi observado nos ensaios que utilizaram radiação UV como agente agressor, nenhuma proteção sobre células McCoy após exposição ao H_2O_2 foi observada e o perfil demonstrado com o extrato hidroglicólico se repetiu, isto é, nas

concentrações de 0,05 e 0,11 µg/ml, por exemplo, foram recuperadas apenas $7,2 \pm 0,15 \times 10^5$ e $6,3 \pm 0,35 \times 10^5$ células, respectivamente, números esses significativamente inferiores ($n=3$; $p<0,05$) àqueles obtidos para o controle ($8,68 \pm 0,66 \times 10^5$); para a dose de 0,21 µg/ml, foram recuperadas $8,3 \pm 3,29 \times 10^5$ células.

Esses resultados foram, de certa forma, inesperados, uma vez que muitos artigos científicos têm apontado para as propriedades protetoras dos componentes do chá-verde em ensaios semelhantes. Ou seja, devido à presença de muitas substâncias antioxidantes nesses extratos, esperava-se uma elevada capacidade de captura de ERO no sistema e o conseqüente bloqueio do dano celular induzido pelo H_2O_2 (Yusuf et al., 2007; Coimbra et al., 2006; Wei et al., 2006).

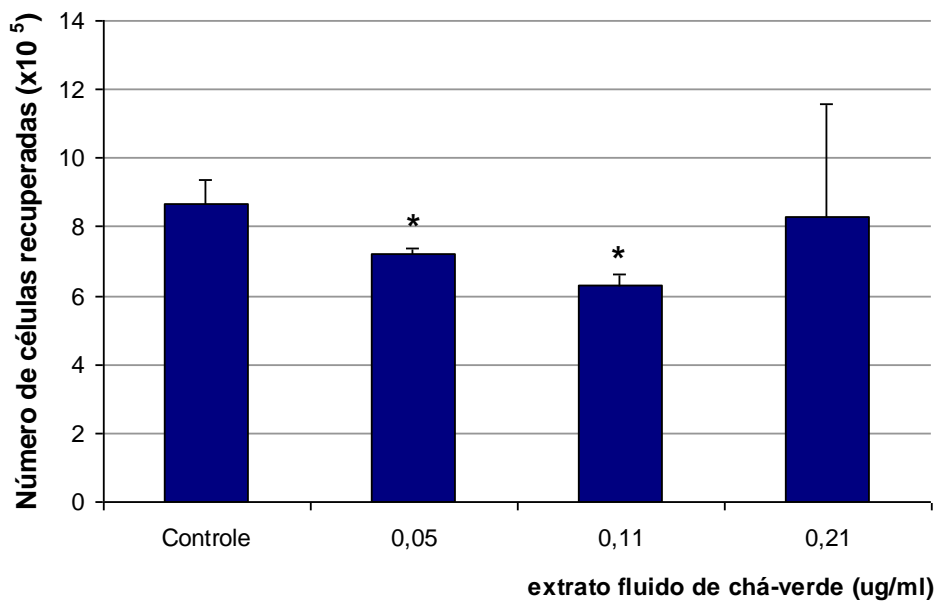


Figura 19 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre células McCoy após exposição ao H_2O_2 . Células McCoy, previamente expostas por 24 horas a 37°C às doses indicadas do extrato fluido de chá-verde, foram tratadas com 1,5 µM de H_2O_2 durante 30 minutos. Em seguida, foram re-incubadas por mais 24h a 37°C. Cada barra representa o número médio±DP de células recuperadas de, pelo menos, três experimentos independentes. * $p\leq 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Evidências, entretanto, vêm indicando que os polifenóis do chá-verde, em particular a EGCG, quando em solução, podem gerar H_2O_2 espontaneamente, tornando-se pró-oxidantes (Nakagawa et al., 2004;

Yamamoto et al., 2003; Yang et al., 2002). Se este fenômeno ocorre em um sistema biológico *in vitro* envolvendo células, por exemplo, observam-se efeitos danosos, com o comprometimento não só da proliferação como também da viabilidade celular (Chai, Long e Halliwell, 2003; Kondo et al., 1999).

A inibição da proliferação celular observada para as doses mínimas dos extratos de chá-verde utilizados talvez esteja relacionada ao excesso de H₂O₂ presente no meio, para o qual não houve quantidade suficiente de moléculas antioxidantes capazes de neutralizá-lo. Assim, investigar os níveis de H₂O₂ produzidos no sistema experimental usado poderia esclarecer se este foi o mecanismo do efeito inibidor observado.

Recentemente, Sen e colaboradores (2006) relataram que, em cultura de fibroblastos de hamster submetidos a estresse agudo induzido por UV e H₂O₂, houve inibição da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB, preservando a resposta apoptótica normal das células. É possível que semelhante efeito possa ter ocorrido quando as células McCoy, previamente tratadas com as doses mais elevadas do extrato de chá-verde, foram expostas aos agentes citados, mantendo-se viáveis por mais tempo.

Embora surpreendentes, os resultados aqui descritos corroboram com aqueles relatados por Riso (2002), quando utilizou um contexto experimental semelhante, mas com células da linhagem Jurkat, provenientes de paciente portador de leucemia linfóide aguda, ou com o estudo de Gleib e colegas (2003), no qual um extrato de chá-verde inibiu a proliferação de células humanas de cólon, causando dano ao seu ADN.

Na literatura, não existem relatos sobre os efeitos de extratos de chá-verde sobre células McCoy e, muitas vezes, os efeitos produzidos com certas linhagens de células não se reproduzem em outras devido às características intrínsecas de cada população. Além disso, é necessário considerar a composição específica dos extratos estudados, lembrando que o extrato fluido foi preparado de forma padronizada, sem adição de agentes conservantes, e que muitos outros fatores podem ser responsáveis pela ausência de efeito protetor contra o insulto celular provocado pelo H₂O₂ nas condições experimentais utilizadas.

4.8. Efeito dos extratos de chá-verde sobre células humanas

Muitos dos efeitos benéficos descritos para o chá-verde envolvem a utilização de modelos animais, dentre eles os camundongos. Já os estudos dos mecanismos antioxidantes, pelos quais alguns benefícios se manifestam, têm sido realizados em sistemas *in vitro*, usando linhagens celulares animais e humanas. Nestes, o mecanismo de ação principal, ou seja, proteção contra os danos provocados por RL, foi postulado (Lambert e Yang, 2003), sendo as catequinas e, em especial a EGCG, as substâncias responsabilizadas pelos efeitos observados, uma vez que constituem entre 30 e 40 % do peso seco de uma xícara de chá-verde (Cherubini, Beal e Frei, 1999). Estas catequinas parecem sofrer biotransformação considerável e deter baixa biodisponibilidade (Yang et al., 2002), sendo que seres humanos e camundongos são similares quanto à sua biotransformação. Entretanto, quando comparados entre si, os camundongos demonstram maior eficiência com relação à transformação enzimática da EGCG (Yang et al., 2002).

Devido às discrepâncias observadas em alguns dos efeitos mediados pelos extratos fluido e hidroglicólico de chá-verde sobre as células fibroblásticas de camundongo McCoy, decidiu-se proceder uma nova série de experimentos com radiação UV, mas usando-se, desta vez, células humanas como modelo experimental. Para tanto, a linhagem celular comercial NHDF, composta de fibroblastos dermais humanos, foi a selecionada. Ainda, na metodologia, utilizou-se o corante cristal violeta como revelador dos efeitos no sistema, uma vez que este tem a capacidade de ligar-se ao ADN de células viáveis; ao lisar essas células, o corante é liberado no sobrenadante, gerando uma coloração violeta intensa proporcional à quantidade de células íntegras que o incorporaram, a qual é mensurada espectrofotometricamente. Dessa forma, é possível diferenciar, após um insulto, se ocorreu proteção celular ou não. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Para o extrato hidroglicólico, somente nas doses de 1,56 e 3,12 µg/ml obteve-se proteção significativa dos fibroblastos humanos ($n=3$; $p<0,05$), com respectivamente 12 e 23 % a mais de células íntegras em relação ao controle (Figura 20-A), independente da presença do PG (Figura 20-B).

Já o extrato fluido demonstrou ser mais eficiente em termos de proteção às células, uma vez que, em todas as concentrações ensaiadas, ação significativa foi observada ($n=3$; $p<0,05$). Os resultados obtidos, de acordo com as doses, variaram entre 29 e 51 % em relação ao controle (Figura 21).

