



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KÁTIA SABINO TAKAYAMA

**EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO DE EXTRATO DE
ROSMARINUS OFFICINALIS SOBRE ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS**

KÁTIA SABINO TAKAYAMA

**EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO DE EXTRATO DE
ROSMARINUS OFFICINALIS SOBRE ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Renê Oliveira do Couto

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Takayama, Kátia Sabino.

Efeito Fotoquimiopreventivo de Extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre Estresse Oxidativo Induzidos por Radiação UVB em Camundongos / Kátia Sabino Takayama. - Londrina, 2018.
119 f. : il.

Orientador: Sandra Regina Georgetti.

Coorientador: Renê Oliveira do Couto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia - Tese. 2. *Rosmarinus officinalis* - Tese. 3. Estresse Oxidativo - Tese. 4. Fotoproteção - Tese. I. Georgetti, Sandra Regina. II. Couto, Renê Oliveira do. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

KÁTIA SABINO TAKAYAMA

EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO DE EXTRATO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina
Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Doumit Camilios Netos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Micheli Martinez
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 27 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado fé e esperança de acreditar que eu poderia chegar até aqui.

Aos meus pais Roberto Takayama, Zuleika Takayama e ao meu irmão Rodrigo Takayama, que me incentivaram e me deram apoio incondicional para a realização e conclusão dessa caminhada.

À professora Sandra Regina Georgetti, pela orientação, dedicação, empenho, paciência e compreensão em todos os momentos.

Ao co-orientador Renê Oliveira do Couto, por ter me guiado pacientemente, oferecendo o seu tempo e o seu conhecimento para o meu aprimoramento científico.

Aos professores Doumit Camilios Netos e Rubia Casagrande pelas correções e contribuições.

Aos professores Nilton Arakawa e Décio Sabbatini que cederam os laboratórios, material, equipamentos e orientação para a realização de etapas fundamentais do projeto.

Ao Nelson Janeiro, pelo conhecimento e ajuda técnica.

À Priscila Saito pela bondade, compreensão, dedicação, tempo, conhecimento e muito esforço para que pudesse me ajudar com a finalização do projeto.

À minha amiga Claudia Akagi pela parceria e companhia até tarde nos laboratórios da UEL/HU, pelo tempo em realizar experimentos junto comigo, pelo incentivo, conversas e momentos de descontração.

Às estagiárias Érika Vieira e Mariana Monteiro, pelos experimentos realizados, interesse, esforço e importância dada ao trabalho.

Aos colegas do programa de Biotecnologia, Dayane, Mayara, Isadora, Leandro, Marcos, Juliano e Karen, por tornarem essa jornada mais leve.

Aos amigos Henrique Lazzarini, Allan Higashi, Murillo Braghin, Larissa Leite, Cibelle Gaijuti, Tathiê Ignácio e Maria Odete, que incentivaram e colaboraram direta ou indiretamente em detalhes indispensáveis para o desenvolvimento e conclusão do projeto.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade, pelo acolhimento, por ser o

local onde vivenciei uma das fases mais importantes para me tornar o que sou hoje, e por me oferecer amigos e pessoas singulares.

À CNPq, pelo financiamento do projeto e fornecimento da bolsa.

TAKAYAMA, Kátia Sabino. **Efeito fotoquimiopreventivo de extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre estresse oxidativo induzidos por radiação UVB em camundongos.** 2018. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A exposição da pele à radiação UVB é a principal causa da formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causa várias desordens cutâneas. A administração tópica de antioxidantes pode ser uma estratégia eficiente para proteger a pele contra danos fotooxidativos. Evidências da presença de compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antimutagênica e quimiopreventiva podem ser encontradas no extrato de *Rosmarinus officinalis*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do sistema solvente na obtenção de extratos de *R. officinalis* com potencial antioxidante. Para isso, foi realizada as determinações do conteúdo de polifenóis totais, o fator de proteção solar (FPS) e atividade sequestradora do radical DPPH. Posteriormente, os extratos com melhor potencial antioxidante (extraídos com acetona 80% e etanol 80%) foram avaliados por diferentes métodos antioxidantes *in vitro* e adicionados em diferentes formulações tópicas. F2 demonstrou melhores resultados mantendo sua atividade antioxidante em camundongos sem pelo e avaliada a eficácia fotoquimiopreventiva. Os resultados mostraram que o teor de polifenóis dos diferentes extratos foi 24,15 a 159,75 mg de ácido gálico/g de extrato, o FPS foi de 1,13 a 11,16 e atividade antioxidante foi de 0,44 a 3,77 $\mu\text{Molar Eq. de Trolox/g/mL}$. A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos com acetona 80% (EA) e de etanol 80% (EE) foram dose-dependentes para todos os ensaios e os valores de IC_{50} encontrados para o EE foram menores que EA, demonstrando maior capacidade antioxidante. Contudo, os valores encontrados em relação ao poder redutor de ferro pelo método FRAP foi próximo entre eles. A atividade sequestradora de radical livre de EA e EE foi mantida somente quando incorporados na formulação gel creme, demonstrando que os constituintes da formulação tópica pode alterar a capacidade antioxidante do extrato. O tratamento com a formulação gel creme adicionada com EA ou EE melhorou significativamente os níveis do antioxidante endógeno GSH, redução da enzima MPO, a capacidade de sequestrar o radical ABTS e o poder redutor de ferro (FRAP) da pele em comparação com os camundongos tratados com formulação base sem extrato. Contudo, não demonstrou eficácia na diminuição do edema e da secreção da atividade da MMP-9. Em conclusão, os presentes resultados sugerem que a formulação contendo EA ou EE de *Rosmarinus officinalis* podem ser uma fonte tópica de compostos antioxidantes para diminuir os danos oxidativos da pele.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. Polifenóis. Antioxidante. Estresse oxidativo. Fotoproteção.

TAKAYAMA, Kátia Sabino. **Photochemiopreventive effect of *Rosmarinus officinalis* extract on oxidative stress induced by UVB radiation in mice.** 2018. 119 p. Dissertation (Master's Degree Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Exposure of skin to UVB radiation is the main cause of the exacerbated formation of reactive oxygen species (EROS) that causes various skin disorders. Topical administration of antioxidants may be an effective strategy to protect the skin against photooxidative damage. Evidence for the presence of compounds with antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antimutagenic and chemopreventive activities can be found in *Rosmarinus officinalis* extract. Thus, the objective of the presente work was to evaluate the effect of the solvent system on extracts of *R. officinalis* with antioxidant potential. For that, the determination of the total polyphenols content, the sun protection factor (SPF) and the sequestering activity of the DPPH radical were carried out. Subsequently, the extracts with the best antioxidant potential (extracted with 80% acetone and 80% ethanol) were evaluated by different antioxidant methods *in vitro* and added in different topical formulations. F2 showed better results maintaining its antioxidante activity in mice without hairs and evaluated the photochemopressive efficacy. The results showed that the polyphenols content of the different extracts was 24.15 to 159.75 mg gallic acid / g extract, the SPF was 1.13 to 11.16 and antioxidant activity was 0.44 to 3, 77 μ Molar Trolox Eq./g/mL. The evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of the extracts obtained with 80% acetone (EA) and 80% ethanol (EE) were dose-dependent for all the tests and the IC₅₀ values found for EE were lower than EA, demonstrating higher antioxidant capacity. However, the values found in relation to iron-reducing power by the FRAP method were close to each other. The free radical sequestering activity of EA and EE was maintained only when incorporated into the cream gel formulation, demonstrating that the constituents of the topical formulation may alter the antioxidant capacity of the extract. Treatment with the cream gel formulation added with EA or EE significantly improved endogenous GSH antioxidant levels, reduction of the MPO enzyme, the ability to sequester the ABTS radical and the iron reducing power (FRAP) of the skin compared to the mice treated with a base formulation without extract. However, it did not demonstrate efficacy in decreasing edema and secretion of MMP-9 activity. In conclusion, the present results suggest that the formulation containing EA or EE from *Rosmarinus officinalis* may be a topical source of antioxidant compounds to decrease oxidative damage of the skin.

Key words: *Rosmarinus officinalis*. Polyphenols. Antioxidant. Oxidative stress. Photoprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura esquemática da pele humana e a penetração de diferentes ondas de UV38
- Figura 2** – Fotolesões induzidas pela exposição à radiação UVB: dímeros de ciclobutanodipirimidina (A) e pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (B)40
- Figura 3** – *Rosmarinus officinalis* (alecrim)46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2,2- azinobis -3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil
EA	Extrato de Acetona 80%
EE	Extrato de Etanol 80%
F1	Formulação 1 (Creme)
F2	Formulação 2 (Gel creme)
F3	Formulação 3 (Fotoprotetor)
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto de Ferro Hexahidratado
FRAP	Poder Antioxidante redutor de Ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power)
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de Potássio
RUV	Radiação ultravioleta
TPTZ	2,4,6-tripiridil -s- triazina
TROLOX	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido Carboxílico
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E DOS DIFERENTES EXTRATOS DE <i>R. OFFICINALIS</i>	19
3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL LIVRE DOS DIFERENTES EXTRATOS	19
3.2.1	Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais do Extrato	19
3.2.2	Determinação do Espectro de Absorção no UV	19
3.2.3	Determinação <i>in vitro</i> do Fator de Proteção Solar (FPS)	20
3.2.4	Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio dos Extratos ao Radical DPPH	21
3.2.5	Avaliação da Atividade Antioxidante por Diferentes Métodos <i>in vitro</i> do Extrato de Acetona 80% (EA) e Etanol 80% (EE) de <i>R. officinalis</i>	21
3.2.5.1	Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH*	21
3.2.5.2	Determinação da atividade sequestradora do radical ABTS ^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico))	22
3.2.5.3	Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)	23
3.2.5.4	Ensaio de quimioluminescência pelo sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP	23
3.2.5.5	Ensaio de quimioluminescência pelo sistema Xantina/luminol/XOD	24
3.2.6	Preparo de Diferentes Formulações Tópicas Adicionadas com EA e EE de <i>R. officinalis</i>	24
3.2.6.1	Avaliação da manutenção da atividade antioxidante e do FPS das formulações tópicas adicionadas de extratos	26

3.2.7	Avaliação da Eficácia <i>in vivo</i> do Extrato de <i>R. officinalis</i> EA e EE Incorporado em F2 na Redução do Estresse Oxidativo e Inflamação Cutânea Induzidos pela Radiação UVB.....	27
3.2.7.1	Animais experimentais	27
3.2.7.2	Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de lesões cutâneas pela radiação UVB.....	27
3.2.7.3	Protocolo de avaliação da eficácia da formulação tópica contendo extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i>	28
3.2.7.4	Avaliação do edema cutâneo	29
3.2.7.5	Avaliação da eficácia anti-inflamatória pelo ensaio de medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)	29
3.2.7.6	Avaliação da eficácia na redução da atividade/secreção de proteinases por zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio).....	29
3.2.7.7	Avaliação da eficácia na manutenção dos níveis do antioxidante endógeno GSH	31
3.2.7.8	Ensaio de ABTS.....	31
3.2.7.9	Ensaio de FRAP	32
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	32
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	34
4.1	RADIAÇÃO SOLAR	34
4.2	RADIAÇÃO SOLAR E DANOS CAUSADOS À PELE.....	35
4.3	EXTRATOS VEGETAIS COMO AGENTES FOTOQUIMIOPREVENTIVOS.....	43
4.4	<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> (ALECRIM)	45
4.5	FORMULAÇÕES COSMÉTICAS E SUA ESTABILIDADE	47
	REFERÊNCIAS.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO	59
5.1	EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO DE EXTRATO DE <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS	59

6	RESULTADOS.....	73
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO: GUIA PARA AUTORES – AAPS PHARMSCITECH	106

1 INTRODUÇÃO

Rosmarinus officinalis popularmente conhecido como alecrim, pertence à família Lamiaceae e é muito utilizada como flavorizante, conservante de alimentos e apresentam diferentes atividades biológicas, tais como, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, propriedades antimutagênicas e quimiopreventivas (PÉREZ et al., 2007), além de possuir baixa toxicidade (OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2009; DERWICH; BENZIANE; CHABIR, 2011; DEL RÉ; JORGE, 2012; KONTOGIANNI et al., 2012).

Os compostos responsáveis pelas atividades biológicas da planta são a fração volátil e os constituintes fenólicos. Estes últimos são representados principalmente por três grupos: diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico e rosmanol), os flavonoides (cirsimarina, diosmetina, diosmina, ginkwanina entre outros) e ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido clorogênico) (CUVELIER et al., 1996; ZHANG et al., 2014).

Tantos atributos justificam o desenvolvimento de uma gama de produtos referentes a indústria alimentícia, fitocosméticos, nutracêuticos e fitoterápicos (COUTO et al., 2012).

Entre estes produtos podemos destacar o uso em tratamento de patologias cutâneas. A pele é uma interface biológica com o meio ambiente exposta a fatores como radiação visível, radiação UV (RUV) e altas concentrações de oxigênio. A RUV é o fator físico mais importante (MELONI; NICOLAI, 2003) sendo dividida em: UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), alterações histoquímicas e mutações no DNA podem ocorrer quando a pele está desprotegida à ação cumulativa da RUV. Enquanto a radiação UVA ocasiona disfunções relacionadas ao envelhecimento precoce da pele, a radiação UVB interage diretamente com o DNA. Isso ocorre pois a radiação UVA apresenta um comprimento de onda superior e quantidade de energia inferior à radiação UVB (NASSER, 2010; BALOGH et al., 2011).

A ação desses comprimentos de onda geram radicais livres que serão os responsáveis por exemplo pela peroxidação lipídica e, caso haja deficiência de antioxidantes endógenos, a combinação do radical livre com a molécula lipídica irá liberar um átomo de oxigênio que iniciará a peroxidação do lipídeo poliinsaturado

produzindo moléculas ativas de peróxido que então, poderão causar danos celulares consideráveis (SGARBI; CARMO; ROSA, 2007; CAMPANINI et al., 2014). Portanto, a exposição a radiação solar aguda e crônica pode causar injúrias à pele, tais como fototoxicidade, fotoalergia, agravamento de doenças de pele pré-existentes, fotodermatoses, fotoenvelhecimento e fotocarcinogêneses, consequência da formação de radicais livres e da mobilização de íons metais de transição (PODDA et al., 1998; GEORGETTI et al., 2006).