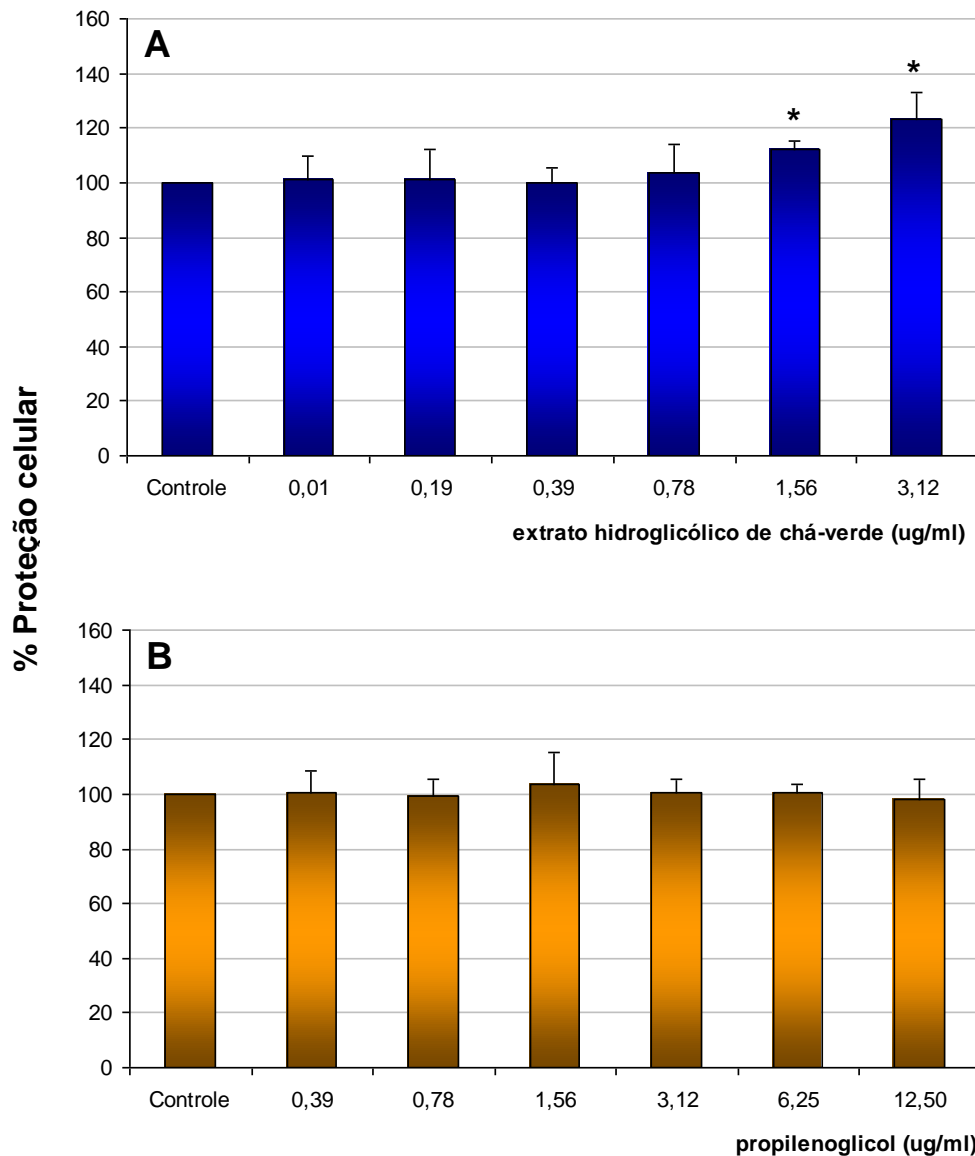


Figura 20 - Efeito do extrato hidroglicólico de chá-verde e propilenoglicol sobre fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas do extrato hidroglicólico de chá-verde (A) e do propilenoglicol (B) foram irradiados com 5 J/cm² de radiação UV. Em seguida, foram re-incubados por mais 24 horas. Cada barra representa a porcentagem média±DP de células com ADN íntegro, obtida após tratamento com cristal violeta de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. * $p<0,05$ em relação ao controle irradiado, não tratado.

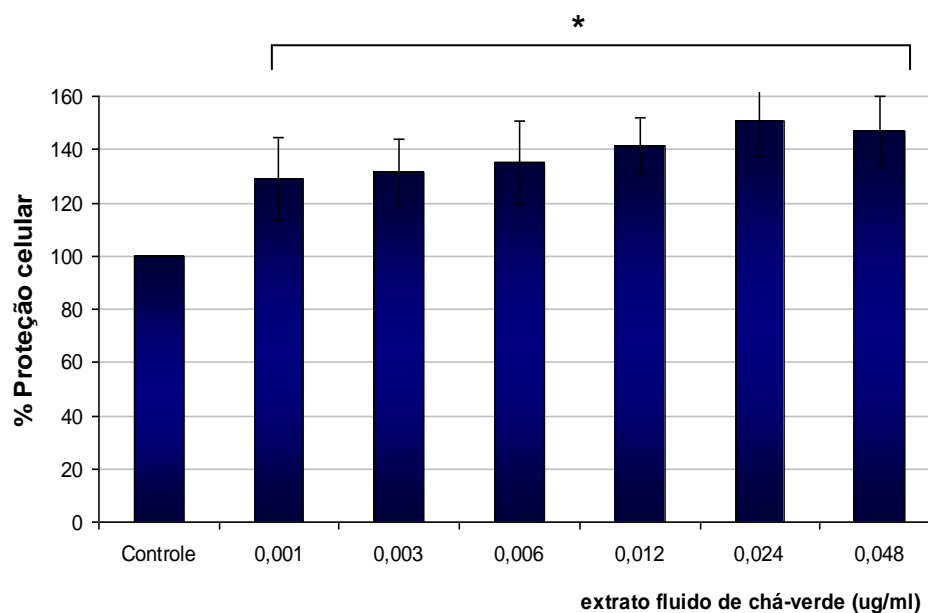


Figura 21 - Efeito do extrato fluido de chá-verde sobre fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas do extrato fluido de chá-verde foram irradiados com 5 J/cm² de radiação UV. Em seguida, foram re-incubados por mais 24 horas. Cada barra representa a porcentagem média±DP de células com ADN íntegro, obtida após tratamento com cristal violeta de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p*<0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

Os resultados obtidos com fibroblastos humanos apresentaram perfil de proteção contra a radiação UV semelhante ao observado com fibroblastos de camundongo e vieram a reforçar a hipótese que relaciona a atividade antioxidante à manutenção de um equilíbrio oxidativo *in vitro*, representado aqui pela proteção celular contra um insulto físico imposto.

4.9. Mensuração de enzimas metaloproteinases (MMP)

As MMP compreendem uma família de endoproteinases com funções importantes na dinâmica de remodelamento da matriz extracelular, como já abordado na introdução deste trabalho. O envelhecimento precoce tem, como um de seus principais fatores desencadeadores, a destruição do colágeno mediada pelas MMP. Portanto, a regulação das atividades dessas enzimas poderia ser adotada como uma estratégia na prevenção dos danos da pele causados pela radiação UV.

Inúmeros autores descrevem que a radiação UV induz, *in vivo*, aumento da produção de MMP, como as MMP-1, -9 e -12, em contraste com a depleção das enzimas antioxidantes endógenas SOD e CAT. Esse conjunto de ações levaria a uma alteração da matriz extracelular e contribuiria com o desequilíbrio oxidativo, podendo ativar outros processos, como a produção de citocinas, ou fatores de transcrição nuclear, promovendo dano às células e tecidos (Shin et al., 2008; Seo e Chung, 2006; Svobodova, Walterova e Vostalova, 2006; Polte e Tyrrell, 2004; Fisher et al., 1997).

Com o objetivo de esclarecer se alguns desses mecanismos de ação estariam envolvidos nos efeitos protetores observados para os extratos hidroglicólico e fluido de chá-verde contra a radiação UV, avaliou-se a produção de MMP-1, -9 e -13 nos sobrenadantes das culturas de fibroblastos humanos irradiados e previamente tratados com esses extratos.

Os resultados, ilustrados nas Figuras 22, 23 e 24, demonstraram que o tratamento com extrato hidroglicólico de chá-verde não influencia a produção das enzimas MMP-1, -9 e -13, em contraste com os efeitos observados para o extrato fluido, o qual promoveu discreta, mas significativa, queda nos níveis de MMP-1 e -13 nas doses de 0,024 e 0,048 µg/ml (n=3; $p < 0,05$). Para a MMP-9, nessas doses, foram observadas reduções de 30 e 54 %, respectivamente, em relação ao controle.

Portanto, é possível que os efeitos protetores observados para os extratos, em particular o fluido, de chá-verde frente à radiação UV, tanto em células murinas como humanas, nos sistemas de cultivo *in vitro* adotados estejam diretamente relacionados com os mecanismos que envolvem a ativação das MMP, preservando, assim, a integridade dos componentes da matriz extracelular produzidos durante a sua proliferação *in vitro*. Ainda, é interessante salientar que, em várias situações durante os experimentos, observou-se “certa” resistência à tripsinização das células tratadas com os extratos, sugerindo uma alteração na matriz extracelular. Neste contexto, a citometria de fluxo poderia ser um instrumento valioso para investigar se há alteração da expressão de moléculas de adesão e/ou de seus receptores nessas células mediada pelos constituintes do extrato de chá-verde.