A pele possui mecanismos de defesa antioxidante, sendo estes enzimáticos e não enzimáticos que interagem para fornecer proteção no espaço intra e intercelular (BARBOSA et al., 2010). Entretanto, a capacidade destes sistemas é limitada e pode ocorrer diminuição com a exposição excessiva a RUV (SAMPAIO; MORAES, 2010). Assim, muitos estudos buscam enriquecer o sistema de proteção cutâneo e prevenir e/ou tratar os danos da pele causados pela irradiação UV (GEORGETTI et al., 2006; FONSECA, 2010; CAMPANINI et al., 2013).

Frente aos efeitos deletérios da RUV, defesas profiláticas e terapêuticas incluem o uso de fotoprotetores que podem ser compostos de vários filtros UV. Os filtros são moléculas ou complexos moleculares que absorvem, refletem ou dispersam a RUV e dentre eles, encontram-se os filtros inorgânicos (bloqueadores físicos) e os filtros orgânicos (absorvedores químicos) (BALOGH et al., 2011).

Estudos recentes demonstram que a maioria dos filtros solares, tanto orgânicos quanto inorgânicos, apresentam sérios problemas de fotoestabilidade, levando a redução de sua eficácia e segurança. Dados recentes demonstraram que na presença de RUV, tanto dióxido de titânio (TiO_2) quanto óxido de zinco (ZnO), os filtros inorgânicos mais amplamente utilizados, apresentam marcante atividade fotocatalítica, o que leva a produção de EROS. Tal atividade é um fato intrigante, uma vez que a fotoestabilidade é um pré-requisito essencial para garantir a eficácia e segurança do filtro solar (FUJISHIMA; RAO; TRYK, 2000; JING et al., 2001; GURR et al., 2005; RAMPAL; PARKING; CRAMER, 2007). Também há relatos de que a Benzofenona-3, um filtro orgânico considerado de boa proteção, possa ser responsável por efeitos hormonais, ocasionar absorção percutânea, dermatite de contato e fotocontato, além de já ter sido detectada na urina humana e no leite materno (GONZALEZ, 2010; BALOGH et al., 2011). Em adição, estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostram que quando os filtros

solares orgânicos penetram nas camadas nucleadas da pele, o nível de EROS aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob RUV.

Portanto, considerando a estreita relação entre o aumento do estresse oxidativo e os efeitos danosos causados pela RUV, aliado ao fato de que estudos epidemiológicos demonstram que o uso de protetores e bloqueadores solares não é completamente efetivo na prevenção dos diversos malefícios causados pela exposição a RUV, o uso de antioxidantes aparece como importante alternativa nas terapias de fotoproteção (COOPER; RANGER-MOORE; BOWDEN, 2005; GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

O uso de agentes botânicos para proteção da pele tem recebido imenso interesse devido a capacidade dos antioxidantes na fotoproteção, levando em conta a quantidade de compostos naturais que apresentam essas características tal como os polifenóis. Estes compostos estão sendo explorados como agentes químio-preventivos, já que estudos mostraram a capacidade dos mesmos frente à inflamação, estresse oxidativo, danos ao DNA e supressão da resposta imune induzidos pela RUV, contribuindo assim, para a ação antifotocarcinogênica (FONSECA, Y.M. et al., 2010; BALOGH et al., 2011; VICENTINI, F.T.M.C et al., 2011).

Assim, corroborando a necessidade de suplementação da pele com antioxidantes exógenos para prevenir o estresse oxidativo cutâneo causado pela RUV e o aumento do interesse mundial por produtos de origem natural, torna-se interessante o estudo do extrato de *R. officinalis* incorporado em formulações tópicas como um fotoquimiopreventivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo obter o extrato de *R. officinalis*, avaliar seu mecanismo de ação antioxidante e avaliar sua ação fotoquimiopreventiva contra os danos causados pela RUVB quando incorporado em formulações tópicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter diferentes extratos de *R. officinalis* utilizando diferentes sistemas solventes;
- Caracterizar os extratos pela quantificação de polifenóis totais por método colorimétrico, determinar o espectro de absorção na região do UV (280 – 400 nm) e do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e determinar a atividade sequestradora de radical livre;
- Preparar emulsões tópicas adicionadas de extrato;
- Avaliar a eficácia *in vivo* do extrato de *R. officinalis* incorporado nas formulações tópicas na redução do estresse oxidativo e inflamação cutânea induzidos pela radiação UVB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E DOS DIFERENTES EXTRATOS DE *R. OFFICINALIS*

Amostras de folhas de *R. officinalis* foram obtidas em estabelecimento comercial local – Londrina – PR. Posteriormente, as folhas foram secas e trituradas em moinho de facas. Em seguida, a matéria-prima vegetal foi submetida ao processo de maceração dinâmica 1:10 (m/v) durante 24 h utilizando diferentes sistemas solventes: acetona ou etanol ou metanol a 20, 50 e 80% em água (v/v). Foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos foram submetidos a rotaevaporação seguido de liofilização para obtenção final dos extratos secos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL LIVRE DOS DIFERENTES EXTRATOS

3.2.1 Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais do Extrato

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado por método colorimétrico, empregando como reagente o Folin-Ciocalteu e o ácido gálico foi utilizado como padrão (GEORGETTI et al., 2006). As amostras do extrato foram diluídas e posteriormente, alíquotas de 0,5 mL das amostras foram misturadas com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na₂CO₃ 10%. O branco foi preparado com 0,5 mL de água deionizada, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na₂CO₃ 10%. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi determinada a 760 nm. As amostras foram analisadas em triplicata.

3.2.2 Determinação do Espectro de Absorção no UV

Para determinar o comprimento de onda máximo (λ máx.) e absorvância máxima (A máx.), os extratos foram diluídos em álcool etílico 80% e submetida a varredura entre os comprimentos de onda de 290 a 400 nm para

verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B (UVA e UVB).

3.2.3 Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

O FPS *in vitro* foi determinado, pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986). Os extratos foram diluídos com álcool etílico 96° GL até obtenção da concentração de 0,2 µL/mL. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm em intervalos de 5 nm. O FPS foi calculado seguindo a Equação 1:

$$\text{FPS} = \text{FC} \times 290 \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times i(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad (1)$$

Onde FC é o fator de correção igual a 10; EE (λ) é o efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda λ; i (λ) é a intensidade da luz solar no comprimento de onda λ; Abs (λ) é a leitura espectrofotométrica da absorvância da amostra em cada comprimento de onda. O branco utilizado nas análises foi o álcool etílico 96° GL e como controle positivo foi utilizado o metoxicinamato de octila.

A soma das absorvâncias obtidas de 290 a 320 nm foram alcançadas de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1: Estimativa empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria (Mansur et al., 1986; Sayre et al., 1979) com um fator de correção igual a dez.

λ (nm)	EE (λ) x I (λ) valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874

305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ);

I (λ) = intensidade de luz solar no comprimento de onda (λ).

3.2.4 Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio dos Extratos ao Radical DPPH

A atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos foi avaliada pela capacidade de doar átomos de hidrogênio ao radical livre DPPH (GEORGETTI et al., 2006). Alíquotas de 50 μ L das amostras foram adicionadas ao meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH• 250 μ M. A mudança na absorvância foi medida em espectrofotômetro após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente. A atividade sequestradora dos extratos foi expressa em milimoles de equivalente de padrão Trolox por μ g/mL de extrato usando a curva de calibração de Trolox (0,2 – 0,5 mM).

3.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante por Diferentes Métodos *in vitro* do Extrato de Acetona 80% (EA) e Etanol 80% (EE) de *R. OFFICINALIS*

3.2.5.1 Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH•

A capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical livre DPPH• pelos extratos obtidos com os solventes acetona 80% (EA) e etanol 80% (EE) foi realizado conforme descrito no item 3.2.4. Alíquotas de 50 μ L das amostras dos extratos em diferentes concentrações foram adicionadas ao meio reacional para alcançar no mesmo as concentrações de 3 - 5000 μ g/mL para EA e de 7,81 - 2000

$\mu\text{g/mL}$ para EE. O branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol absoluto. O controle positivo foi constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH^{*} 250 μM . Preparou-se também o controle de cor com 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), 1,5 mL de etanol absoluto e 50 μL das amostras.

A capacidade doadora de hidrogênio (%) dos extratos foi determinada por meio da seguinte Equação (2):

$$\% \text{ atividade} = [1 - (\text{Absorvância amostra} / \text{Absorvância do controle})] \times 100 \quad (2)$$

3.2.5.2 Determinação da atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} (2,2' azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico))

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+}, inicialmente foi formado o radical ABTS^{•+} a partir da reação de 7mM do sal 2,2' azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico (ABTS) com 2,45 mM de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (PASQUINI-NETTO et al., 2012; VIEIRA et al., 2011), mantidos na ausência de luz por 16h em geladeira. O radical cátion ABTS^{•+} é intensamente colorido, e sua capacidade antioxidante é avaliada conforme ocorre o decréscimo da cor quando o composto em estudo reage diretamente com o radical ABTS^{•+}. Este é formado após o ABTS ser oxidado por compostos oxidantes (VIGNOLI et al., 2011). Posteriormente, a solução de radical ABTS foi diluída em etanol até apresentar uma absorvância de 0,700 a 0,800 em 730 nm. Amostras foram preparadas por meio de diluições em etanol até alcançarem concentrações no meio reacional que variaram de 0,049 – 50 $\mu\text{g/mL}$ para EA e de 0,049 – 37,5 $\mu\text{g/mL}$ para EE. Para a análise, foram adicionados 50 μL de cada amostra em 4 mL de solução de ABTS^{•+} diluído. Após 6 minutos de incubação à TA, a mudança na absorvância foi medida em espectrofotômetro. O branco foi composto apenas de etanol absoluto e um controle positivo foi feito com 50 μL de etanol em 4 mL de solução ABTS^{•+}. A atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} foi calculada pela Equação 2.

3.2.5.3 Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)

A metodologia proposta é baseada na formação do complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-S-triazina) com o Fe (III). O complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ) quando na presença de um antioxidante em condições ácidas. A coloração desta reação é azul intenso com absorção máxima em 593 nm (SUCUPIRA, et al.; 2012). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, sendo este, um análogo hidrossolúvel da vitamina E e que foi utilizado como padrão (VIGNOLI, et al.; 2011). O reagente FRAP foi preparado com 2,5 mL de TPTZ 10 mM em HCl 40 mM, 2,5 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM pH 3,6. Foi incubado à 37°C por 30 minutos. Alíquotas de 10 μL do padrão Trolox nas concentrações de 0,4; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 mMol ou 10 μL das amostras foram adicionados no meio reacional contendo 90 μL de H_2O e 900 μL do reagente FRAP. Após incubação à 37°C por 30 minutos a absorvância foi determinada em 593 nm. O branco foi constituído de 10 μL de etanol, 900 μL do reagente FRAP e 90 μL de H_2O . Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em mMol/L Trolox/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra.

3.2.5.4 Ensaio de quimioluminescência pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP

A quimioluminescência é um método baseado na capacidade do luminol em gerar luminescência sob um fluxo de radicais livres. Espécies reativas de oxigênio criam certa luminescência que é intensificada na presença do luminol porém, a mesma é eliminada quando adicionado um antioxidante no sistema, uma vez que o antioxidante servirá de “sequestrador” de radicais livres, diminuindo então a luminescência anteriormente gerada (TOMEI; SALVADOR; 2007). Para a realização da metodologia, alíquotas de 10 μL de amostra de concentrações que variaram de 0,078 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para EA e de 0,00625 – 0,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para EE no meio reacional, foram adicionados a 380 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), 10 μL de solução de luminol 2 mg/mL em dimetilsufóxido (DMSO) até alcançar uma concentração final de $1,13 \times 10^{-4}$ M e, na sequência, 100 μL de H_2O_2 foi incluído numa concentração final de 5×10^{-5} M. A reação teve seu início com a incorporação de 500 μL de peroxidase na

concentração final de 0,2 UI/mL. Um controle foi feito com a adição de 10 µL de etanol 80% ao invés da amostra de extrato. Após a leitura, a porcentagem de atividade sequestradora de radicais livres do extrato foi determinada de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ inibição} = \left(100 - \left(\frac{\text{luminescência amostra}}{\text{luminescência controle}} \right) \right) \cdot 100 \quad (3)$$

3.2.5.5 Ensaio de quimioluminescência pelo sistema Xantina/luminol/XOD

Este método de quimioluminescência avalia a atividade sequestradora do radical superóxido que é produzido pela reação xantina/xantina-oxidase. O radical superóxido formado, oxida o luminol e este emite luz, que é detectada por luminômetro. Com a adição de um antioxidante no sistema, ocorrerá o sequestro do radical superóxido e conseqüentemente a diminuição da quimioluminescência (OLIVEIRA, 2007). Para a análise, alíquotas de 10 µL de amostra de concentrações que variaram de 0,061 – 500 µg/mL para EA e de 0,03 – 160 µg/mL para EE no meio reacional, foram adicionados a 400 µL de tampão glicina (0,1 M + EDTA 1mM com NaOH 0,1M, pH 9,4), 10 µL de solução de luminol 6 mM, 100 µL de xantina oxidase (20 UI/mg) e 150 µL de xantina (6 mM). Um controle foi feito com a adição de 10 µL de etanol 80% ao invés da amostra de extrato. A porcentagem de atividade sequestradora de radical ânion superóxido do extrato foi determinada de acordo com a Equação 3.