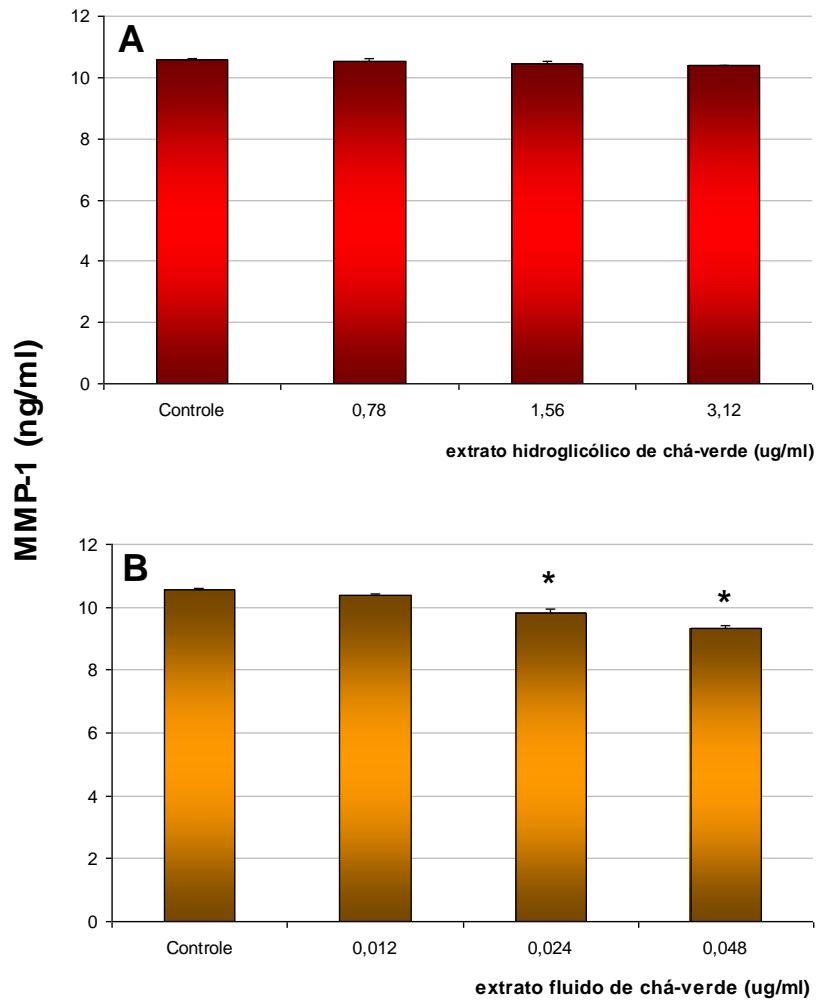


Figura 22 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-1 em fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas dos extratos hidroglicólico (A) e fluido (B) de chá-verde foram irradiados com 3 J/cm² de radiação UV. Após re-incubação de 24 horas, o sobrenadante foi coletado e a concentração de MMP-1 mensurada por ELISA. Cada barra representa a concentração média±DP de MMP-1 de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p*<0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

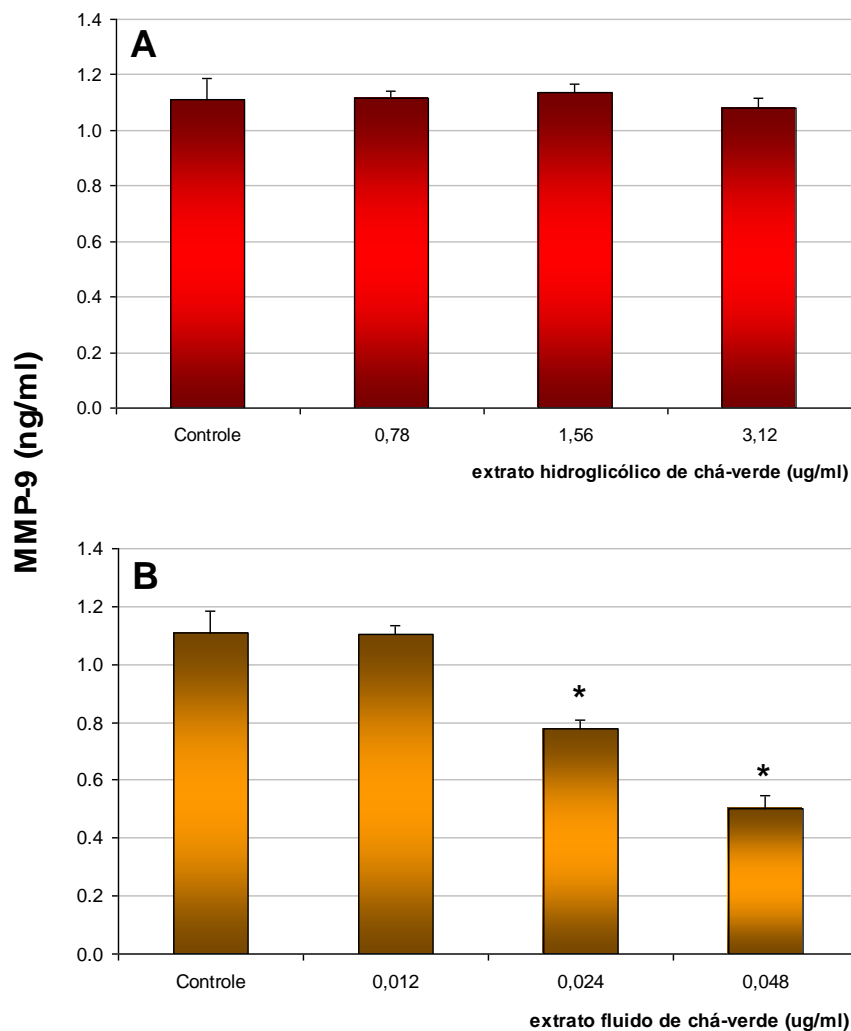


Figura 23 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-9 em fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas dos extratos hidroglicólico (A) e fluido (B) de chá-verde foram irradiados com 3 J/cm² de radiação UV. Após 24 horas a 37°C, com 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado e a concentração de MMP-9 mensurada por ELISA. Cada barra representa a concentração média±DP de MMP-9 de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p*<0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

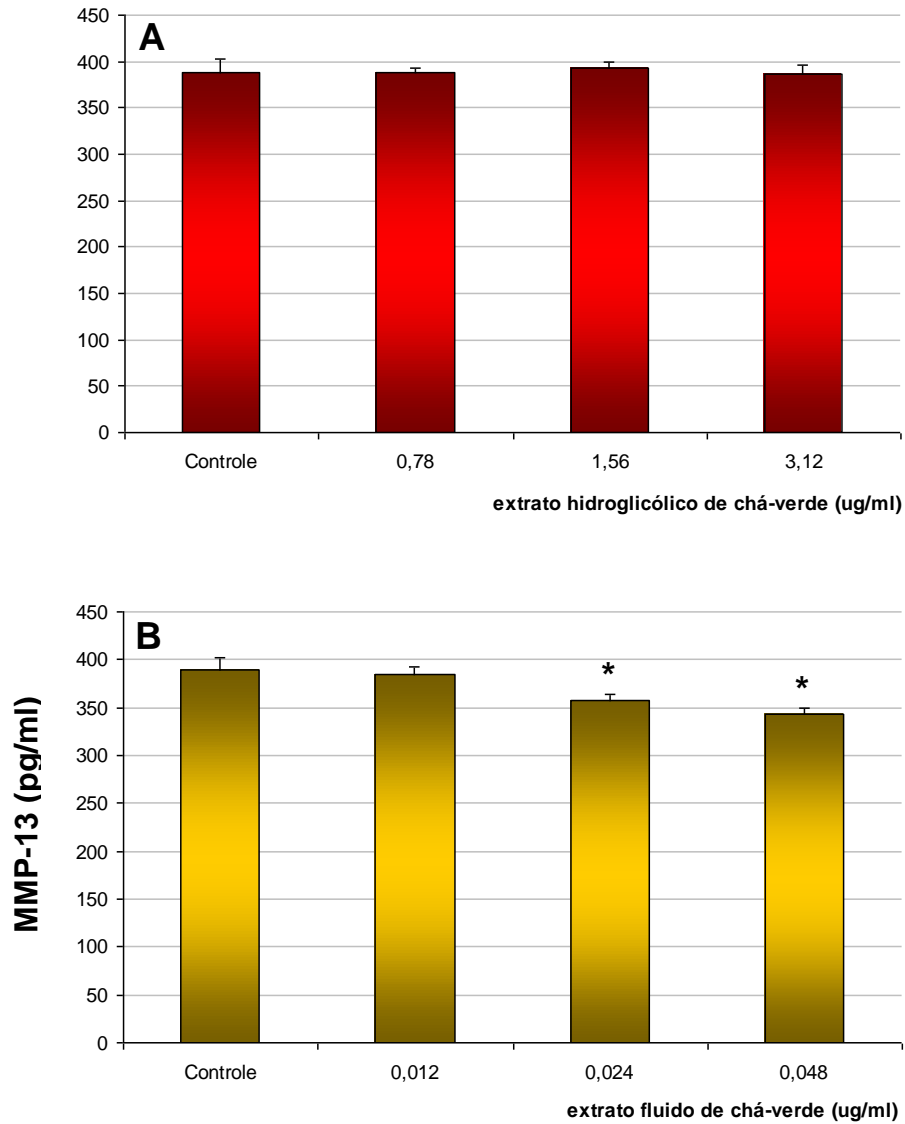


Figura 24 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre produção de MMP-13 em fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas dos extratos hidroglicólico (A) e fluido (B) de chá-verde foram irradiados com 3 J/cm² de radiação UV. Após 24 horas a 37°C, com 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado e a concentração de MMP-13 mensurada por ELISA. Cada barra representa a concentração média±DP de MMP-13 de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p*<0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

4.10. Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes

Na tentativa de reverter o dano oxidativo gerado pelo excesso de ERO, a epiderme humana possui mecanismos antioxidantes eficientes e superiores àqueles encontrados em muitos tecidos. A redução na eficiência destes sistemas parece ser um fator crucial no fotoenvelhecimento. Esses mecanismos incluem, por exemplo, o aumento da estabilidade física contra o dano oxidativo, a prevenção da formação endógena de ERO, a eficiência nos mecanismos de reparação e no sistema de homeostase redox (Kohen e Gati, 2000).

Dentre as várias enzimas envolvidas na captura de ERO, estão a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), como já referidas na introdução deste trabalho. Pela importância dessas moléculas nos mecanismos endógenos de proteção, avaliaram-se os efeitos do tratamento prévio de células fibroblásticas humanas irradiadas com os extratos hidroglicólico e fluido de chá-verde sobre os níveis citossólicos de SOD e CAT.

Os resultados estão apresentados na Figura 25 e mostram que houve um aumento significativo, dependente da dose, dos níveis de ambas as enzimas quando se tratou as células com extrato fluido de chá-verde (Figura 25-A), alcançando concentrações mais de 100 % superiores em relação ao grupo controle em todas as doses utilizadas ($n=3$; $p<0,05$), em contraste com o hidroglicólico (Figura 25-B), o qual demonstrou ação discreta e não significativa.

As enzimas SOD e CAT atuam juntas e de forma específica, para neutralizar e/ou decompor as ERO em excesso, transformando-as em espécies menos reativas; estas enzimas são ainda mais potentes em insultos agudos que provocam estresse oxidativo, como aquele provocado pela radiação UV. Também, mostram-se capazes, em conjunto com antioxidantes não-enzimáticos de estrutura polifenólica, de inibir significativamente a quebra do ADN celular (Hadi et al., 2007; Ratnam et al., 2006; Scandalios, 2005). Dessa forma, é possível que os extratos tenham influência na produção/atividade de enzimas antioxidantes, as quais ajudariam na captura e neutralização dos RL e outras substâncias oxidantes produzidas pela radiação UV, protegendo as células do dano e conseqüente morte. Ainda, pode-se sugerir que a intensidade diferenciada de ação dos extratos fluido e hidroglicólico de chá-

verde com relação aos níveis de SOD e CAT esteja ligada à concentração de substâncias com potencial antioxidante neles presentes, que, como já vimos pelo menos em relação aos polifenóis, é maior no extrato fluido.

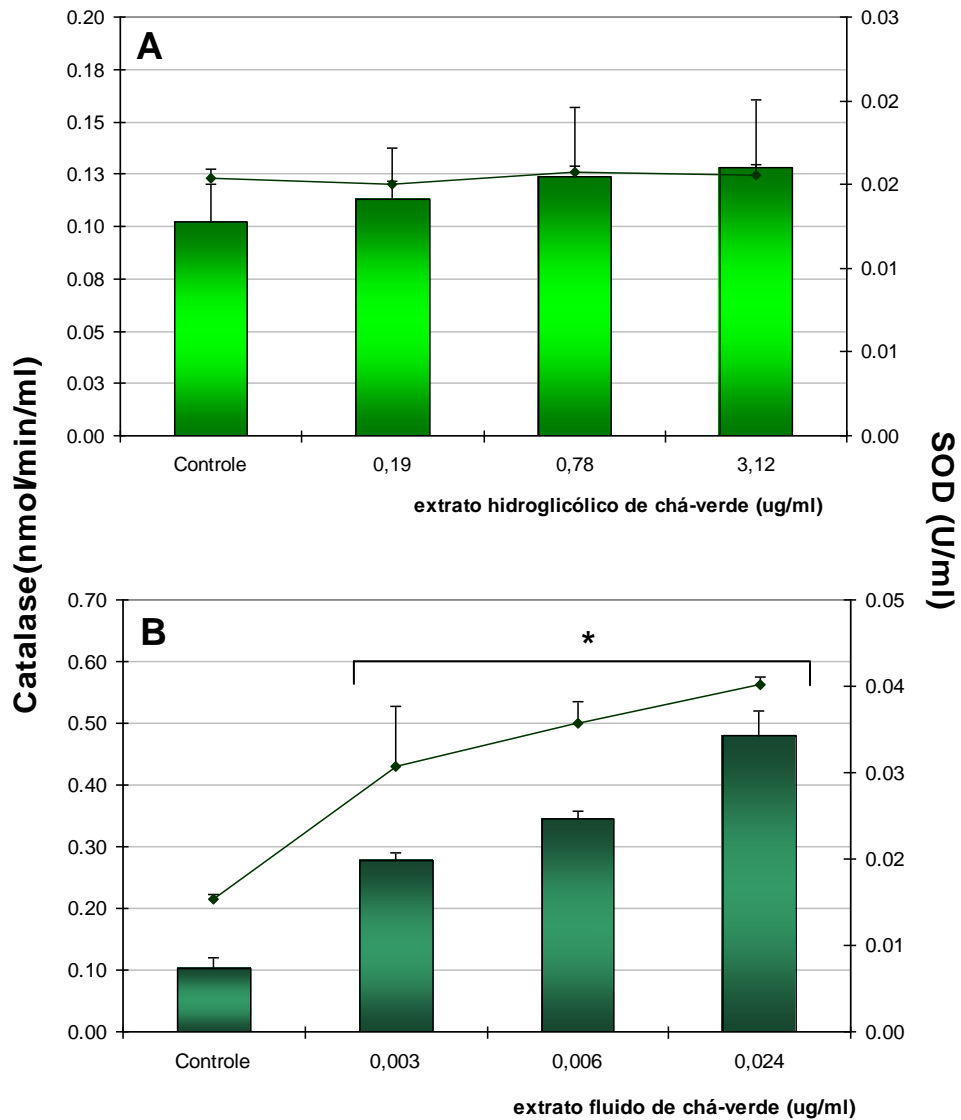


Figura 25 - Efeito dos extratos de chá-verde sobre a atividade de SOD e CAT em fibroblastos humanos após irradiação UV. Fibroblastos humanos, previamente expostos por 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂, às doses indicadas dos extratos hidroglicólico (A) e fluido (B) de chá-verde foram irradiados com 3 J/cm² de radiação UV. Após 24 horas de reincubação, o lisado celular das culturas foi coletado e as atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) mensuradas em leitor de microplaca. Cada barra representa a atividade média±DP de CAT de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. As curvas representam a atividade média±DP de SOD de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p*<0,05 em relação ao controle irradiado, não tratado.

Nossos resultados estão também de acordo com relatos recentes, nos quais extratos de chá-verde contendo catequinas, principalmente EGCG, inibiram a produção de MMP e aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes endógenas, mantendo a regularidade dos processos metabólicos essenciais às células (Bae et al., 2008; Kim e Chung, 2008; Yoo et al., 2008; Khan e Mukhtar, 2007; Lee, Chung e Cho, 2005).

Ao avaliar os dados obtidos neste trabalho, com redução na produção de todas as MMP estudadas após radiação UV, é possível propor que o extrato fluido de chá-verde esteja atuando sobre AP-1, o qual é responsável pela transcrição dos genes das MMP, especialmente MMP-1, -3 e -9 (Afaq e Mukhtar, 2006; Lee, Chung e Cho, 2005). Adicionalmente, já foi bem descrito que a radiação UV ocasiona a produção exacerbada de RL e depleção de enzimas antioxidantes endógenas, o que desequilibra o potencial redox de células e tecidos e, como consequência, ativa AP-1, NF- κ B e outros fatores de transcrição nuclear (Rabe et al., 2006, Hu et al., 2000); como o extrato em questão apresentou não só elevada atividade antioxidante, mas também capacidade de aumentar a produção de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) após irradiação, é possível que seus constituintes atuem de forma a regular o potencial redox, ocasionando a normalização da ativação dos fatores de transcrição.

Sabe-se, ainda, que o fator NF- κ B, o qual é fortemente estimulado pela radiação UV e presença de ERO, está relacionado à regulação de genes que envolvem os mecanismos responsáveis pela inflamação (citocinas), o que acarreta indiretamente a produção de MMP na matriz extracelular (Honda et al., 2008; Valko et al., 2007, Rabe et al., 2006). A redução observada nos níveis de MMP após tratamento com o extrato fluido de chá-verde pode estar relacionada à diminuição na expressão ou à ativação deste fator de transcrição nas culturas celulares testadas. Para comprovação dos mecanismos sugeridos, poder-se-ia avaliar a expressão de genes transcritos por AP-1 e NF- κ B, bem como mensurar estes fatores de transcrição em culturas celulares ou em modelos de pele reconstituída.

No caso do extrato hidroglicólico de chá-verde, no qual a concentração de EGCG é aproximadamente seis vezes menor que no extrato fluido, não foi observado efeito na produção de MMP após irradiação, sugerindo a

necessidade de altos níveis de agentes ativos nesses extratos para inibir os fatores AP-1 e NF- κ B e, assim, promover os efeitos biológicos esperados.

Em resumo, o conjunto de resultados apresentados sugere que o extrato fluido de chá-verde é superior em relação ao comercial quanto à habilidade de proteger as células fibroblásticas humanas e murinas contra os efeitos deletérios induzidos pela radiação UV *in vitro*, e que essa qualidade se deve particularmente aos seus constituintes com potencial antioxidante. Neste contexto, seu uso conjunto com filtros solares tradicionais poderia tornar os produtos mais eficientes quando se objetiva atenuar os efeitos da radiação UV sobre a pele, como sugerido por Yusuf e colegas (2007).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O processo de envelhecimento acarreta alterações na pele e a deixa susceptível a doenças. A radiação UV acelera o processo de envelhecimento, desencadeando inúmeros eventos danosos ao organismo, dentre eles a produção exacerbada de RL e o conseqüente desequilíbrio do potencial oxidativo. Uma das principais razões apontada por pesquisadores como responsável pelo envelhecimento precoce é o desequilíbrio das defesas antioxidantes de nosso organismo, o qual naturalmente possui mecanismos que estabelecem um equilíbrio harmônico entre substâncias antioxidantes e os RL produzidos. A pele, por ficar muito exposta a ataques de agentes externos que interferem em processos metabólicos variados, incluindo a formação de RL, tornou-se uma preocupação constante para as indústrias cosméticas no sentido da prevenção do envelhecimento, ou mesmo com vistas a atenuar os sinais associados a ele.