3.2.6 Preparo de Diferentes Formulações Tópicas Adicionadas com EA e EE de *R. OFFICINALIS*

Na formulação de medicamentos, os excipientes farmacêuticos apresentam destaque devido a sua importância para assegurar o alcance da forma farmacêutica adequada ao uso e ao efeito terapêutico pretendido, controlando e influenciando de maneira significativa a transferência do princípio ativo contido no medicamento (RAMOS; MORAIS, 2013). Dessa forma, a formulação F1 e F2 foram

preparadas com alto e baixo conteúdo da cera auto-emulsionante não iônica Polawax[®] (álcool cetosteárico + polioxietileno derivado de ácido graxo de sorbitano 200E), respectivamente. Para estabilização da F2, foi utilizado o colóide hidrofílico não iônico Natrosol[®] (hidroxietilcelulose) e foi adicionado Transcutol[®] como promotor de absorção. A formulação F3 foi constituída de álcoois cetosteárico e cetosteárico etoxilado 200E como agentes de consistência e emulsionante, respectivamente. Com ação emoliente, foi empregado o miristato de isopropila e como emulsificante, o monoestearato de glicerila foi aplicado. Foi utilizado o metoxicinamato de octila como filtro solar anti-UVB e benzofenona-3 que é um filtro solar anti-UVA. Uma mistura de parabenos como sistema conservante, triglicerídeos (TG) de ácidos cáprico e caprílico como emoliente, propilenoglicol como agente umectante e água deionizada como veículo, foram adicionados em todas as formulações. Após 24h, extrato de *R. officinalis* obtido com acetona 80% ou com etanol 80% foram incorporados ou não às formulações na concentração de 5% (Tabela 2).

Tabela 2: Componentes das formulações p/p (%)

Matérias-primas				
	F1 ^a	F2 ^b	F3 ^c	
Polawax®	15,0	2,0	-	
Propilenoglicol	5,0	5,0	2,0	
TG de ácidos cáprico e caprílico	3,0	3,0	-	
Phenonip®	0,8	0,8	0,8	
Natrosol®	-	1,5	-	
Transcutol®	-	15,0	-	
Álcool Cetoestearílico 30/70	-	-	8,0	
Álcool Cetoestearílico 20OE	-	-	3,6	
Monoestearato de glicerila	-	-	2,0	
Miristato de isopropila	-	-	3,0	
Metoxicinamato de octila	-	-	5,0	
Benzofenona-3	-	-	4,0	
Água deionizada qsp	100,0	100,0	100,0	

^aFormulação 1 - Creme; ^bFormulação 2 – Gel Creme; ^cFormulação 3 - Fotoprotetor.

3.2.6.1 Avaliação da manutenção da atividade antioxidante e do FPS das formulações tópicas adicionadas de extratos

Para avaliação da atividade antioxidante do EA e EE após incorporação nas formulações, foram realizados os testes de DPPH e ABTS

conforme descrito anteriormente. Os extratos de acetona 80% e etanol 80% e as formulações tópicas adicionadas dos extratos foram diluídas em etanol 80% de forma a alcançar no meio reacional a mesma concentração dos ativos para comparação da atividade antioxidante. As formulações sem adição de extratos também foram diluídas na mesma proporção para verificação de possíveis interferências nos ensaios. Foram realizados controles positivos utilizando-se etanol e formulações sem o extrato. As atividades antioxidantes foram calculadas conforme aplicação da Equação 2.

O FPS das formulações acrescidas dos extratos foi realizada conforme seção “Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)”.

3.2.7 Avaliação da Eficácia *in vivo* do Extrato de *R. officinalis* EA e EE Incorporado em F2 na Redução do Estresse Oxidativo e Inflamação Cutânea Induzidos pela Radiação UVB

3.2.7.1 Animais experimentais

Como modelo animal foi utilizado camundongos sem pêlo da linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com peso de 20 a 30 g. Os animais foram mantidos no biotério do Hospital Universitário de Londrina-PR, em sala com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas e com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (OF.CIRC.CEUA nº 44/2017, processo nº 2974.2017.14).

3.2.7.2 Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de lesões cutâneas pela radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução das lesões fotooxidativas foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS. A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando um

radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CASAGRANDE et al., 2006; CAMPANINI et al., 2013). Camundongos sem pelos foram colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos a radiação a temperatura ambiente. A medida da radiância foi realizada em toda a extensão do compartimento, à distância de 20 cm e com a presença da tela plástica utilizada para conter os animais. A radiância da lâmpada utilizada foi de 0,209 mW/cm². Para indução da inflamação e estresse oxidativo foi utilizada a dose de radiação de 4,14 J/cm² (SHINDO et al., 1994; CAMPANINI et al., 2013; IVAN et al., 2014). Shindo et al., 1994 demonstrou que a dose de 25 J/cm² equivale a 4-5 horas de exposição ao sol de outono na latitude da Califórnia (38°N).

3.2.7.3 Protocolo de avaliação da eficácia da formulação tópica contendo extrato de *R. officinalis*

Os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n=5).

Sendo:

Grupo 1: controle (não recebeu irradiação e tratamento);

Grupo 2: controle irradiado sem tratamento;

Grupo 3: irradiado e tratado com formulação F2 sem extrato (controle);

Grupo 4: irradiado e tratado com formulação F2 + EA;

Grupo 5: irradiado e tratado com formulação F2 + EE.

Os animais foram tratados com 0,5 g de formulação, com ou sem extrato, administrada com o auxílio de um pincel no dorso do animal (área de aproximadamente 24,5 cm²) 12h, 6h, imediatamente antes e 6h após o início da irradiação. Após 12h do término da irradiação, os animais foram eutanasiados com isoflurano a 3%, a pele do dorso foi retirada, limpa, lavada com NaCl 145 mM e armazenada a -80°C para as análises subsequentes. A análise do edema cutâneo foi realizado imediatamente após a eutanásia dos animais. Estes foram divididos em grupos com 5 animais e o experimento foi repetido 1 vez.

3.2.7.4 Avaliação do edema cutâneo

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados, irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica foram coletadas com auxílio de um molde com área fixa para avaliação do edema o qual foi expresso pela variação do peso de pele, comparando o grupo não irradiado com os grupos irradiados não tratados receberam o veículo ou tratados com formulação tópica (AFAQ et al., 2005; BHATIA et al., 2011; CAMPANINI et al., 2013).

3.2.7.5 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pelo ensaio de medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados, irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica foram coletadas em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio, homogeneizadas com auxílio do turrax e centrifugadas. 7 µL do sobrenadante de cada amostra foi misturado com 200 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio e a atividade da MPO foi determinada em 450 nm. A atividade da MPO das amostras foi comparada com a atividade da MPO de uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/mg de pele (BRADLEY et al., 1982; CASAGRANDE et al., 2006; CAMPANINI et al., 2013).

3.2.7.6 Avaliação da eficácia na redução da atividade/secreção de proteinases por zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados, irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica foram coletadas em microtubos e foi realizado um *pool* das amostras de cada grupo. Após diluição (1:4) e trituração (T18 basic, IKA) das amostras de pele dos animais, estas foram homogeneizadas em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo cloreto de cálcio (CaCl₂) 10 mM e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de

fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida) com auxílio de turrax. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C e os sobrenadantes das amostras foram submetidos ao ensaio de zimografia. O gel de eletroforese apresentava uma espessura de 1 mm, composto por um gel de separação e um gel de concentração, preparado de acordo com a Tabela 3. A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8,3) contendo 0,1% de SDS e foi submetida a uma pré-corrída de 10 mA por 15 minutos antes da aplicação das amostras. Após a aplicação das amostras (25 µL), a corrente aplicada durante a eletroforese foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo esta última mantida constante por 15 minutos após a saída do corante do gel de separação. Após a eletroforese, o gel foi lavado com solução de triton X-100 2% por 1 hora, sob constante agitação e incubado por 16 horas em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo CaCl₂ 10 mM e azida sódica 0,02% a 37°C. O gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água deionizada. O gel foi descorado com ácido acético 20% para visualização das bandas. Zonas de atividade enzimática foram detectadas como regiões de coloração negativa contra um fundo escuro. A atividade proteolítica foi analisada qualitativamente comparando os resultados das amostras dos animais tratados com a formulação tópica adicionada do mesmo com os controles não tratados e o programa utilizado para a comparação das bandas foi o ImageJ®. (CAMPANINI et al., 2013; CASAGRANDE et al., 2006; FONSECA et al., 2011; MARTINEZ, 2015). A dosagem de proteína das amostras foi realizada utilizando-se o método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Tabela 3: Constituintes do gel de separação e do gel de concentração.

Substância	Quantidade (µL)	
	Gel de separação	Gel de concentração
Água miliQ	5870	4060
Tampão Tris/HCl 1 M (pH 8,8 com 0,4% SDS	3750	-

Tampão Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8 com 0,4% SDS)	-	1670
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	5000	860
Gelatina 10%	375	-
Persulfato de amônio 10%	50	33
Temed 20%	10	

3.2.7.7 Avaliação da eficácia na manutenção dos níveis do antioxidante endógeno GSH

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados, irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica foram coletadas em EDTA 0,02M e homogeneizadas com auxílio do turrax. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante final foi retirado para análise. O ensaio para quantificação dos níveis de GSH na pele foi realizado em microplaca por meio da adição de 50 µL de amostra ao meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol (1,9 mg/mL de metanol). A absorvância foi determinada após 5 minutos de incubação a 405 nm. A curva analítica foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (MORON; DEPIERRE; MANNERVIK, 1979; SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEV, 2007; CAMPANINI et al., 2013).

3.2.7.8 Ensaio de ABTS

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não

irradiados, irradiados não tratados (receberam o veículo) ou tratados com formulação tópica foram coletadas e homogeneizadas em 500 μ L de KCl (1,15%) com auxílio do turrax e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a reação foi adicionado 40 μ L do sobrenadante a 1 mL de solução de ABTS diluída. A solução de ABTS foi produzida reagindo 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em temperatura ambiente por no mínimo 16 horas antes do uso. A solução ABTS para uso na reação foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) até uma absorvância de 0,700 a 0,800 em 730 nm. A reação foi incubada por 6 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em 730 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (1 a 25 μ M) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol Trolox / mg de pele (KATALINIC et al., 2005; CAMPANINI et al., 2014).

3.2.7.9 Ensaio de FRAP

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados, irradiados não tratados receberam o veículo ou tratados com formulação tópica foram coletadas e homogeneizadas em 500 μ L de KCl (1,15%) com auxílio do turrax e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a reação foram utilizados 30 μ L do sobrenadante e 1 mL de reagente FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM a 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos antes do uso. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente foi realizada a leitura em 595 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (0,5 a 20 μ M) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como μ M equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005; CAMPANINI et al., 2014).

3.3 Análise Estatística dos Resultados

As concentrações do extrato que inibem o processo oxidativo *in vitro* em 50% (IC₅₀) foram estimadas pelo software GraphPad Prism[®], versão 6.00,

utilizando uma curva hiperbólica e apresentadas pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e foram representativas de 3 experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram analisados estatisticamente com o mesmo software por análise de variância com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média \pm EPM de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo e foram representativos de 2 experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 RADIAÇÃO SOLAR

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação de ondas eletromagnéticas que são divididas em três comprimentos de ondas principais: visível (VIS), infravermelha (IR) e Ultravioleta (UV) (MATSUMARA; ANANTHASWAMY, 2004). A radiação UV é dividida em: (1) UVC – 270-290 nm, que é filtrada na camada de ozônio e estratosfera; (2) UVB - 290-320 nm, que afetam principalmente a camada epidermal, onde causa eritema, induz lesões ao DNA e aumenta o risco de mutações fatais que eventualmente desencadeiam o câncer de pele e reduz as chances das células malignas serem reconhecidas e destruídas, uma vez que promove fotoimunossupressão e; (3) UVA – subdividida em UVA II (320-340 nm) e UVA I (340-400 nm) (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Em virtude do maior comprimento de onda, os raios UVA alcançam a camada dérmica, estimulam a pigmentação e estão relacionados ao envelhecimento e cânceres de pele (CIBA SPECIALTY CHEMICALS, 2002).

Tanto a qualidade quanto a quantidade da radiação solar UV são modificadas pela passagem através da atmosfera. As principais interações ocorrem na estratosfera (~10-50 km acima do nível do mar), onde ocorre absorção desta radiação na camada de ozônio e difusão pelas moléculas de N_2 e O_2 . Na troposfera (0 a ~10km acima do nível do mar) a absorção pelos poluentes como ozônio, NO_2 e SO_2 , e a difusão pelos particulados e nuvens também atenuam este processo (DIFFREY, 2002).

Sabe-se que a radiação ultravioleta é nociva aos animais, plantas e seres humanos sendo filtrada por um dos gases que compõe a atmosfera, o ozônio (O_3). Este apresenta diferentes funções na atmosfera dependendo da altitude. Quando na estratosfera, o ozônio é gerado através da interação da RUV com a molécula de oxigênio, quebrando esta em dois átomos de oxigênio (O) que irá reagir com uma molécula de oxigênio (O_2), formando assim o ozônio (O_3). A absorção da RUV do tipo C na camada estratosférica é de 90% pelo ozônio (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016; WORLD WIDE FOUND FOR NATURE, 2016).

A destruição da camada de ozônio é dada por produtos químicos como Halon, Tetracloreto de Carbono (CTC), Hidroclorofluorcabono (HCFC), Clorofluorcarbono (CFC) e Brometo de Metila e são denominadas como Substâncias Destruidoras da Camada de Ozônio – SDOs, uma vez que degradam a camada de ozônio quando liberadas no meio ambiente e vão atmosfera acima. Gases contendo átomos de cloro (Cl), flúor (F) ou bromo (Br), liberam radicais livres que devastam as moléculas de ozônio por efeito da RUV (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

Uma molécula de CFC é capaz de destruir 10.000 moléculas de ozônio, e ainda que o Protocolo de Montreal tenha obtido reduções nas emissões de CFCs que são liberados por atividades industriais, vazamentos e esvaziamentos de gases de aparelhos refrigerados e de ar condicionado, e de latas de aerossóis que utilizam essa substância como propelente, níveis significativos persistirão até o século XXII devido a um tempo de meia-vida de 75 anos do CFC (RIBEIRO, 2013).

4.2 RADIAÇÃO SOLAR E DANOS CAUSADOS À PELE

O principal fator de risco para o surgimento do câncer de pele é a radiação solar e, dependendo do tipo e da duração da exposição, alterações clínicas e histológicas na epiderme levarão a perda de água e elasticidade, eritema, queimadura, descamação, manchas, fotoimunossupressão, fotossensibilidade, fotoalergia, fotoenvelhecimento, elastose, danos oculares (FONSECA, 2010), rugas, aspereza, ressecamento, teleangectasias, pigmentação irregular e lesões variadas que podem ser benignas, pré-malignas ou malignas, além de variadas doenças (Quadros 1 e 2) (SIMIS, 2006).