Dentre as matérias-primas que oferecem grandes benefícios quanto às ações antioxidante e antienvhecimento, estão os extratos vegetais. Isso se deve ao fato de que diversos extratos vegetais, quando aplicados em modelos animais ou em cultura de células, neutralizam a reatividade radicalar, diminuindo as lesões celulares. Esta ação protetora é, pelo menos em parte, decorrente das substâncias antioxidantes presentes nestes vegetais, que provavelmente lhes confere proteção natural contra os radicais livres formados pela radiação UV necessária à fotossíntese.

No presente trabalho, as propriedades antioxidantes de sete extratos comerciais foram estudadas pelos métodos químicos do DPPH[•] e do complexo fosfomolibdênico. Os resultados mostraram que, de fato, os extratos de chá-verde, erva-mate, girassol, *Ginkgo biloba*, gengibre, uva e artemísia incluídos neste estudo, embora em graus variáveis, são dotados de atividade antioxidante, confirmando relatos discutidos anteriormente. Entretanto, nos dois métodos químicos usados, o extrato de chá-verde demonstrou potencial antioxidante notavelmente superior quando comparado aos outros.

Devido ao fato de não haver no Brasil normas que regulamentem a preparação de extratos vegetais, associado à grande variabilidade de métodos usados para a sua obtenção, decidiu-se preparar um extrato de chá-verde de acordo com as recomendações da Farmacopéia Brasileira, com a finalidade de

se observar se diferenças no método de produção de extratos poderiam interferir em suas atividades. Os resultados foram surpreendentes, indicando a superioridade do extrato fluido quanto ao potencial antioxidante, provavelmente pela maior quantidade de polifenóis presentes, dentre eles a EGCG.

Investigou-se se estas diferenças poderiam, também, se expressar na capacidade protetora de linhagens celulares. Assim, células fibroblásticas de camundongo e humana foram tratadas com doses crescentes de ambos os extratos antes de serem submetidas a estresse oxidativo promovidos por radiação UV e H₂O₂. Mais uma vez, a coleção de dados resultantes desses experimentos, em particular os referentes à radiação UV, mostrou superioridade de ação do extrato fluido em relação ao hidroglicólico, com proteção significativamente superior das células, reveladas por meio da queda dos níveis de MMP, responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, e aumento da produção das enzimas SOD e catalase, moléculas importantes no processo de defesa antioxidante do organismo.

Ressalva deve ser feita quanto à concentração de uso de substâncias ativas, em especial aquelas com propriedades antioxidantes, pois estas podem se apresentar ora benéficas ora maléficas ao organismo. Ou seja, deve-se avaliar a faixa na qual é percebida ação antioxidante e a partir de qual concentração tal substância passa a ser tóxica, exercendo ação pró-oxidante.

Considerando a crescente procura por substâncias naturais capazes de proteger a pele contra o fotoenvelhecimento, este trabalho tem muito a contribuir, pois além de confirmar que o potencial antioxidante de extratos vegetais, em particular de chá-verde, influencia significativamente processos relacionados ao envelhecimento, como a produção de MMP e de enzimas antioxidantes endógenas, demonstrou que a forma de preparação desses ativos pode estar diretamente relacionada à intensidade dos efeitos benéficos que deles se pode extrair.

6. REFERÊNCIAS

- AFAQ, F. e MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Exp Dermatol**, v.15, n.9, p.678-684. 2006.
- ALEXIS, A. F., JONES, V. A. e STILLER, M. J. Potential therapeutic applications of tea in dermatology. **Int J Dermatol**, v.38, n.10, p.735-743. 1999.
- ALMAJANO, M. P., CARBÓ, R., JIMÉNEZ, J. A. L. e GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chem**, v.108, n.1, p.55-63. 2008.
- ANDERSON, D. e PHILLIPS, B.J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food Chem Toxicol**, v.37, n.9-10, p.1015-25. 1999.
- ANNABI, B., LACHAMBRE, M. P., BOUSQUET-GAGNON, N., PAGE, M., GINGRAS, D. e BELIVEAU, R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1542, n.1-3, p.209-220. 2002.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P.D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S. e ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, n.1, p. 183-198. 2002.
- AOSHIMA, H. e OOSHIMA, S. Anti-hydrogen peroxide activity of fish and soy sauce. **Food Chem**, v.112, n.2, p.339-343. 2009.
- ARABSHAHI-D, S., DEVI, D. V. e UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chem**, v.100, n.3, p.1100-05. 2007.
- ARBOS, K. A. **Estudo in vitro do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. Curitiba, 2004. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.
- ARCT, J. e PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clin Dermatol**, v.26, n.4, p.347-357. 2008.
- ASAWANONDA, P. e NATEETONGRUNGSA, Y. Methotrexate plus narrowband UVB phototherapy versus narrowband UVB phototherapy alone in the treatment of plaque-type psoriasis: A randomized, placebo-controlled study. **J Am Acad Dermatol**, v.54, n.6, p.1013-18. 2006.
- AZULAY, R. D. e AZULAY, D. R. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4ª. ed., p.10-11. 2006.
- BAE, J. Y., CHOI, J. S., CHOI, Y. J., SHIN, S. Y., KANG, S. W., HAN, S. J. e KANG, Y. H. (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase. **Food Chem Toxicol**, v.46, n.4, p.1298-307. 2008.
- BASTOS, D. H. M., ISHIMOTO, E. Y., MARQUES, M. O. M., FERRI, F. e TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **J Food Compos Anal**, v.19, n.6-7, p.538-543. 2006.

BASTOS, D. H., SALDANHA, L. A., CATHARINO, R. R., SAWAYA, A. C., CUNHA, I. B., CARVALHO, P. O. e EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) extracts. **Molecules**, v.12, n.3, p.423-432. 2006.

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **J Pathol**, v.211, n.2, p.241-251. 2007.

BAYDAR, N. G., ÖZKAN, G. e YAŞAR, S. Evaluation of antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v.18, n.9, p.1131-36. 2007.

BIXBY, M., SPIELER, L., MENINI, T. e GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**, v.77, n.3, p.345-358. 2005.

BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W. e BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm Wiss Technol**, v.30, p.609-615. 1997.

BOYERA, N., GALEY, I. e BERNARD, B. A. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. **Int J Cosmet Sci**, v.20, p.151-158. 1998.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. e BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol**, v.28, n.1, p.25-30. 1995.

BUECHNER, N., SCHROEDER, P., JAKOB, S., KUNZE, K., MARESCH, T., CALLES, C., KRUTMANN, J. e HAENDELER, J. Changes of MMP-1 and collagen type Ialpha1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. **Exp Gerontol**, v.43, n.7, p.633-637. 2008.

BUENGER, J., ACKERMANN, H., JENTZSCH, A., MEHLING, A., PFITZNERS, I., REIFFEN, K. A., SCHROEDER, K. R. e WOLLENWEBER, U. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. **Int J Cosmet Sci**, v.28, n.2, p.135-146. 2006.

BURNS, J., GARDNER, P. T., O'NEIL, J., CRAWFORD, S., MORECROFT, I., MEPHAIL, D. B., LISTER, C., MATTHEWS, D., MACLEAN, M. R., LEAN, M. E. J., DUTHIE, G. e CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **J Agric Food Chem**, v.48, n.2, p.220-230. 2000.

CAMPISI, J. Replicative senescence: an old lives' tale? **Cell**, v.84, p.497-500. 1996.

CARINI, M., MAFFEI FACINO, R., ALDINI, G., CALLONII, M. T., BOMBARDELLI, E. e MORAZZONI, P. The protection of polyunsaturated fatty acids in micellar systems against UVB-induced photo-oxidation by procyanidins from *Vitis vinifera* L. and the protective synergy with vitamin E. **Int J Cosmet Sci**, v.20, n.4, p.203-215. 1998.

CHAI, P. C., LONG, L. H. e HALLIWELL, B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. **Biochem Biophys Res Commun**, v.304, n.4, p.650-654. 2003.

CHAUDIERE, J. e FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem Toxicol**, v.37, n.9-10, p.949-962. 1999.

- CHEN, H., ZHANG, M. e XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chem**, v.90, n.1-2, p.17-21. 2005.
- CHEN, H., ZHANG, M., QU, Z. e XIE, B. Compositional analysis and preliminary toxicological evaluation of a tea polysaccharide conjugate. **J Agric Food Chem**, v.55, n.6, p.2256-60. 2007.
- CHERUBINI, A., BEAL, M. F. e FREI, B. Black tea increases the resistance of human plasma to lipid peroxidation in vitro, but not ex vivo. **Free Radic Biol Med**, v.27, n.3-4, p.381-387. 1999.
- CHOW, C.K. Antioxidant nutrients and environmental health: Introduction. **Toxicol**, v.180, n.1, p.1-3. 2002.
- COIMBRA, S., CASTRO, E., ROCHA-PEREIRA, P., REBELO, I., ROCHA, S. e SANTOS-SILVA, A. The effect of green tea in oxidative stress. **Clin Nutr**, v.25, n.5, p.790-796. 2006.
- COSTA, H., GALLEGOS, S. M. e TOMARO, M. L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Plant Sci**, v.162, n.6, p.939-945. 2002.
- COYLE, C. H., PHILIPS, B. J., MORRISROE, S. N., CHANCELLOR, M. B. e YOSHIMURA, N. Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells. **Life Sci**, v.83, n.1-2, p.12-8. 2008.
- CRUZ, V.M.F.R. **Estudo fotoacústico de protetores solares aplicados à pele in vitro**. São José dos Campos, 2005. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade do Vale do Paraíba.
- DANRONG, Z., YUQIONG, C. e DEJIANG, N. Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts. **Food Chem**, v.113, n.1, p.110-114. 2009.
- DARVIN, M., PATZELT, A., GEHSE, S., SCHANZER, S., BENDEROTH, C., STERRY, W. e LADEMANN, J. Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin. **Eur J Pharm Biopharm**, v.69, n.3, p.943-947. 2008.
- DE POLO, K.F. **A short textbook of cosmetology**. Augsburg: H.Ziolkowsky GmbH. p.19-42. 1998.
- DELADINO, L., ANBINDER, P. S., NAVARRO, A. S. e MARTINO, M. N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydr Polym**, v.71, n.1, p.126-134. 2008.
- DEMEULE, M., BROSSARD, M., PAGE, M., GINGRAS, D. e BELIVEAU, R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta**, v.1478, n.1, p.51-60. 2000.
- DEMIREZER, L. O., KURUUZUM-UZ, A., BERGERE, I., SCHIEWE, H. J. e ZEECK, A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. **Phytochemistry**, v.58, n.8, p.1213-27. 2001.