A radiação UV apresenta como efeito normal e benéfico, a produção de vitamina D3 que pode ser combinada com determinadas drogas na terapia da pele, como psoríase e vitiligo (SIMIS, 2006; SGARBI; CARMO; ROSA, 2007; DIAS, 2011).

Quadro 1 – Doenças de fotossensibilidade: doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de uma erupção cutânea após a exposição à luz.	
IDIOPÁTICAS	GENODERMATOSES
Erupção solar polimorfa	Pênfigo crônico benigno familiar
Prurigo actínico	Ceratose folicular (doença de Darier)
Hidroa vaciniforme	Síndrome de Bloom
Hidroa estival	Síndrome de Rothmunk-Thompson
Dermatite actínica crônica	Síndrome de Kindler
Urticária solar	Síndrome de Cockayne
DEGENERATIVAS E NEOPLÁSICAS	Xeroderma pigmentoso
Lesão actínica	Tricotiodistrofia
Ceratose actínica	Doença de Hartnup
Carcinoma basocelular	DOENÇA INFECCIOSA
Carcinoma epidermóide	Herpes simples labial
Melanoma maligno	DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS
Secundárias a agentes exógenos	Pelagra
Fototoxicidade: de contato e sistêmica	Deficiência de piridoxina
Fotoalergia: de contato e sistêmica	DOENÇAS DERMATOLÓGICAS PRIMÁRIAS
Erupções medicamentosas	Dermatite atópica
METABÓLICAS	Dermatose acantolítica transitória
Porfíria eritropoiética	Poroceratose actínica superficial disseminada
Protoporfíria eritropoiética	Líquen plano actínico
Porfíria cutânea tarda	Psoríase
Porfíria variegada	Mucínose eritematosa reticular
DERMATOSES FOTOEXACERBADAS	Acne rosácea
Doenças auto-imunes	Acne
Lúpus eritematoso	Doença de Darier
Dermatomiosite	Doença de hariley-Hailey
Pênfigo	
Pênfigo foliáceo	
Penfigóide bolhoso	

Fonte: Simis (2006)

Quadro 2 – Fotodermatoses mais comuns, de acordo com a idade em que os sintomas ocorrem pela primeira vez.
INFÂNCIA
<p>Erupção primaveril juvenil (lesões nas orelhas na primavera)</p> <p>Erupção solar polimorfa (lesão pruriginosa na área em V do pescoço e em outros locais)</p> <p>Protoporfiria eritropoiética (dor em ardência, níveis aumentados de protoporfirina nas hemáceas)</p> <p>Prurigo actínico (lesões na ponta nasal, HLA-DR4)</p> <p>Hidroa vaciniforme (muito rara, formação de cicatrizes)</p>
VIDA ADULTA
<p>Erupção solar polimorfa (mulheres com lesão pruriginosa em V do pescoço e em outros locais)</p> <p>Fotossensibilidade induzida por drogas (todas as áreas expostas ao sol, fototeste positivo)</p> <p>Urticária solar (as lesões surgem dentro de 5-10 min. e desaparecem em 1-2h) (urticária no fototeste)</p> <p>Lúpus eritematoso (anticorpos anti-Ro/SS-A, imunofluorescência cutânea)</p> <p>Porfiria cutânea tarda (determinações de porfiria)</p>
IDADE AVANÇADA
<p>Dermatite actínica crônica (vermelhidão persistente da face em homens idosos)</p> <p>Fotossensibilidade induzida por drogas (todas as áreas expostas ao sol, fototeste positivo)</p> <p>Linfoma cutâneo de células T (células CD4+ no exame histológico)</p> <p>Dermatomiosite (nível de creatinina na urina de 24 horas)</p>

Fonte: Simis (2006)

A primeira linha de defesa contra a RUV é a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo (EC) que é uma barreira altamente eficiente. Entretanto, a perda da sua função em consequência da ação da RUV ainda permanece desconhecida. A radiação UVC é predominantemente filtrada pela camada de ozônio na estratosfera, enquanto a radiação UVB mostra seus efeitos na epiderme e a radiação UVA penetra mais profundamente na derme como mostrado na Figura 1, interagindo também com o estrato córneo e epiderme. Portanto, observa-se que a exposição na pele não é limitada para o estrato córneo superior, sendo um efeito da RUV muito mais marcado em níveis mais profundos (BINIEK; LEVI; DAUSKARDT, 2012).

Fonte: Adaptado de Dauskardt (2012)

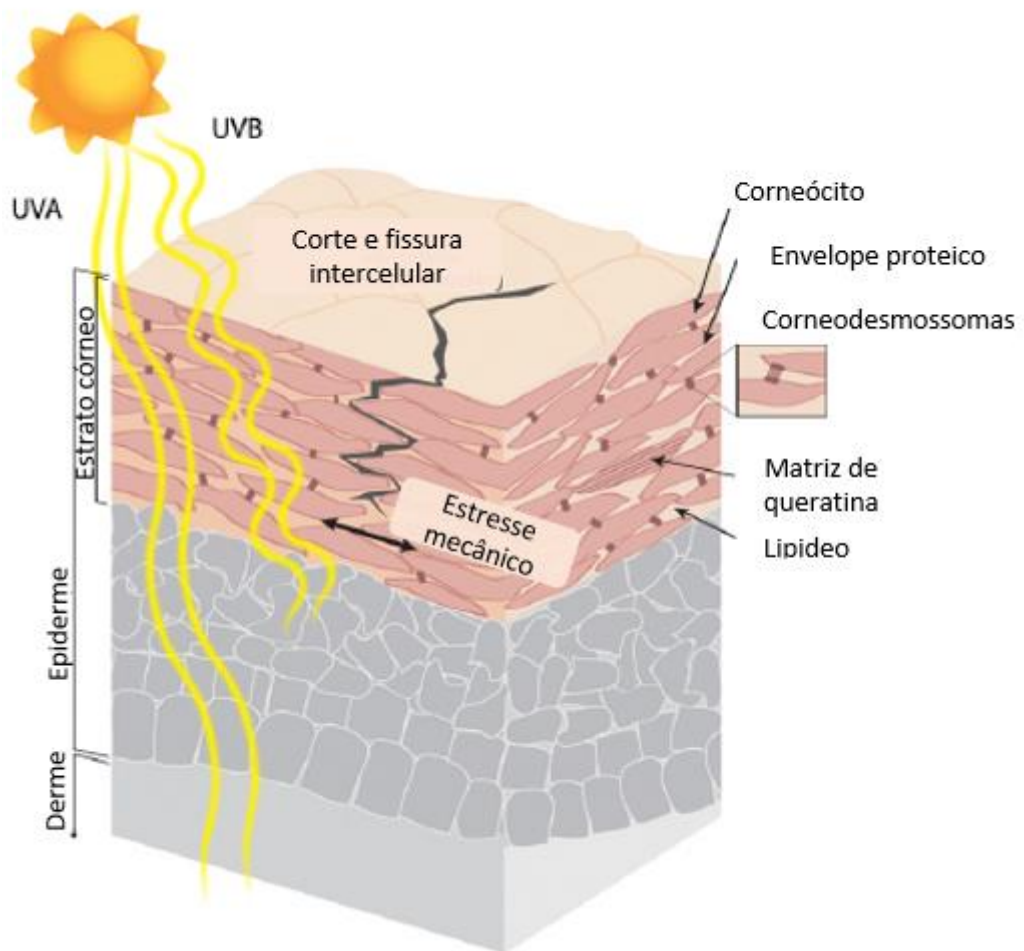


Fig. 1. Estrutura esquemática da pele humana e a penetração de diferentes ondas de UV. UVB penetra principalmente na epiderme.

A RUV, particularmente a UVB, é a principal responsável pelos fotodanos cutâneos que podem ser danos agudos e crônicos da pele, tais como manchas, queimaduras (vermelhidão e até bolhas), descamação e câncer de pele. Quando age sobre a pele, promove uma diversidade de reações químicas e morfológicas, levando a alterações na epiderme como o espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermo-epidérmica. Dessa forma, é um potente carcinógeno que provoca danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) diretamente ou por meio da formação de radicais livres que podem levar a uma resposta inflamatória e consequente perda da barreira de proteção (SGARBI; CARMO; ROSA, 2007; MACHADO et al., 2011).

A pigmentação da pele é um dos primeiros eventos em resposta a radiação UV, que aumenta a proliferação e atividade de melanócitos, seguido pela síntese e ativação da tirosinase. Os melanócitos são responsáveis pelo sistema de pigmentação da pele, além de serem relevantes fontes de várias citocinas, tais como, IL-1 β e TNF- α , que são liberadas pelas células expostas a radiação ultravioleta B (SILVEIRA et al., 2013). Além disso, a pele sob estresse oxidativo, ativa a hialuronidase, enzima responsável pela despolarização do ácido hialurônico, que em excesso promove a decomposição dessa macromolécula, conduzindo à destruição da rede de proteoglicanos. Isso resulta na desregulação da homeostase da pele, agrava o estado inflamatório e alérgico, além de promover aspecto envelhecido na pele (FERRERES et al., 2012).

Diversos tipos de lesões de DNA com diferentes propriedades mutagênicas, ocorrem quando há a irradiação de amostras biológicas com a RUV, levando a formação de dímeros de ciclobutanodipirimidina (CPDs) e os pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (6-4 PPs) (Fig. 2) (SIQUEIRA, 2014). Ainda que a RUV não seja absorvida pelos ácidos nucleicos, pode ocorrer uma indução nas células e levar a uma cascata de fotoreações acompanhadas pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (NEVES, 2014).

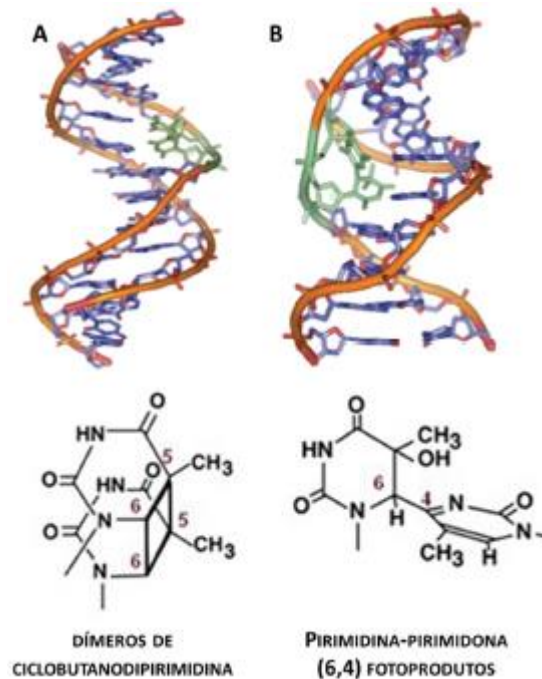


Fig. 2. Folesões induzidas pela exposição à radiação UVB (em verde): dímeros de ciclobutanodipirimidina (A) e pirimidina-pirimidona (6,4) fotoprodutos (B).

Fonte: Siqueira (2014)

A exposição da pele à RUV gera diversas EROS após um processo de fotossensibilização dos cromóforos presentes na pele. Estes podem ser os ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos, quinonas, flavinas, porfirinas, carotenoides, 7-deidrocolesterol (que absorvem UVB) melanina e ácido urocânico (que absorvem UVB e UVA) (SIQUEIRA, 2014). As EROS geradas incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e oxigênio singlete (1O_2), sendo que estes também são produzidos por neutrófilos, cujo número é aumentado na pele fotodanificada e contribuem para o estado pró-oxidante global. A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o qual é capaz de atravessar membranas celulares e, reagindo com Fe (II) leva a geração do radical hidroxil (HO^{\cdot}) que é altamente tóxico (WLASCHEK et al., 2001). Ambos, oxigênio singlete e radical hidroxil podem iniciar peroxidação lipídica em membranas celulares, o que leva a alterações de sua fluidez e permeabilidade (GABORIAU et al., 1993).

As EROS também estão envolvidas no processo de inflamação cutânea, em danos ao DNA (PATHAK; FITZPATRICK, 1993), em alterações nas funções celulares, bem como na depleção de sistemas antioxidantes enzimáticos

(catalase, SOD, glutathione peroxidase e glutathione redutase) e não enzimáticos (glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno), em alterações nas fibras elásticas (elastose solar) (PINNELL, 2003) e em danos em proteínas (SANDER, 2002). Além disso, o crescente aumento da produção de EROS consequentes da radiação solar, potencializa a sinalização redox e ativam genes específicos como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (LENZ et al., 2005), as quais são responsáveis pela degradação de colágeno e fibras elásticas da pele (KIM et al., 2005).

Sabe-se que mediadores inflamatórios, como o TNF- α , estão associados com disfunção mitocondrial e aumento da geração de EROS, conforme MOE et al., 2004 apresentaram em seus estudos *in vitro*. As células inflamatórias irão produzir EROS e causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA (HALLIDAY, 2005). O fator nuclear-kappa B (NF-kB) é sensível ao estresse oxidativo e capaz de ativar genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) que promovem a reação de outras células efetoras como leucócitos e células endoteliais (CARINI et al., 2000; FUCHS, 1998).

Sendo a neoplasia de maior incidência no Brasil, o câncer de pele exige maior compreensão para influenciar tanto na proteção quanto na exposição à RUV, principalmente em populações de cor de pele branca, onde se tem observado um crescimento expressivo quanto ao melanoma. Fatores genéticos e fenotípicos como por exemplo: história familiar de câncer de pele, radiação ultravioleta (UV), depleção da camada de ozônio, aumento da longevidade, mudanças no estilo de vida do homem moderno, tipo de pele, cor de olhos e cabelos, tendência a bronzeamento, queimaduras e sardas, e diminuição de reparo do DNA, são fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia. Em latitudes mais altas do globo, observa-se maiores níveis de câncer de pele porém, não limitado a eles. Assim, pode-se considerar um efeito global (SGARBI; CARMO; ROSA, 2007; CASTILHO; LEITE; SOUSA, 2010; ; RIBEIRO, 2013).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos é de 170.000 (INCA, 2018), sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres com um número de mortes de 1.769, sendo 1.000 homens e 769 mulheres (SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE, 2013).

O câncer de pele não melanoma corresponde ao câncer mais frequente no Brasil e, portanto, o de maior incidência e mais baixa mortalidade

devido aos altos percentuais de cura. Os indivíduos mais acometidos são os de pele clara sensíveis à RUV ou com doenças cutâneas prévias, sendo mais raro em negros e crianças (com exceção daqueles já portadores de doenças cutâneas anteriores) e mais comum em pessoas com mais de 40 anos. Há dois tipos de tumores de diferentes linhagens do câncer de pele não-melanoma: o carcinoma epidermóide e o carcinoma basocelular, sendo este último o mais incidente porém, o menos agressivo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016).

A pele delimita a área de interação entre o organismo e o meio ambiente, dispondo a maior área superficial do corpo e pode ser acometida com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são geradas devido a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos que atuam nesse órgão, principalmente a RUV e a poluição. A RUV, tem sua energia absorvida pelos cromóforos celulares da pele como melanina, DNA, RNA, proteínas, lipídeos, água e aminoácidos aromáticos e convertida em energia química. No entanto, a geração das EROs pode ocorrer a partir da interação desses cromóforos energizados com o oxigênio molecular, podendo ser espécies radicalares ($\bullet\text{OH}$ – hidroxil; $\text{O}_2^{\bullet-}$ – ânion superóxido; NO^\bullet – óxido nítrico e RO_2^\bullet – peroxil) e não radicalares (H_2O_2 – peróxido de hidrogênio, $^1\text{O}_2$ – oxigênio no estado singlete) (FONSECA, 2010; SILVA, 2012; SIQUEIRA, 2014).

Existem mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos para que seja mantida a integridade das estruturas celulares e o equilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a formação de EROS. Reações bioquímicas oxidativas e fatores externos produzem EROS continuamente nas células porém, em circunstâncias anormais, o nível de EROS pode aumentar e levar a depleção das defesas antioxidantes naturais. Tais como glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, que agem como neutralizadores do agente oxidante antes que ocorra a lesão. O segundo mecanismo é constituído pelo ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela glutathiona peroxidase, com a finalidade de recompor a lesão gerada. Com exceção da vitamina E que é um antioxidante estrutural de membrana, em grande parte agentes antioxidantes são intracelulares. Quando há um desequilíbrio desses mecanismos de defesa pró-oxidante/antioxidantes, anomalias metabólicas e degeneração de macromoléculas biológicas pode sobrevir. A RUV pode acarretar na liberação de fosfolipídeos em resposta a desorganização da

membrana celular. Esses fosfolipídeos estão vinculados ao aumento da atividade de fosfolipase A2 (PLA2) e da ciclooxygenase-2 (COX-2), dando origem a maiores níveis de produção de prostaglandinas (PG), incluindo a prostaglandina E2 (PGE2), que causa inflamação na pele (FONSECA, 2010; SILVA, 2012; SIQUEIRA, 2014).

Irregularidades no DNA levam ao processo de desenvolvimento do câncer após ação da RUV. Tratando-se da UVB, anomalias no DNA podem ocorrer devido a ligações errôneas de duas pirimidinas na mesma fita de DNA, não ocorrendo o pareamento clássico AT ou GC. Em relação a UVA, o dano genético principal é dado pela geração de EROS, acarretando em lesões nas bases que compõem a estrutura de DNA e assim, levando também ao pareamento errôneo e consequentemente ao câncer (FONSECA, 2010).

4.3 EXTRATOS VEGETAIS COMO AGENTES FOTOQUIMIOPREVENTIVOS

Para que ocorra a atenuação dos efeitos carcinogênicos dados principalmente pela radiação solar, é proposto o uso de bloqueadores solares que comportem filtros ultravioleta. Todavia, o aumento do câncer de pele foi sucedido com o aumento do uso desses bloqueadores solares e, os efeitos adversos, foram concedidos por consequência da indução da reatividade química dos constituintes dos protetores pela RUV. Alguns filtros solares como 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila, são capazes de provocar a formação de EROS na epiderme quando sujeito à radiação e, uma vez que adentram as camadas da pele, além de amplificarem o nível de EROS naturalmente produzidos pelos cromóforos epiteliais, também levam a uma perda da capacidade de proteção da pele devido aos processos de degradação que esses bloqueadores sofrem sob ação da RUV (SILVA, 2012).

Substâncias antioxidantes oriundas de produtos naturais tem chamado a atenção como agentes fotoquimiopreventivos, ou seja, agentes capazes de atenuarem os efeitos adversos da RUV na pele além de serem utilizados como complemento na fotoproteção de filtros solares químicos (SILVA, 2012). Além disso, muitas dessas substâncias naturais também já atestaram efeitos anticarcinogênico, antimutagênico e baixa toxicidade (SIQUEIRA, 2014). Tais compostos antioxidantes

como: polifenóis do chá verde, resveratrol, genisteína, silimarina, quercetina, rutina, apigenina, ácidos cafeico e ferrúlico, entre outros, têm tido sua ação contra a radiação UVA e UVB investigadas para que se possa ir além dos antioxidantes clássicos como vitamina C, vitamina E e betacaroteno (SILVA, 2012, SIQUEIRA, 2014).

Neste contexto, os agentes botânicos devido suas diferentes propriedades biológicas estão entre os mais promissores grupos de compostos que podem ser explorados como agentes fotoquimiopreventivos ideais para as doenças de pele (KATIYAR, 2007).

Estudos mostram que o extrato de maçã e a rutina podem ser empregados como agentes fotoquimiopreventivos uma vez que, o consumo da fruta e seus derivados indicam a redução de cânceres, doenças cardiovasculares, distúrbios pulmonares e de diabetes tipo II prevenindo dessa forma diferentes tipos de câncer, considerando atividade antimutagênica, modulação do metabolismo de carcinógenos, atividade antioxidante e anti-inflamatória, modulação de vias de transdução de sinal anti-proliferativas e anti-apoptóticas (SIQUEIRA, 2014). A *Calendula officinalis* também apresenta propriedades anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, antígenotóxica, antitumoral e antimicrobiana, demonstrando eficácia na prevenção de dermatite aguda por radioterapia em paciente com câncer de mama (FONSECA, 2010). Encontrou-se no caule da espécie *Protium heptaphyllum* compostos como ácido p-cumárico, escopoletina, fraxetina e quercetina, que conferem uma atividade antioxidante dessa espécie (FORTE, 2012). Outra espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, é a *Ilex paraguariensis* que exibe atividade antioxidante diretamente relacionada aos derivados de cafeoil e assim, possui atividades quimiopreventivas que previnem o dano celular e evitam doenças crônicas, além de efeitos coleréticos e propulsão intestinal, efeitos vasodilatadores, inibição da glicação, entre outros (BARG, 2010).

Muitos extratos de origem natural, que contém grande quantidade de compostos fenólicos entre outros metabólitos secundários, vem sendo estudados e tem demonstrado uma pronunciada atividade antioxidante e anti-inflamatória, tais como o alecrim (PÉREZ et al., 2007), dentre outros. Sugere-se que estes extratos de origem natural, com propriedades antioxidante e anti-inflamatórias, podem ser eficazes na prevenção de danos solares à pele.

4.4 *ROSMARINUS OFFICINALIS* (ALECRIM)

Rosmarinus officinalis pertence à família Lamiaceae e é muito utilizada como flavorizante em comidas, conservantes de alimentos, para tratamento de diferentes tipos de doenças e tendo o seu óleo essencial muito utilizado nas indústrias. A espécie, variedade, período de colheita e tipo de processamento definem a composição dos óleos essenciais dessas plantas. Apresenta-se com nomes populares como: alecrim-da-horta, alecrim-de-jardim, alecrim-de-cheiro e alecrim-rosmarinho (MAY et al., 2010). Suas propriedades medicinais são muito conhecidas por apresentar diferentes atividades biológicas, tais como, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, propriedades antimutagênicas e quimiopreventivas (PÉREZ et al., 2007), além de possuir baixa toxicidade (OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2009; DERWICH; BENZIANE; CHABIR, 2011; DEL RÉ; JORGE, 2012; KONTOGIANNI et al., 2012).

A planta exala aroma forte e agradável, sendo um subarbusto bastante ramificado, de coloração verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, de sabor picante (MAY et al., 2010).

Os compostos que são os principais responsáveis pelas atividades biológicas da planta estão na fração volátil (α - e β -pinenos, esqualeno, limoneno, terpineol, linalol e outros) e os constituintes fenólicos. Estes últimos são representados principalmente por três grupos: diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico e rosmanol), os flavonoides (cirsimarina, diosmetina, diosmina, ginkwanina entre outros) e ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido caféico e ácido clorogênico) (CUVELIER et al., 1996; ZHANG et al., 2014).

SILVA et al., 2011 avaliaram o efeito do extrato aquoso de *R. officinalis* L. sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos e esse, apresentou altos teores de compostos fenólicos totais e expressiva atividade antioxidante *in vitro* com três métodos de avaliação. O percentual de hemoglobina glicada diminuiu quando usada uma concentração de 50 mg/kg de extrato aquoso de *R. officinalis* L., e aumentou a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase no fígado, e da superóxido dismutase no cérebro de ratos diabéticos. Pode-se considerar significativa capacidade antioxidante *in vitro*, atribuída à presença de compostos fenólicos em sua composição. E, quando administrado em ratos na concentração de

50 mg/kg, demonstrou-se eficiente na atenuação do estresse oxidativo presente no diabetes experimental.

Em outro estudo realizado por FILHO; 2010, o *R. officinalis* foi utilizado como fitoterápico e apresentou funções tais como: adstringente, analgésico, antiespasmódico, digestivo, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, tônico e vasodilatador, além de aplicação tópica como estimulante do couro cabeludo em cremes e loções. Com o uso de modelos animais experimentais, verificou-se atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias da espécie de *Rosmarinus officinalis* L, devido a presença do carnosol, uma das substâncias encontradas no *R. officinalis*.

Tantos atributos relacionados aos componentes presentes nesta planta justificam o desenvolvimento de uma gama de produtos referentes a indústria alimentícia, como também, para fitocosméticos, nutracêuticos e fitoterápicos (COUTO et al., 2012). Entretanto, é necessário estudos de comportamento de espécies medicinais no geral, uma vez que as técnicas de cultivo e produção de biomassa, possam influenciar no seu valor terapêutico (MAY et al., 2010).



Fig. 3. *Rosmarinus officinalis* (alecrim).

Fonte: Imagem retirada da internet.

4.5 FORMULAÇÕES COSMÉTICAS E SUA ESTABILIDADE

As emulsões fluídas e semi sólidas (creme e gel creme) e dispersões livres de óleos estruturados por misturas de tensoativos, são grandemente usadas em produtos farmacêuticos e cosméticos como veículos para liberação de fármacos e agentes cosméticos à pele. No passado, estes veículos eram considerados como um simples carregador de fármaco ou agente cosmético à pele. Entretanto, está bem estabelecido que as propriedades coloidais destes veículos podem influenciar na biodisponibilidade do fármaco ou agente cosmético por diferentes modos (BARRY, 1983).

Desta forma, o fármaco ou agente cosmético podem interagir com o veículo (interações fármaco-veículo) influenciando a solubilidade destas substâncias, sua difusão através do veículo e sua partição do veículo para a pele. Por outro lado, a aparência e a maciez da pele bem como sua permeabilidade a fármacos, aplicados topicamente, está diretamente relacionada ao grau de hidratação do estrato córneo. Assim, o veículo sozinho pode influenciar a permeabilidade de fármacos por sua habilidade em reduzir a evaporação de água por formarem uma camada de oclusão quando aplicado como um filme fino. Além disso, os componentes do veículo podem interagir com a camada lipídica do estrato córneo (interação veículo-pele) tornando-o mais permeável aos fármacos. As interações individuais fármaco-veículo e veículo-pele, como também a combinação de ambas, influenciam a velocidade em que o fármaco permanece sobre a superfície da pele ou penetra através do estrato córneo (ECCLESTICON, 1997).

Portanto, sob o ponto de vista farmacêutico, as emulsões oferecem vantagens devido ao seu extenso uso em formulações de aplicação tópica, uma vez que além de auxiliar na penetração do fármaco, concedem efeito refrescante de fácil aplicação e espalhamento na pele, sendo amplamente aceito pelo consumidor. Entretanto, não toleram excessos de temperatura e armazenamento, ou seja, podem modificar sua consistência, e, conseqüentemente, sua viscosidade com o tempo, uma vez que são sistemas termodinamicamente instáveis. Essa característica é dada pela natureza dinâmica de dois líquidos imiscíveis e esta dispersão pode formar gotículas de diâmetros entre 0,5-100 nm (OLIVEIRA, 2009; FONSECA, 2010).

Para o preparo de emulsões estáveis, as bases auto-emulsionantes não iônicas são muito utilizadas, dada as características de: curto tempo de pré-formulação para definir as porcentagens relativas dos componentes; simplificar a formulação; proporcionar estabilidade por longo período. Além disso, as emulsões não devem ser irritantes, não devem degradar e serem compatíveis com o ativo e aditivos (TOPAN, 2012).

Para que seja possível julgar o comportamento do produto cosmético desde o momento de elaboração até o limite do prazo de validade, estudos de estabilidade devem ser concebidos. A falta de estabilidade de formulações pode ser dada por diversos motivos tais como, o processo de produção, transporte, armazenamento e componentes. Pode-se evitar a instabilidade de emulsões ao aplicar um agente emulsificante, que reduz a tensão interfacial através da formação de membranas protetoras ao redor das gotículas ou geram forças repulsivas entre as gotículas (FONSECA, 2010; RUIVO, 2012).

As emulsões recém-preparadas não devem ser submetidas a testes de estabilidade, seja pela exposição imediata a condições de tensão ou a procedimentos de teste. As emulsões devem ser estabilizadas durante 24 a 48 horas. Isto é facilmente explicável quando se considera a instabilidade intrínseca das emulsões: durante o preparo da emulsão, o produto pode não ter tido oportunidade de equilibrar-se plenamente. A temperatura e a agitação (e às vezes a adição de substâncias em temperaturas baixas) são responsáveis pelo estado não equilibrado das emulsões imediatamente após o seu preparo. Durante algum tempo podem ocorrer mudanças na área interfacial, na distribuição dos emulsificantes e no endurecimento dos constituintes sólidos. Assim, faz-se necessário um período inicial de espera (RIEGER, 1996).