- DIEAMANT, G. C. Resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele relacionada ao fotoenvelhecimento: avaliação in vitro e clínica de um novo composto como alternativa terapêutica em dermatologia. Campinas, 2008. 357p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas), Universidade Estadual de Campinas.
- EFFERTH, T., LI, P. C., KONKIMALLA, V. S. e KAINA, B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends Mol Med**, v.13, n.8, p.353-361. 2007.
- EHRlich, M., RAO, J., PABBY, A. e GOLDMAN, M. P. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor beta(1) and l-ascorbic acid. **Dermatol Surg**, v.32, n.5, p.618-625. 2006.
- ELI, R. e FASCIANO, J. A. An adjunctive preventive treatment for cancer: ultraviolet light and *Ginkgo biloba*, together with other antioxidants, are a safe and powerful, but largely ignored, treatment option for the prevention of cancer. **Med Hypotheses**, v.66, n.6, p.1152-56. 2006.
- EMRI, G., HORKAY, I. e REMENYIK, E. The role of free radicals in the UV-induced skin damage. Photo-aging. **Orv Hetil**, v.147, n.16, p.731-735. 2006.
- FABRE, N., URIZZI, P., SOUCHARD, J. P., FRECHARD, A., CLAPAROLS, C., FOURASTE, I. e MOULIS, C. An antioxidant sinapic acid ester isolated from *Iberis amara*. **Fitoterapia**, v.71, n.4, p.425-428. 2000.
- FARIA, C.D. **Estudo do chá-verde e suas ações protetoras das radiações ultravioleta**. Curitiba, 2007. 72p. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. São Paulo: Atheneu. 4^a. ed., parte II, fascículo 3, p.148. 2002.
- FARRIS, P. Idebenone, green tea, and coffeeberry extract: new and innovative antioxidants. **Dermatol Ther**, v.20, n.5, p.322-9. 2007.
- FEDELI, D., BERRETTINI, M., GABRYELAK, T. e FALCIONI, G. The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. **Mutat Res**, v.563, n.2, p.89-96. 2004.
- FILHO, D. W., SILVA, E. L. e BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. Em: YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. p.318-334. 1999.
- FILIP, R., LOTITO, S. B., FERRARO, G. e FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res**, v.20, n.10, p.1437-46. 2000.
- FINKEL, T. e HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, n.6809, p.239-247. 2000.
- FISHER, G. J., DATTA, S. C., TALWAR, H. S., WANG, Z. Q., VARANI, J., KANG, S. e VOORHEES, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v.379, p.335-339. 1996.
- FISHER, G. J., WANG, Z., DATTA, S. C., VARANI, J., KANG, S. e VOORHEES, J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **N Engl J Med**, v.337, n.20, p.1419-28. 1997.

- FLIGIEL, S. E., VARANI, J., DATTA, S. C., KANG, S., FISHER, G. J. e VOORHEES, J. J. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. **J Invest Dermatol**, v. 120, p.842-848. 2003.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol**, v.201 (Pt 8), p.1203-09. 1998.
- FU, T., LIANG, J., HAN, G., LV, L. e LI, N. Simultaneous determination of the major active components of tea polyphenols in rat plasma by a simple and specific HPLC assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.875, n.2, p.363-367. 2008.
- GALLEGO, S. M., BENAVIDES, M. P. e TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Sci**, v.121, n.2, p.151-159. 1996.
- GARCIA-ALONSO, F. J., GUIDARELLI, A. e PERIAGO, M. J. Phenolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: the role of iron chelation. **J Nutr Biochem**, v.18, n.7, p.457-466. 2007.
- GIL, M. I., TOMAS-BARBERAN, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. M. e KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J Agric Food Chem**, v.48, n.10, p.4581-89. 2000.
- GLEI, M., MATUSCHEK, M., STEINER, C., BOHM, V., PERSIN, C. e POOL-ZOBEL, B. L. Initial in vitro toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. **Toxicol In Vitro**, v.17, n.5-6, p.723-729. 2003.
- GOH, L. M. e BARLOW, P. J. Antioxidant capacity in *Ginkgo biloba*. **Food Res Int**, v.35, n.9, p.815-820. 2002.
- GOLD, M. H. Photodynamic therapy update 2007. **J Drugs Dermatol**, v.6, n.11, p. 1131-37. 2007.
- GORDON, F. B. e QUAN, A. L. Isolation of the Trachoma agent in cell culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.118, p.354-9. 1965.
- GRASSMANN, J., HIPPELI, S. e ELSTNER, E. F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiol Biochem**, v.40, n. 6-8, p.471-478. 2002.
- GUO, S., YAN, J., YANG, T., YANG, X., BEZARD, E. e ZHAO, B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. **Biol Psychiatry**, v.62, n.12, p.1353-62. 2007.
- HADI, S. M., BHAT, S.H., AZMI, A.S., HANIF, S., SHAMIM, U. e ULLAH, M.F. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism form anticancer properties. **Semin Cancer Biol**, p.370-376. 2007.
- HANASAKI, Y., OGAWA, S. e FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic Biol Med**, v.16, n.6, p.845-850. 1994.

- HAZANE, F., VALENTI, K., SAUVAIGO, S., PEINNEQUIN, A., MOURET, C., FAVIER, A. e BEANI, J. C. Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. **J Photochem Photobiol B**, v.79, n.3, p.171-190. 2005.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. e BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**, v.13, n.10, p.572-584. 2002.
- HEO, M. Y., KIM, S. H., YANG, H. E., LEE, S. H., JO, B. K. e KIM, H. P. Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. **Mutat Res**, v.496, n.1-2, p.47-59. 2001.
- HERRLING, T., JUNG, K. e FUCHS, J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v.63, n.4, p.840-845. 2006.
- HOMSY, R., PELLETIER-LEBON, P., ROBERT, L. e HORNEBECK, W. Fibroblast elastase(s). Em: Robert L, Hornebeck W, editors. **Elastin and elastases**. New York: CRC Press. v.2.; p.57-62.1989.
- HONDA, A., ABE, R., MAKINO, T., NORISUGI, O., FUJITA, Y., WATANABE, H., NISHIHARA, J., IWAKURA, Y., YAMAGISHI, S., SHIMIZU, H. e SHIMIZU, T. Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. **J Dermatol Sci**, v.49, p.63-72. 2008.
- HOSTETTMANN, K. e TERREAUX, C. Search for new lead compounds from higher plants. **Chimia (Aarau)**, v.54, p.652-657. 2000.
- HSU, S. Green tea and the skin. **J Am Acad Dermatol**, v.52, n.6, p.1049-1059. 2005.
- HU, H., FORSEY, R. J., BLADES, T. J., BARRATT, M. E. J., PARMAR P. e POWELL, J. R. Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model. **Mech Ageing Dev**, v.121, p.217-230. 2000.
- IACOPINI, P., BALDI, M., STORCHI, P. e SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. **J Food Compos Anal**, v.21, n.8, p.589-598. 2008.
- ISNARD, N., LEGEAIS, J.M., RENARD, G. e ROBERT, L. Effect of hyaluronan on MMP expression and activation. **Cell Biol Int**, v. 25, n. 8, p.735-739. 2001.
- ISNARD, N., PÉTERSZEGI, G., ROBERT, A. M. e ROBERT, L. Regulation of elastase-type endopeptidase activity, MMP-2 and MMP-9 expression and activation in human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich polysaccharide. **Biomed Pharmacother**, v.56, n.5, p.258-264. 2002.
- ISNARD, N., SABATIER, P., ROBERT, A. M., ROBERT, L. e RENARD, G. MMP-type endopeptidase activity in the cornea. Its evolution during organ culture storage at the Eye Bank. Effect of hyaluronan. **Pathol Biol (Paris)**, v.53, n.7, p.424-429. 2005.
- IWASAKI, Y., MATSUI, T. e ARAKAWA, Y. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. **J Gastroenterol**, v.39, n.9, p.831-837. 2004.