A estabilidade das formulações geralmente são fundamentadas em características físico-químicas e, procedimentos são realizados para que se tenha uma previsão de possíveis alterações nessas formulações quando disponíveis no mercado (FONSECA, 2010).

De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), alguns aspectos devem ser considerados na estabilidade, como os físicos (conservar o aspecto, cor, odor, uniformidade, dentre outras); químicos (manter a integridade da estrutura química, o teor de ingredientes e outros parâmetros desde que dentro dos limites especificados); e microbiológicos

(conservar as características microbiológicas, cumprir as Boas Práticas de Fabricação e os sistemas conservantes utilizados na formulação). Além disso, outros aspectos como funcionalidade (manter os atributos do produto sem alterações quanto ao efeito inicial proposto) e segurança (alterações que influenciam na segurança do produto não devem ocorrer) também devem ser considerados.

Tem-se o teste de estabilidade preliminar e o teste de estabilidade acelerada como ensaios propostos. O primeiro consiste de condições extremas em que as amostras são submetidas em um curto intervalo de tempo e são realizados ensaios de temperatura, estabilidade organoléptica, físico-química, microbiológica, cor, odor, pH, viscosidade, densidade, condutividade elétrica, espalhabilidade, comportamento reológico, entre outros; o segundo, com duração de 90 dias a 6 meses, através de ensaios de conservação prolongados (shelf-tests), centrifugação, stress térmico, ciclos de congelamento/descongelamento, exposição à radiação luminosa e condições extremas de armazenamento, indicam uma previsão do tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (RUIVO, 2012).

Alguns testes podem prover informações rápidas sobre a estabilidade das emulsões que são sistemas instáveis e altamente susceptíveis à desestabilização durante as etapas de armazenamento e transporte. Um dos testes é o de centrifugação onde proporciona uma aceleração dos mecanismos físico-químicos naturais e simulam a força gravitacional, provendo informações rápidas de estabilidade. Da mesma forma, a análise dos atributos organolépticos é outro teste utilizado para verificar a estabilidade do mesmo. Por meio de análises comparativas com uma amostra padrão ou que se manteve em condições adequadas de armazenamento, permite a visualização de separação de fases, precipitação e turvação. Também é possível investigar a estabilidade através de alterações do pH e tamanho de gotículas, dado que a perda da atividade funcional implica na perda de proveito do produto desenvolvido e, sendo a avaliação da estabilidade, uma etapa importante durante todo o desenvolvimento do próprio até alcance o consumidor final (FONSECA, 2010).

REFERÊNCIAS

- AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemiprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v.571, p.153-173, 2005.
- ANVISA. **Cosméticos**. 2004. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+de+Estabilidade+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/49cdf34c-b697-4af3-8647-dcb600f753e2>. Acesso em: 22 novembro 2016.
- BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São paulo, v.86, n.4, p.732-743, 2011.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p. 629-643, 2010.
- BARG, Marlon. **Avaliação do efeito protetor do extrato de *Ilex paraguariensis* sobre a prevenção do dano oxidativo causado por radiação ultravioleta**. 2010. 59 fls. Mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Santa Catarina, 2010.
- BATHIA, N. et al. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.508, p.178-184, 2011.
- BERNARDES, W.A. et al. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, Ribeirão Preto, v.7, p.1835-1839, 2010.
- BINIEK, K; LEVI. K; DAUSKARDT, R.H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Califórnia, v.109, n.42, p.17111-17116, 2012.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, London, v.181, n.4617, p.1199-1200, 1958.

BOLANM, B.J.; ULVIK, R.J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. **Biochemical Journal**, Colchester, v.243, p.55-59, 1987.

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v.78, p.206-209, 1982.

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

CAMPANINI, M.Z. et al. Topical Formulations Containing *Pimenta pseudocaryophyllus* Extract: *In Vitro* Antioxidant Activity and *In Vivo* Efficacy Against UV-B-Induced Oxidative Stress. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Londrina, v.15, n.1, p.86-95, 2014.

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

CASTILHO, I.G; LEITE, R.M.S; SOUSA, M.A.A. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasília, v.85, n.2, p.173-178, 2010.

COOPER, S; RANGER-MOORE,J; BOWDEN, TG. Differential inhibition of UVB-induced AP-1 and NF-kappaB transactivation by components of the jun bZIP domain. **Molecular Carcinogenesis**, Arizona, v.43, p.108-116, jan. 2005.

CORRÊA, N.M., JÚNIOR, F.B.C., IGNÁCIO, R.F., LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, 2005.

COUTO, R.O. et al. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.131, p.99-105, 2012.

CUVELIER, M.E.; BERSET, R.H. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, p.645-652, 1996.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São José do Rio Preto, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z., CHABIR, R. Aromatic and medicinal plants of Morocco: chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus phoenicea*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, Morocco, v.2, n.1, p.145-153, 2011.

FUJISHIMA, A.; RAO, T. N.; TRYK, D. A. Titanium dioxide photocatalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Review**, v.1, p.1-21, 2000.

DIAS, Renata Helena Ferreira Caraméz Pierroni. **Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio**. 2011. 77 fls. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FILHO, J.H.M. ***Rosmarinus officinalis* L.: Uma revisão sobre suas possíveis ações analgésicas e anti-inflamatórias**. 2010. 39 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia Generalista) – Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2010.

FONSECA, Y.M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de calêndula**. 2010. 46 fls. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FONSECA, Y.M. et al. Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations Against UV-induced Oxidative Stress, **J. Pharm. Sci.**, v.100, p.2182–2193, 2011.

GEORGETTI, S.R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.64, p.99-106, 2006.

FORTE, Ana Luiza Scarano Aguilera. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica.** 2012. 87 fls. Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F.T.M.C.; JÚNIOR, W.A.V.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.64, p.99-106, 2006.

GONZALEZ, H. **Studies of Sunscreens: Percutaneous Absorption of Benzophenone-3 and Photostability.** 2006. 55 fls. Tese. The Sahlgrenska Academy at Göteborg University. Sweden, 2006.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v.26, p.614-626, 2008.

GURR, J.R. et al. Ultrafine titanium particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v.213, p.66-73, 2005.

HANSON, K.M.; GRATTON, E; BARDEEN, C.J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Science Direct**, Califórnia, v.41, p.1205-1212, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2018. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 17 fevereiro 2018.

JING, L. et al. The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles. **Applied Surface Science**, v.180, p.308-314, 2001.

JOHNSON, J.J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Letters**, Chicago, v.305, p.1-7, 2011.

KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v.140, p.47-52, 2005.

KATIYAR, S.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.287-296, 2007.

KONTOGIANNI, V. G. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, Greece, v.136, p.120-129, jul. 2012.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Academy of Dermatology**, v.52, p.937-58, 2005.

LINGNERT, H.; VALENTIN, K.; ERICKSON, C.E. Measurement of antioxidative effect in model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, New York, v.3, p.87-104, 1979.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

MACHADO, J.K.F.B.; MARÇAL, A.L.; LIMA, O.J.L.; CIUFFI, K.J.; NASSAR, E.J.; CALEFI, P.S. Materiais Híbridos Orgânico-Inorgânicos (Ormosil) Obtidos por Sol-Gel com Potencial uso como Filtro Solar. **Química Nova**, v.34, n.6, p.945-949, 2011.

MAIA CAMPOS, P.M.G.; BADRA, M.V.L. Estudo da Estabilidade Física de Bases Dermocosméticas Contendo Ésteres Fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v.79, p.8-11, 1992.

MARQUELE, F.D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.39, p.455-462, 2005.

MATOS, D.O et al. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.857-864, 2015.

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

MAY, A; SUGUINO, E; MARTINS, A.N.; BARATA, L.E.S.; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MELONI, M.; NICOLAY, J.F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v.17, p.609-613, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Proteção da Camada de Ozônio**. 2016. Disponível em <http://www.mma.gov.br/clima/protecao-da-camada-de-ozonio>. Acesso em: 20 novembro 2016.

MORON, M. S.; DEPIERRE, J. W.; MANNERVIK, B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activities in rat lung and liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 582, p.67-78, 1979.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Santiago de Compostela, v.72, p.145-171, 2001.

MUNHOZ, V.M. et al. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Maringá, v.33, n.2, p.225-232 2012.

NASSER, N. UVB: suscetibilidade no melanoma maligno. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Blumenau, v.85, n.6, p.843-848, 2010.

NEVES, A.T.S. **Estudo da ação danificadora do 2,2'-Bipyridyl no DNA na presença de radiação UV**. 2014. 72 fls. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2014.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food chemistry**, África do Sul, v.120, p.308-312, set. 2009.

OLIVEIRA, Ângela Zélia Moreira. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. 2009. 100 fls. Mestrado (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade do Porto, Porto, 2009.

OUARIACHI, E.El. et al. Adsorption properties of *Rosmarinus officinalis* oil as green corrosion inhibitors on C38 steel in 0.5 M H₂SO₄. **Acta Metallurgica Sinica (English Letters)**, Morocco, v.23, n.1, p.13-20, 2010.

PÉREZ, M.B.; CALDERÓN, N.L; CROCI, C.A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Chemistry**, v.104, p.585-592, 2007.

PODDA, M. et al. UV – irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damages in model of human skin. **Free Radical and Biology & Medicine**, v.24, n.1, p.55-65, 1998.

PORTAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Câncer de Pele**. 2016. Disponível em <http://www.sbd.org.br/doencas/cancer-da-pele/>. Acesso em: 20 novembro 2016.

RAMPAUL, A.; PARKIN, I. P.; CRAMER, L. P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.191, n.2-3, p.138-148, 2007.

RIBEIRO, Helena. Desafios da saúde ambiental global. **Saúde Global**, 2013.

RUIVO, Joana Sofia Pais. **Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em Cosmética e Dermatologia**. 2012. 96 fls. Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v.90, p.133-139, 2005.

SAMPAIO, R.C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, Rio Claro, v.16, n.2, p.506-515, 2010.

SGARBI, F.C.; CARMO, E.D; ROSA, L.E.B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Revista Ciências Médicas**, Campinas, v.16, n.4-6, p.245-250, 2007.

SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T.; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, v.24, n.1, p.121-130, 2011.

SILVA, Daniele Fernandes. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/retenção cutânea de formulações tópicas**. 2012. 142 fls. Dissertação (Mestrado em

Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SIMIS, T.; SIMIS, D.R.C. Doenças da pele Relacionadas à Radiação Solar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, São Paulo, v.8, n.1, p.1-8, 2006.

SIQUEIRA, Sílvia. **Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em modelos de pele *in vitro* e *in vivo***. 2014. 61 fls. Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced *in vitro* lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, p.1080-1086, 2007.

TOPAN, José Fernando. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annuus* L) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética**. 2012. 115 fls. Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WORLD WIDE FOUND FOR NATURE. **O que é a camada de ozônio?** 2016. Disponível em http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/camada_ozonio/. Acesso em: 20 novembro 2016.

ZHANG, Y. et al. New terpenoid glycosides obtained from *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts. **Fitoterapia**, v.99, p.78-85, 2014.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico e serão submetidos para a revista AAPS PharmSciTech.

5.1 EFEITO FOTOQUIMIOPREVENTIVO DE EXTRATO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS

Produtos Naturais com Potencial Biotecnológico

Kátia S. Takayama¹, Erika B. Vieira², Mariana C. Monteiro², Claudia Y. Akagi², Priscila Saito², Clovis M. Kumagai², Ingrid C. Pinto², Nilton S. Arakawa², Renê O. Couto² e Sandra R. Georgetti^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

*Autor correspondente. Endereço: Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP: 86039-440. Tel. (+55) (43) 33712475. E-mail: sangeorgetti@gmail.com.

ABREVIATÓES

36

37

38

39 ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

40 ABTS 2,2- azinobis -3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

41 DNA Ácido desoxirribonucléico

42 DPPH• Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil

43 EA Extrato de Acetona 80%

44 EE Extrato de Etanol 80%

45 F1 Formulação 1

46 F2 Formulação 2

47 F3 Formulação 3

48 FeCl₃.6H₂O Cloreto de Ferro Hexahidratado

49 FRAP Poder Antioxidante redutor de Ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power)

51 K₂S₂O₈ Persulfato de Potássio

52 RUV Radiação ultravioleta

53 TPTZ 2,4,6-tripiridil -s- triazina

54 TROLOX 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido Carboxílico

55 UV Ultravioleta

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70 RESUMO

71

72

73 A exposição da pele à radiação UV (RUV) é a principal causa da formação de
74 espécies reativas de oxigênio (EROS), que são moléculas instáveis e reativas,
75 geradas durante o estresse oxidativo. Compostos com atividades antioxidante, anti-
76 inflamatória e quimiopreventiva podem ser encontradas no extrato de *Rosmarinus*
77 *officinalis*. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do sistema solvente na obtenção
78 de extratos de *R. officinalis* e os com melhor potencial antioxidante, foram avaliados
79 por métodos antioxidantes *in vitro* e eficácia fotoquimiopreventiva *in vivo* contra a
80 RUV. A atividade antioxidante *in vitro* de extrato de acetona 80% (EA) e de extrato
81 de etanol 80% (EE) foram dose-dependentes com valores de IC₅₀ encontrados para
82 o EE menores que EA, demonstrando maior capacidade antioxidante. Os valores
83 encontrados pelo método FRAP foi próximo entre eles. A atividade sequestradora de
84 radical livre de EA e EE foi mantida somente quando incorporados na F2,
85 demonstrando que os constituintes da formulação tópica pode alterar a capacidade
86 antioxidante do extrato. Embora os extratos não tenham demonstrado eficácia na
87 diminuição do edema e da secreção da atividade da MMP-9, *in vivo* os níveis do
88 antioxidante endógeno GSH, enzima MPO, da capacidade de sequestrar o radical
89 ABTS e o poder redutor de ferro (FRAP) da pele em comparação com os
90 camundongos tratados com formulação base sem extrato, mostraram melhora
91 significativa. Sugere-se que a formulação contendo EA ou EE podem ser uma fonte
92 tópica de compostos antioxidantes para diminuir os danos oxidativos da pele.