- JAY, Z. et al. New active ingredient for aging prevention. Em: COSMETICS & TOILETRIES. **Antiaging: Physiology to Formulation**. USA: Allured Publishing Corporation. p.62-72. 2006.
- JUNG, K., SEIFERT, M., HERRLING, Th. e FUCHS, J. UV-generated free radicals (FR) in skin: Their prevention by sunscreens and their induction by self-tanning agents. **Spectrochimica Acta Part A**, v.69, p.1423-1428. 2008.
- JUTEAU, F., MASOTTI, V., BESSIERE, J. M., DHERBOMEZ, M. e VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, v.73, n.6, p.532-5. 2002.
- KATIYAR, S. K. e ELMETS, C. A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection. **Int J Oncol**, v.18, n.6, p.1307-13. 2001.
- KATIYAR, S., ELMETS, C. A. e KATIYAR, S. K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. **J Nutr Biochem**, v.18, n.5, p.287-96. 2007.
- KAUR, I. P., KAPILA, M. e AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Res Rev**, v.6, p. 271-288. 2007.
- KHAN, N. e MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sci**, v.81, p.519-533. 2007.
- KIM, D. O., CHUN, O. K., KIM, Y. J., MOON, H. Y. e LEE, C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **J Agric Food Chem**, v.51, n.22, p.6509-15. 2003.
- KIM, S. e CHUNG, J. H. Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v.15, n.9, p.749-53. 2008.
- KOHEN, R. e GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, n.2-3, p.149-57. 2000.
- KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – new approaches for their evaluation. **Biomed Pharmacother**, v.53, p.181-92. 1999.
- KOLEVA, I. I., VAN BEEK, T. A., LINSSEN, J. P., DE GROOT, A. e EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochem Anal**, v.13, n.1, p.8-17. 2002.
- KONDO, K., KURIHARA, M., MIYATA, N., SUZUKI, T. e TOYODA, M. Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. **Free Radic Biol Med**, v.27, p.855-863. 1999.
- KONTOGIORGIS, C. e HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v.18, n.1, p.63-69. 2003.
- LABAT-ROBERT, J., FOURTANIER, A., BOYER-LAFARGUE, B. e ROBERT, L. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. **J Photochem Photobiol B**, v.57, n.2-3, p.113-8. 2000.

- LAGUERRE, M., LECOMTE, J. e VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Prog Lipid Res**, v.46, n.5, p.244-282. 2007.
- LAHMANN, C., BERGEMANN, J., HARRISON, G. e YOUNG A. R. Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. **Lancet**, v.357, p.935-936. 2001.
- LAMBERT, J. D. e YANG, C. S. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. **J Nutr**, v.133, n.10, p.3262S-3267S. 2003.
- LATONEN, L. e LAIHO, M. Cellular UV damage responses – functions of tumor suppressor p53. **Biochim Biophys Acta**, v.1755, n.2, p. 71-89. 2005.
- LEE, H. S., SEO, E. Y., KANG, N. E. e KIM, W. K. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **J Nutr Biochem**, v.19, n.5, p.313-319. 2008.
- LEE, J. H., CHUNG, J. H. e CHO, K. H. The effects of epigallocatechin-3-gallate on extracellular matrix metabolism. **J Dermatol Sci**, v.40, n.3, p.195-204. 2005.
- LEE, K.K., KIM, J.H, CHO, J.J. e CHOI, J., -D. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. **Int J Cosmet Sci**, v.21, p.71-82. 1999.
- LEWIS, K. G., BERCOVITCH, L., DILL, L. S. W. e ROBINSON-BOSTOM, L. Acquired disorders of elastic tissue: part I. Increased elastic tissue and solar elastotic syndromes. **J Am Acad Dermatol**, v.51, p.1-21. 2004.
- LIN, C. C., HSU, Y. F. e LIN, T. C. Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of *Terminalia catappa* L. **Anticancer Res**, v.21, n.1, p.237-43. 2001.
- LIN, J. -Y., SELIM, M. A., SHEA, C. R., GRICHNIK, J. M., OMAR, M. M., MONTEIRO-RIVIERE, N. A. e PINNELL, S. R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **J Am Acad of Dermatol**, v.48, n.6, p.866-874. 2003.
- LIU, C. Z., MURCH, S. J., EL-DEMERDASH, M. e SAXENA, P. K. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. **J Biotechnol**, v.110, n.1, p.63-71. 2004.
- LOO, A. Y., JAIN, K. e DARAH, I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. **Food Chem**, v.107, n.3, p. 1151-1160. 2008.
- LÜBECK R. P., BERNEBURG, M., TRELLES, M., FRIGUET, B., OGDEN, S., ESREFOGLU, M., KAYA, G., GOLDBERG, D.J., MORDON, S., CALDERHEAD, R.G., GRIFFITHS, C.E.M., SAURAT, J.H. e THAPPA, D.M. How best to halt and/or revert UV-induced skin ageing: strategies, facts and fiction. **Exp Dermatol**, v.17, n.3, p.228-40. 2008.
- LUNCEFORD, N. e GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v.76, n.5, p.419-27. 2005.
- LUPO, M. P. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clin Dermatol**, v.19, n.4, p.467-473. 2001.
- LUTHER, M., PARRY, J., MOORE, J., MENG, J., ZHANG, Y., CHENG, Z. e YU, L. L. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chem**, v.104, n.3, p.1065-1073. 2007.

- MAHMOUD, B. H., HEXSEL, C. L., HAMZAVI, I. H. e LIM, H. W. Effects of visible light on the skin. **Photochem Photobiol**, v.84, n.2, p.450-62. 2008.
- MANJU, V. e NALINI, N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. **Clin Chim Acta**, v.358, n.1-2, p.60-7. 2005.
- MARQUES, V. e FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chem**, v.113, n.4, p.1370-1376. 2009.
- MATTILA, L., AIROLA, K., AHONEN, M., HIETARINTA, M., BLACK, C. e SAARIALHOKERE, U. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v.110, p.416-21. 1998.
- MAUCH, C., HERRON, G. S. e BAUER, E. A. Regulation of connective tissue turnover by matrix metalloproteinases. In: Freinkel RK and Woodley D. **The Biology of the Skin**. New York: The Parthenon Publishing Group. p.353-64. 2001.
- MAY, J. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Front Biosci**, v.3, p.D1-D10. 1998.
- MCNALLY, K., NEAL, J. A., MCMANUS, T. P., MCCORMICK, J. J. e MAHER, V. M. hRev7, putative subunit of hPolzeta, plays a critical role in survival, induction of mutations, and progression through S-phase, of UV(254nm)-irradiated human fibroblasts. **DNA Repair (Amst)**, v.7, n.4, p.597-604. 2008.
- MENSOR, L. L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoter Res**, 15, p.127-130. 2001.
- MERCHANT, D., KAHN, R. e MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Burgess Publishing, Broken Arrow. 1964.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63. 1983.
- MOSQUERA, O. M., CORREA, Y. M., BUITRAGO, D. C. e NINO, J. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.5, p.631-4. 2007.
- MUNAVALLI, G. S. e WEISS, R. A. Combination light therapies for the treatment of acne: An overview and introduction to photopneumatic therapy. **Med Laser Appl**, v.23, n.3, p.141-146. 2008.
- NAKAGAWA, H., HASUMI, K., WOO, J. T., NAGAI, K. e WACHI, M. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. **Carcinogenesis**, v.25, p.1567-1574. 2004.
- NICOLAY, J. F. e PAILLET, C. Poluição e envelhecimento: nova classe de antioxidantes para a Pele. **Cosmet Toilet**, vol. 14, p.58-63. 2002.
- NOUVEAU-RICHARD, S., YANG, Z., MAC-MARY, S., LI, L., BASTIEN, P., TARDY, I., BOUILLON, C., HUMBERT, P. e DE LACHARRIÈRE, O. Skin ageing: a comparison between Chinese and European populations. A pilot study. **J Dermatol Sci**, v.40, p. 187-193. 2005.

- OHARA, A. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos. p.51-52. 2006.
- OLDS, W. J., MCKINLEY, A. R., MOORE, M. R. e KIMLIN, M. G. In vitro model of vitamin D3 (cholecalciferol) synthesis by UV radiation: dose-response relationships. **J Photochem Photobiol B**, v.93, n.2, p.88-93. 2008.
- ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Sci Hort**, v.111, n.3, p.235-241. 2007.
- PALM, M. D. e O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatol Ther**, v.20, n.5, p.360-76. 2007.
- PENG, L., SONG, X., SHI, X. e YE, C. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. **J Food Compos Anal**, v.21, n.7, p.559-563. 2008.
- PIAO, M. J., KANG, K. A., ZHANG, R., KO, D. O., WANG, Z. H., YOU, H. J., KIM, H. S., KIM, J. S., KANG, S. S. e HYUN, J. W. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. **Biochim Biophys Acta**, v.1780, n.12, p.1448-57. 2008.
- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J Am Acad Dermatol**, v.48, n.1, p.1-19. 2003.
- POLTE, T. e TYRRELL, R. M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. **Free Radic Biol Med**, v.36, n.12, p.1566-74. 2004.
- POON, T. S., BARNETSON, R. S. e HALLIDAY, G. M. Prevention of immunosuppression by sunscreens in humans is unrelated to protection from erythema and dependent on protection from ultraviolet a in the face of constant ultraviolet B protection. **J Invest Dermatol**, v.121, n.1, p.184-90. 2003.
- PORTUGAL, M., BARAK, V. GINSBURG, I. e KOHEN, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. **Biomed Pharmacother**, v.61, p.412-422. 2007.
- PRIETO, P., PINEDA, M. e AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, v.269, n.2, p.337-41. 1999.
- RABE, J. H., MAMELAK, A. J., McELGUNN, P. J. S., MORISON, W. L. e SAUDER, D. N. Photoaging: Mechanisms and repair. **J Am Acad Dermatol**, v.55, n.1, p.1-19. 2006.
- RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **Eur J Pharmacol**, v.545, n.1, p.51-64. 2006.
- RAO, A. V. e AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutr Res**, v.19, n.2, p.305-323. 1999.