93 **Palavras chave:** *Rosmarinus officinalis*; polifenóis; antioxidante; estresse oxidativo;
94 fotoproteção.

95

96

97

98

99

100

101

5.2 INTRODUÇÃO

O aumento da probabilidade de adquirir câncer de pele é dado pela associação de fatores como pele clara, condições genéticas e exposição ao sol, em que podem levar a alterações moleculares que diminuem a imunidade e alteram a replicação do DNA. Essas alterações também podem ocorrer nas fibras de elastina e colágeno, além de afetar a pigmentação da pele uma vez que, a radiação consegue penetrar e sensibilizar bastante a derme levando ao envelhecimento precoce (1).

Estas alterações são causadas principalmente pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) (2-3). O acúmulo de EROS, chamado de estresse oxidativo, ocorre quando estes superam os mecanismos antioxidantes capazes de neutralizá-los, levando a danos celulares. A fim de conter os efeitos danosos das EROS, a pele possui antioxidantes naturais enzimáticos, como as superóxido dismutases, catalase e glutathione peroxidase, e não enzimáticos, como as vitaminas E, C e a coenzima Q10. Embora existam diversos mecanismos de defesa cutâneos, estes não são completamente efetivos quando a geração de EROS está exacerbada, e também tendem a diminuir com o aumento da idade, causando o envelhecimento (4).

Embora muitas formulações cosméticas contenham filtros UV, estes não proporcionam uma proteção total da pele, principalmente em relação a efeitos como fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (5). Desta maneira, os agentes botânicos que possuem propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e antioxidantes, estão entre os mais promissores grupos de compostos que podem ser explorados como agentes fotoquimiopreventivos ideais para as doenças de pele (6-7).

Tais males causados pela radiação UV, podem ser evitados com o uso de protetores solares que podem ser divididos em filtros orgânicos (químicos) e inorgânicos (físicos) (1-8). Entretanto, os filtros orgânicos apresentam uma instabilidade maior quando comparados aos filtros inorgânicos, uma vez que os filtros orgânicos atuam com a absorção da radiação UV. Em decorrência dessa instabilidade, pode haver diminuição da capacidade de absorção das moléculas desses filtros e conseqüentemente, levar a um aumento do potencial deletério dos raios solares sobre o organismo. Além disso, a toxicidade estrogênica dos filtros químicos foi observada pela absorção desses filtros através da pele, sendo também

137 detectada sua presença na urina. Outros inconvenientes estão associados aos
138 componentes químicos e veículos oleosos desses produtos, em que são capazes de
139 desencadear desarranjos alérgicos como bolhas, vermelhidão, coceira, dor e edema
140 na pele (9).

141 A fim de minimizar os efeitos tóxicos citados e otimizar a eficácia de
142 protetores solares, substâncias de origem natural que possuem capacidade
143 absorvedora de radiação UV vêm sendo amplamente estudadas. Substâncias
144 aromáticas, como fenóis e flavonoides, são considerados fatores importantes de
145 proteção para os vegetais contra a radiação UV através da estabilização dos efeitos
146 deletérios de radicais livres e dissipação da energia UV absorvida (10-11).

147 Pesquisas estão sendo conduzidas, para gerar produtos
148 biotecnológicos adicionados de substâncias aromáticas, como compostos fenólicos e
149 flavonoides como coadjuvantes aos filtros químicos e físicos. Pode-se citar como
150 exemplos, extratos de amor-perfeito, babosa, camomila, café-verde, algodão,
151 amendoim, côco e gergelim (12-13-14).

152 Os extratos de *R. officinalis* têm recebido considerável atenção
153 devido as suas propriedades antioxidantes e, os seus compostos estão relacionados
154 com a habilidade de reduzir danos oxidativos causados por radicais livres sobre
155 elementos celulares como DNA, proteínas e membranas fosfolipídicas. Dessa forma,
156 essas moléculas antioxidantes podem agir como sequestradores de radicais livres,
157 além de desempenharem um papel na regulação de certos sistemas enzimáticos
158 envolvidos em processos fisiológicos como apoptose, destruição de células tumorais
159 ou regulação das enzimas que metabolizam xenobióticos no fígado (superóxido
160 dismutase, catalase e glutathione transferase) (15).

161 Complementarmente, os extratos de *R. officinalis* apresentam três
162 grupos de compostos fenólicos, diterpenos fenólicos, flavonóides e ácidos fenólicos.
163 Os principais compostos antioxidantes presentes nestes extratos são: ácido
164 carnósico, carnosol, diterpenos e ácido rosmarínico, um éster do ácido
165 hidroxicinâmico e que juntos com outros isoprenóides (esteróis, isopreno, mono e
166 diterpenos, tocoferóis e carotenóides), manifestam papel fotoprotetor e são
167 considerados constituintes bioativos (16).

168 Devido evidências que relatam os efeitos antioxidantes e anti-
169 inflamatórios do *R. officinalis* e a ausência de estudos dessa planta contra danos
170 fotooxidativos gerados pela RUV, o presente estudo teve como objetivo a obtenção

171 de extrato de *R. officinalis* e avaliação da sua propriedade protetora em formulação
172 tópica sobre danos oxidativos em camundongos submetidos a radiação UVB.

173

174

175 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

176

177

178 5.3.1 Obtenção do Material Vegetal e dos Diferentes Extratos de *R. officinalis*

179

180

181 Amostras de folhas de *Rosmarinus officinalis* foram obtidas em
182 estabelecimento comercial local – Londrina – PR. Posteriormente, as folhas foram
183 secas e trituradas em moinho de facas. Em seguida, a matéria-prima vegetal foi
184 submetida ao processo de maceração dinâmica 1:10 (m/v) utilizando diferentes
185 sistemas solventes: acetona ou etanol ou metanol a 20, 50 e 80% em água (v/v). Foi
186 realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos foram submetidos a
187 rotaevaporação seguido de liofilização para obtenção final dos extratos secos.

188

189

190 5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAL LIVRE DOS

191 DIFERENTES EXTRATOS

192

193

194 O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método
195 colorimétrico Folin-Ciocalteu e o ácido gálico foi utilizado como padrão (17). Foi
196 realizada uma varredura dos extratos para verificar a absorção nas regiões
197 ultravioleta A (320-400 nm) e B (290-320 nm), e o fator de proteção solar *in vitro*
198 (FPS) foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur
199 (1986) (18).

200

201 A atividade antioxidante dos extratos foi realizado pelo ensaio de
202 DPPH (19). Foram utilizadas soluções com concentrações conhecidas de Trolox (0,2
202 – 0,5 mM) para a curva de calibração. A atividade sequestradora de radical livre foi
203 expressa como mmol/L de Trolox/ μ g/mL de amostra.

204

205

206

207 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS POR DIFERENTES
208 METODOLOGIAS *IN VITRO*

209
210

211 5.5.1 Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio pelo método de
212 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

213
214
215

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi determinada através da redução do radical livre DPPH. Essa redução ocorre quando um H[•] do antioxidante em estudo é retirado, levando a uma diminuição da absorvância e mudança colorimétrica medida a 517 nm (20-21). Os extratos selecionados previamente, acetona 80% (EA) e etanol 80% (EE) foram diluídos em etanol 80% para alcançarem as concentrações de 3,90 - 5000 µg/mL e de 7,81 - 2000 µg/mL no meio reacional, respectivamente. Foram misturados 50 µL das amostras diluídas em etanol com 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH• 250 µM. O branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol. Preparou-se um controle positivo ausente de amostra, o qual é considerado 100% de radicais livres na solução para calcular a habilidade doadora de hidrogênio (%) dos extratos seguindo a Equação 1. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente (TA), a absorvância foi medida a 517 nm.

229

230 Equação 1: % atividade = [1 - (absorvância amostra / absorvância do controle)] x 100

231
232

233 5.5.2 Determinação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS^{•+} (2,2' azinobis-(3-
234 etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico))

235
236
237

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+}, inicialmente foi formado o radical ABTS^{•+} a partir da reação de 7mM do sal 2,2' azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico (ABTS) com 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (20-22), mantidos na ausência de luz por 16h em geladeira. A solução foi diluída em etanol até apresentar uma absorvância de 0,700 a 0,800 em 730 nm. Amostras foram preparadas por meio de diluições em etanol até

243 alcançarem concentrações que variaram de 0,049 – 50 µg/mL para EA e de 0,049 –
 244 37,5 µg/mL para EE no meio reacional. Para a análise, foram adicionados 50 µL de
 245 cada amostra em 4 mL de solução de ABTS^{•+} diluída. Após 6 minutos de incubação
 246 à TA, a mudança na absorvância foi medida em espectrofotômetro. O branco foi
 247 composto apenas de etanol absoluto e um controle positivo foi feito com 50 µL de
 248 etanol e 4 mL de solução ABTS^{•+}. A atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} foi
 249 calculada pela Equação 1.

250

251

252 5.5.3 Ensaio de Quimioluminescência pelo Sistema H₂O₂/luminol/HRP

253

254

255

Alterações da intensidade de quimioluminescência gerada pelo
 256 sistema H₂O₂/luminol/HRP foi medido da seguinte forma: alíquotas de 10 µL de
 257 amostra de concentrações que variaram de 0,078 – 1000 µg/mL para EA e de
 258 0,00625 – 0,20 µg/mL para EE no meio reacional, foram adicionados a 380 µL de
 259 tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), 10 µL de solução de luminol 2 mg/mL em
 260 dimetilsufóxido (DMSO) até alcançar uma concentração final de 1,13x10⁻⁴ M e, na
 261 sequência, 100 µL de H₂O₂ foi incluído até uma concentração final de 5x10⁻⁵ M. A
 262 reação teve seu início com a adição de 500 µL de peroxidase na concentração final
 263 de 0,2 UI/mL. Um controle foi feito com a adição de 10 µL de etanol 80% ao invés da
 264 amostra de extrato. Após a leitura, a porcentagem de atividade sequestradora de
 265 radicais livres do extrato foi determinada de acordo com a Equação 2.

266

267

$$\% \text{ inibição} = \left(100 - \left(\frac{\text{luminescência amostra}}{\text{luminescência controle}} \right) \right) \cdot 100 \quad (2)$$

268

269

270 5.5.4 Ensaio de Quimioluminescência pelo Sistema Xantina/luminol/XOD

271

272

273

Este método de quimioluminescência avalia a atividade
 274 sequestradora do radical superóxido que é produzido pela reação xantina/xantina-
 275 oxidase, (23). Para a análise, alíquotas de 10 µL de amostra de concentrações que
 276 variaram de 0,061 – 500 µg/mL para EA e de 0,03 – 160 µg/mL para EE no meio
 277 reacional, foram adicionados a 400 µL de tampão glicina (0,1 M + EDTA 1mM com

278 NaOH 0,1M, pH 9,4), 10 µL de solução de luminol 6 mM, 100 µL de xantina oxidase
279 (20 UI/mg) e 150 µL de xantina (6mM). Um controle foi feito com a adição de 10 µL
280 de etanol 80% ao invés da amostra de extrato. A porcentagem de atividade
281 sequestradora de radical ânion superóxido do extrato foi determinada de acordo com
282 a Equação 2.

283

284

285 5.5.5 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP)

286

287

288 Alíquotas de 10 µL do padrão Trolox nas concentrações de 0,4; 1,0;
289 1,25; 1,5 e 2 mMol ou 10 µL das amostras foram adicionados no meio reacional
290 contendo 900 µL do reagente FRAP preparado com 2,5 mL de TPTZ 10 mM em HCl
291 40 mM, 2,5 mL de solução de FeCl₃.6H₂O e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM pH
292 3,6. Após incubação à 37°C por 30 minutos a absorvância foi determinada em 593
293 nm. O branco foi constituído de 10 µL de etanol, 900 µL do reagente FRAP e 90 µL
294 de H₂O. Os resultados foram expresso como capacidade antioxidante equivalente ao
295 Trolox (TEAC) em µMol/L Trolox/µg/mL de amostra.

296

297

298 5.6 PREPARO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO EXTRATO DE *ROSMARINUS*299 *OFFICINALIS* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DO FPS

300

301

302 Foram preparadas três diferentes formulações tópicas adicionadas
303 ou não de EA ou EE (Tabela 2). A formulação F1 e F2 foram preparadas com alto e
304 baixo conteúdo da cera auto-emulsionante não iônicas Polawax[®] (álcool
305 cetoestearílico + polioxietileno derivado de ácido graxo de sorbitano 200E),
306 respectivamente. Para estabilização da F2 foi utilizado o colóide hidrofílico não
307 iônico Natrosol[®] (hidroxietilcelulose) e foi adicionado Transcutol[®] como promotor de
308 absorção. A formulação F3 foi constituída de álcoois cetoestearílico e cetoestearílico
309 etoxilado 200E como agentes de consistência e emulsionante, respectivamente.
310 Com ação emoliente, foi empregado o miristato de isopropila. Foi utilizado o
311 metoxicinamato de octila como filtro solar anti-UVB e benzofenona-3 que é um filtro
312 solar anti-UVA. Uma mistura de parabenos como sistema conservante, triglicerídeos
313 (TG) de ácidos cáprico e caprílico como emoliente, propilenoglicol como agente

314 umectante e água deionizada como veículo, foram adicionados em todas as
315 formulações. Após 24h, extrato de *R. officinalis* obtido com acetona 80% ou com
316 etanol 80% foram incorporados ou não às formulações na concentração de 5%
317 (Tabela 1).

318 Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *R. officinalis*
319 após incorporação nas diferentes formulações tópicas (F1, F2 e F3) foram realizados
320 os métodos de DPPH e ABTS como descritos na seção “Avaliação da atividade
321 antioxidante dos extratos por diferentes metodologias *in vitro*”. As formulações
322 contendo os extratos foram diluídas em etanol 80% para obter a mesma
323 concentração utilizada do extrato puro no meio reacional para comparação da
324 atividade antioxidante. As formulações sem adição de extratos também foram
325 diluídas na mesma proporção para verificação de possíveis interferências com os
326 ensaios. O FPS das formulações foi determinado, pelo método espectrofotométrico
327 desenvolvido por Mansur (1986).