- RASOAMANANTENA, P., MOCZAR, E., ROBERT, L., WEI, S. M., GODEAU, G. e HORNEBECK, W. Protective effect of oleoyl peptide conjugates against elastolysis by neutrophil elastase and kappa elastin-induced monocyte chemotaxis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.8, n.1, p.50-5. 1993.
- RATNAM, D. V., ANKOLA, D. D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D. K. e KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J Control Release**, v.113, p.189-207. 2006.
- RAWLINGS, A. V., MATTS, P. J., ANDERSON, C. D. e ROBERTS, M. S. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. **Drug Discov Today**, v.5, n.2, p.127-136. 2008.
- RHO, K. A. e KIM, M. K. Effects of different grape formulations on antioxidative capacity, lipid peroxidation and oxidative DNA damage in aged rats. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo), v.52, n.1, p.33-46. 2006.
- RISO, P., ERBA, D., CRISCUOLI, F. e TESTOLIN, G. Effect of green tea extract on DNA repair and oxidative damage due to H₂O₂ in Jurkat T cells. **Nutr Res**, v.22, n.10, p.1143-1150. 2002.
- RISO, P., SANTANGELO, A. e PORRINI, M. The comet assay for the evaluation of cell resistance to oxidative stress. **Nutr Res**, vol.19, p.325-333. 1999.
- ROBERT, L. Les protéases de type élastases. **Pathol Biol**, v.36, p.1101-7. 1988.
- ROCQUET, C. e BONTÉ, F. Molecular aspects of skin ageing - recent data. **Dermatovenerol**, v.11, p.1-35. 2002.
- RUBIN, J. e VIGLIOGLIA, A. P. **Cosmiatria II**. Buenos Aires: AP Americana. p.22-74. 1989.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J. A. e SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J Sci Food Agric**, v.76, n.2, p.270-276. 1998.
- SANGEETHA, P., BALU, M., HARIPRIYA, D. e PANNEERSELVAM, C. Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. **Exp Gerontol**, v.40, n.10, p.820-828. 2005.
- SAOTOME, K., MORITA, H. e UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol In Vitro**, v.3, p.317-321. 1989.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.7, p.995-1014. 2005.
- SCHAEFER, H. e REDELMEIER, T. E. **Skin barrier - principles of percutaneous Absorption**. Editora Karger: Basel-Suíça. p.13-15. 1996.
- SCHARFFETTER-KOCHANÉK K. S., K., BRENNEISEN, P., WENK, J., HERRMANN, G., MA, W., KUHR, L., MEEWES, C. e WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Exp Gerontol**, v.35, n.3, p.307-316. 2000.

- SEN, P., CHAKRABORTY, P. K. e RAHA, S. Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NFkappaB survival pathways. **FEBS Lett**, v.580, n.1, p.278-84. 2006.
- SENER, G., SEHIRLI, O., TOZAN, A., VELIOGLU-OVUNC, A., GEDIK, N. e OMURTAG, G. Z. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Food Chem Toxicol**, v.45, n.4, p.543-50. 2006.
- SEO, J. Y. e CHUNG, J. H. Thermal aging: a new concept of skin aging. **J Dermatol Sci**, v.2, p.S13-S22. 2006.
- SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr Opin in Cell Biol**, v.10, n.5, p.602-608. 1998.
- SHIN, M. H., MOON Y. J., SEO, J., LEE, Y., KIM, K. H. e CHUNG, J. H. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. **Free Radic Biol Med**, v.44, p.635-645. 2008.
- SHINDO, Y., WITT, E., HAN, D., EPSTEIN, W. e PACKER, L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **J Invest Dermatol**, v.102, n.1, p.122-124. 1994.
- SILVA, C. G., HERDEIRO, R. S., MATHIAS, C. J., PANEK, A. D., SILVEIRA, C. S., RODRIGUES, V. P., RENNO, M. N., FALCAO, D. Q., CERQUEIRA, D. M., MINTO, A. B., NOGUEIRA, F. L., QUARESMA, C. H., SILVA, J. F., MENEZES, F. S. e ELEUTHERIO, E. C. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacol Res**, v.52, n.3, p.229-33. 2005.
- SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. **Mutat Res**, v.455, n.1-2, p.111-127. 2000.
- SOUZA, V. M. **Ativos Dermatológicos**. São Paulo: Tecnopress. p.23-25. 2003.
- SOUZA, W. M., BREHMER, F., NAKAO, L., STINGHEN, A.E.M. e SANTOS, C.A.M.. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Braz J Pharmacol**, v.17, n.2, p.191-196. 2007.
- STARY, A., ROBERT, C. e SARASIN, A. Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. **Mutat Res**, v.383, n.1, p.1-8. 1997.
- STEENKAMP, V., GRIMMER, H., SEMANO, M. e GULUMIAN, M. Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. **Mutat Res**, v.581, n.1-2, p.35-42. 2005.
- STOILOVA, I., KRASTANOV, A., STOYANOVA, A., DENEV, P. e GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chem**, v.102, n.3, p.764-770. 2007.
- STRUWE, M., GREULICH, K.O, SUTER, W. e PLAPPERT-HELBIG, U. The photo comet assay – a fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. **Mutat Res**, v. 632, p.44-57. 2007.
- SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D. e VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v.150, n.1, p.25-38. 2006.

- TAHARA, S., MATSUO, M. e KANEKO, T. Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin. **Mech Ageing Dev**, v.122, p.415-426. 2001.
- THIELE, J. J. e DREHER, F. Antioxidant defense systems in skin. Em: ELSNER, P. e MAIBACH, H. I. **Cosmeceuticals and active cosmetics**. Boca Raton: Taylor & Francis. 2ª. ed., v.27, p.37-87. 2005.
- THIELE, J. J. e EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. **Mol Aspects Med**, v.28, p.646-667. 2007.
- TIMARES, L., KATIYAR, S. K. e ELMETS, C. A. DNA damage, apoptosis and langerhans cells-activators of UV-induced immune tolerance. **Photochem Photobiol**, v.84, n.2, p.422-36. 2008.
- TIMOTHY, J. S., RODRIGUES, A.B. e CELESTE, P.M. **A Revolução Antienvhecimento**. Rio de Janeiro: Campus, 3ª. ed., p.299-305. 2000.
- TING, W. W., VEST, C.D. e SONTHEIMER, R. Practical and experimental consideration of sun protection in dermatology. **Int J Dermatol**, v.42, n.7, p.505-513. 2003.
- TOMAINO, A., CRISTANI, M., CIMINO, F., SPECIALE, A., TROMBETTA, D., BONINA, F. e SAIJA, A. In vitro protective effect of a Jacques grapes wine extract on UVB-induced skin damage. **Toxicol In Vitro**, v.20, n.8, p.1395-402. 2006.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. e TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, p.44-84. 2007.
- VARANI, J., PERONE, P., FLIGIEL, S. E., FISHER, G. J. e VOORHEES, J. J. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. **J Invest Dermatol**, v.119, p.122-129. 2002.
- VAYALIL, P. K., MITTAL, A., HARA, Y., ELMETS, C. A. e KATIYAR, S. K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Soc Invest Dermatol**, v.122, n.6, p. 1480-1487. 2004.
- VAZIRI, H. e BENCHIMOL, S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. **Exp Gerontol**, v.31, p.295-301. 1996.
- WEI, H., ZHANG, X., ZHAO, J. F., WANG, Z. Y., BICKERS, D. e LEBWOHL, M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas. **Free Radic Biol Med**, v.26, n.11-12, p.1427-35. 1999.
- WEI, Q., ZHOU, B., CAI, Y., YANG, L. e LIU, Z. Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. **Food Chem**, v.96, p.90-95. 2006.
- WEINREB, O., AMIT, T. e YODIM, M. B. A novel approach of proteomics and transcriptomics to study the mechanism of action of the antioxidant-iron chelator green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Free Radic Biol Med**, v.43, n.4, p.546-56. 2007.

- WILKINSON, J. B. e MOORE, R. J. **Harry`s Cosmetology**. Chemical Publishing, New York, p.5-20.1982.
- WU, H., ZHU, B., SHIMOISHI, Y., MURATA, Y. e NAKAMURA, Y. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces up-regulation of Th1 and Th2 cytokine genes in Jurkat T cells. **Arch Biochem Biophys**, v.483, n.1, p.99-105. 2009.
- WULF, H. C., SANDBY-MOLLER, J., KOBAYASI, T. e GNIADDECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, p.185-191. 2004.
- YAAR, M. e GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **Br J Dermatol**, v.157, n.5, p.874-87. 2007.
- YAMAMOTO, T., HSU, S., LEWIS, J., WATAHA, J., DICKINSON, D., SINGH, B., BOLLAG, W. B., LOCKWOOD, P., UETA, E., OSAKI, T. e SCHUSTER, G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v.307, p.230-236. 2003.
- YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **J Dermatol Sci**, v.27 Suppl 1, p.S1-4. 2001.
- YANG, C. S., MALIAKAL, P. e MENG, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.42, p.25-54. 2002.
- YASUI, H. e SAKURAI, H. Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. **Exp Dermatol**, v.12, p.655-661. 2003.
- YOO, K. M., LEE, C. H., LEE, H., MOON, B. K. e LEE, C. Y. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chem**, v.106, n.3, p.929-936. 2008.
- YUSUF, N., IRBY, C., KATIYAR, S. K. e ELMETS, C. A. Photoprotective effects of green tea polyphenols. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.23, n.1, p.48-56. 2007.
- ZHAO, B., GUO, Q. e XIN, W. Free radical scavenging by green tea polyphenols. **Methods Enzymol**, v.335, p.217-31. 2001.