328
329

330 5.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DOS EXTRATOS DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* 331 INCORPORADO EM FORMULAÇÃO TÓPICA NA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E 332 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO UVB

333
334

335 5.7.1 Animais experimentais

336
337

338 Como modelo animal foi utilizado camundongos sem pêlo da
339 linhagem HRS/J, de ambos os sexos, adultos e com peso de 20 a 30 g. Os animais
340 foram mantidos no biotério do Hospital Universitário de Londrina – PR, em sala com
341 temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas e com suprimento de água e
342 ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da
343 Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina
344 (OF.CIRC.CEUA nº 44/2017, processo nº 2974.2017.14).

345
346
347
348
349
350

351 5.7.2 Tratamento dos animais

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

362 5.7.3 Irradiação

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

377 5.7.4 Avaliação do edema cutâneo

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

Os animais foram aleatoriamente separados em diferentes grupos (n=5) e tratados topicamente na região dorsal com 0,5g da formulação F2 base e grupos tratados com F2 adicionada de 5% de EA ou de EE. As formulações foram administradas 12h, 6h, imediatamente antes e 6h após o início da irradiação. Um grupo controle não irradiado e um irradiado não tratado foram incluídos nos experimentos. Os resultados são representativos de dois experimentos separados.

A fonte de luz utilizada nos experimentos para indução das lesões fotoxidativas foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS. A lâmpada emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando um radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (24-25-26). A medida da radiância foi realizada em toda a extensão do compartimento, à distância de 20 cm e com a presença da tela plástica utilizada para conter os animais. A radiância da lâmpada utilizada foi de 0,209 mW/cm². Para indução da inflamação e estresse oxidativo foi utilizada a dose de radiação de 4,14 J/cm² (26-27-28).

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos foram coletadas com auxílio de um molde com área fixa para avaliação do edema o qual foi expresso pelo aumento do peso de pele, comparando o grupo não irradiado com os grupos irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica (26-29-30). O resultado foi expresso em mg de pele.

388 5.7.5 Avaliação da eficácia anti-inflamatória pelo ensaio de medida da atividade da
389 mieloperoxidase (MPO)

390

391

392

393 As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não irradiados,
394 irradiados não tratados (receberam o veículo) ou tratados com formulação tópica
395 foram coletadas em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de
396 hexadeciltrimetil amônio, homogeneizadas com auxílio do turrax e centrifugadas. 7
397 μ L do sobrenadante de cada amostra foi misturado com 200 μ L de tampão fosfato
398 50 mM (pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de
399 hidrogênio e a atividade da MPO foi determinada em 450 nm. A atividade da MPO
400 das amostras foi comparada com a atividade da MPO de uma curva padrão de
401 neutrófilos. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/mg de pele
(25-26-31).

402

403

404 5.7.6 Avaliação da eficácia na redução da atividade/secreção de proteinases por
405 zimografia em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio)

406

407

408

409 As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não
410 irradiados, irradiados não tratados ou tratados com formulação tópica foram
411 homogeneizadas em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo inibidores de
412 proteinases com auxílio de turrax. Os homogenatos foram centrifugados e os
413 sobrenadantes das amostras foram submetidos ao ensaio de zimografia. O gel de
414 eletroforese apresentava uma espessura de 1 mm, composto por um gel de
415 separação e um gel de concentração, preparado de acordo com a Tabela 3. Após a
416 eletroforese, o gel foi lavado com solução de triton X-100 2,5% por 1 hora, sob
417 constante agitação e incubado por 16 horas em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4),
418 contendo CaCl_2 10 mM e azida sódica 0,02% a 37°C. O gel foi corado com uma
419 solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol
420 em água deionizada. O gel foi descorado com ácido acético 20% para visualização
421 das bandas. Zonas de atividade enzimática foram detectadas como regiões de
422 coloração negativa contra um fundo escuro. A atividade proteolítica foi analisada
423 qualitativamente comparando os resultados das amostras dos animais tratados com
a formulação tópica adicionada do mesmo com os controles não tratados e o

424 programa utilizado para a comparação das bandas foi o ImageJ[®] (25-26-32-33). A
425 dosagem de proteína das amostras foi realizada utilizando-se o método de Lowry
426 (34).

427

428 5.7.7 Avaliação da eficácia na manutenção dos níveis do antioxidante endógeno

429 GSH

430

431

432

433 As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos: não
434 irradiados, irradiados não tratados (receberam o veículo) ou tratados com
435 formulação tópica foram coletadas em EDTA 0,02 M e homogeneizadas com auxílio
436 do turrax. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na
437 proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a
438 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 4000 rpm por
439 15 minutos a 4°C e o sobrenadante final foi retirado para análise. O ensaio para
440 quantificação dos níveis de GSH na pele foi realizado em microplaca por meio da
441 adição de 50 µL de amostra ao meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4
442 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB)
443 em metanol (1,9 mg/mL de metanol). A absorvância foi determinada após 5 minutos
444 de incubação a 405 nm. A curva analítica foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os
445 resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (26-35-36).

445

446

447 5.7.8 Ensaio de ABTS

448

449

450

451 As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos, foram
452 coletadas e homogeneizadas em 500 µL de KCl (1,15%) com auxílio do turrax e
453 centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a reação foi adicionado 40 µL
454 do sobrenadante a 1 mL de solução de ABTS diluída. Soluções padrão com
455 diferentes concentrações de trolox (1 a 25 µM) foram utilizadas para calibração. Os
456 resultados foram expressos como nmol Trolox/mg de pele (37-38).

456

457

458

459

460 5.7.9 Ensaio de FRAP

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos, foram coletadas e homogeneizadas em 500 μ L de KCl (1,15%) com auxílio do turrax e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a reação foram utilizados 30 μ L do sobrenadante e 1 mL de reagente FRAP. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (0,5 a 20 μ M) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol Trolox/mg de pele (39-40).

As concentrações do extrato que inibem o processo oxidativo *in vitro* em 50% (IC₅₀) foram estimadas pelo software GraphPad Prism[®], versão 6.00, utilizando uma curva hiperbólica e apresentadas pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e foram representativas de 3 experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram analisados estatisticamente com o mesmo software por análise de variância com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média \pm EPM de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo e foram representativos de 2 experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

500 6 RESULTADOS

501
502

503 6.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE POLIFENOIS TOTAIS, FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR 504 (FPS) *IN VITRO* E SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH) DOS 505 DIFERENTES EXTRATOS DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

506
507
508

Os valores encontrados para os extratos nos diferentes solventes analisados variaram de 24,15 - 159,75 mg polifenol/g extrato (Tabela 2). Para o FPS, a variação dos valores obtidos foi de 1,13 – 11,16 e todos os extratos apresentaram picos de absorção nas regiões UVA e B. Por meio de uma curva padrão de Trolox, pode-se verificar que a capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical livre DPPH variou de 0,44 a 3,77 mmol/L de Trolox/ $\mu\text{g/mL}$. Foram selecionados os dois extratos que apresentaram o maior valor de FPS e de capacidade antioxidante (DPPH), uma vez que o objetivo do trabalho foi de verificar a eficácia fotoquimiopreventiva e a capacidade antioxidante do extrato de *R. officinalis* extraído em diferentes solventes.

518
519
520

6.2 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES *IN VITRO* DE EA E EE

521
522
523

O uso do radical estável de DPPH avaliou a capacidade de doação de hidrogênio do EA e do EE (Figuras 1). A atividade antioxidante máxima foi de 79,23% utilizando a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ de EA e o IC_{50} foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1 A). Para o EE, a atividade máxima foi de 79,73% utilizando a concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ de EE, e o IC_{50} foi de 5,21 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1 B). Para o ensaio de ABTS, os resultados mostraram com uma concentração de 24,98 $\mu\text{g/mL}$, uma atividade antioxidante máxima de 99,96% e IC_{50} de 3,81 $\mu\text{g/mL}$ para o EA (Fig. 2 A), enquanto que para o EE a atividade antioxidante máxima foi de 100% com uma concentração de 8,99 $\mu\text{g/mL}$, e IC_{50} de 1,88 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2 B). Nos ensaios de quimioluminescência com geração de radicais livres (sistema HRP/luminol/ H_2O_2) e ânion superóxido (sistema XO/luminol/XOD) foi verificado que ambos os extratos demonstraram capacidade sequestradora de radical livre concentração-dependente, além de apresentarem valores baixos de IC_{50} devido a metodologia ser muito sensível. Para

536 o ensaio HRP/luminol/H₂O₂, os resultados mostraram com uma concentração de 0,4
537 µg/mL, uma atividade antioxidante máxima de 99,16% e IC₅₀ de 0,049 µg/mL para o
538 EA (Fig. 3 A), para o EE a atividade antioxidante máxima foi de 99,20% com uma
539 concentração de 0,2 µg/mL e IC₅₀ de 0,031 µg/mL (Fig. 3 B). No sistema
540 XO/luminol/XOD o EA alcançou uma atividade antioxidante máxima de 90,77% na
541 concentração de 2,5 µg/mL e IC₅₀ de 0,332 µg/mL (Fig. 4 A). E o EE a atividade
542 antioxidante máxima foi de 98,41% com uma concentração de 0,625 µg/mL, e IC₅₀
543 de 0,025 µg/mL (Fig. 4 B). No ensaio de FRAP, o poder de redução encontrado foi
544 de 1,13 mM e de 1,28 mM de equivalente de Trolox/µg/mL de extrato para EA e EE,
545 respectivamente.

546

547

548 6.3 FORMULAÇÕES

549

550

551 6.3.1 Avaliação da Atividade Antioxidante e do FPS *in vitro* das formulações

552 Contendo EA e EE

553

554

555

556 Para verificar se o potencial de atividade antioxidante de EA e
557 EE que foi mantido após incorporados nas formulações, os ensaios de DPPH[•] e
558 ABTS foram realizados com F1, F2 e F3 contendo os extratos e os resultados foram
559 comparados com solução etanólica de EA e EE na mesma concentração no meio
560 reacional (Figs. 5 e 6). Foi observado que para ambos os ensaios utilizados ocorreu
561 uma diminuição significativa da atividade antioxidante de EA e EE incorporados em
562 F1 e F3 em comparação aos extratos puros (Figuras 5 A e C e Figuras 6 A e C). Por
563 outro lado, verificou-se que na formulação F2, que continha menos conteúdo lipídico,
564 a atividade antioxidante dos extratos foi mantida analisada pelo sequestro do ânion
565 (DPPH) e cátion (ABTS) radicais. As porcentagens de redução do DPPH para EA,
566 F2+EA, EE e F2+EE foram de 49,83%, 47,66%, 52,75% e 49,90% ,
567 respectivamente. Os resultados encontrados na doação de elétron ao radical ABTS
568 foi de 53%, 55%, 53,30% e 52,62% para EA, F2+EA, EE e F2+EE, respectivamente
(Figuras 5 B e 6 B).

569

570

571

As formulações F1, F2 e F3 incorporadas com EA ou EE apresentaram valores de FPS *in vitro* de 15,77, 9,48 e 9,96. e 8,24, 35,97 e 36,02, respectivamente. Foi realizado um controle do metoxicinamato de octila (filtro solar

572 sintético) que apresentou FPS de 35 e de acordo com os resultados obtidos, a
573 formulação F2 foi utilizada para os demais experimentos.

574

575

576 6.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CONTRA DANOS OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UVB

577

578

579

Estudos demonstram que a exposição à radiação UVB leva a
580 formação de edema que pode ser considerado um marcador de inflamação (29-41-
581 42). Assim, amostras de pele de tamanho padronizado foram retiradas para avaliar a
582 capacidade de F2 incorporada dos extratos em inibir a formação de edema. A Figura
583 7 demonstra que a irradiação UVB induziu aumento significativo de edema cutâneo
584 em animais irradiados não tratados e animais irradiados tratados com formulação
585 controle. Por outro lado, a formulação contendo EA ou EE não inibiu o edema da
586 pele nos camundongos.

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

A MPO desempenha um papel importante no sistema imunológico
inato e pode ser usado como marcador da presença de neutrófilos ou inflamação
(25). Os resultados mostram que a irradiação UVB induziu um aumento de
aproximadamente 1,4 vezes na atividade MPO na pele dos animais irradiados não
tratados e animais não irradiados tratados com formulação base. Em adição,
verificou-se que F2 contendo EA ou EE inibiu a atividade da MPO para níveis do
controle não irradiado (Fig. 8).

As metaloproteinases (MMP) são mediadores primários do dano do
tecido conjuntivo na pele exposta à irradiação UV e do envelhecimento prematuro da
pele (43). Os resultados mostraram um aumento significativo na secreção/atividade
de gelatinase na pele dos camundongos após exposição a irradiação UVB, contudo
as formulações acrescidas dos extratos de *R. officinalis* não foram capazes de inibir
significativamente a expressão da atividade da MMP-9 (Fig. 9).

O efeito da exposição à irradiação UVB na pele dos camundongos
também foi analisada pela quantificação do antioxidante endógeno GSH e pela
capacidade antioxidante total utilizando os métodos ABTS e FRAP. Os resultados
demonstraram que a irradiação UVB induziu uma diminuição de aproximadamente
1,33 vezes os níveis de GSH na pele dos animais irradiados não tratados e dos
animais tratados com formulações sem extratos e irradiados. Ambas formulações
adicionadas de EA ou EE inibiram a depleção do antioxidante endógeno, mantendo

607 níveis semelhantes ao grupo controle (não irradiado) (Fig. 10 A). Observou-se
608 também que houve uma diminuição de cerca de 1,62 e 1,11 vezes a capacidade
609 sequestradora de redução de ferro da pele após a irradiação UVB, avaliada pelos
610 testes ABTS e FRAP, respectivamente. As formulações adicionadas de extratos
611 conseguiram reestabelecer a capacidade antioxidante da pele comparado com o
612 grupo tratado com formulação base e irradiados (Figs. 10 B e C).

613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653

654 7 DISCUSSÃO

655

656

657

658 Os sinais observados na pele após exposição ao sol são inflamação,
659 caracterizada por eritema, edema e calor, e elevação de níveis de prostaglandinas e
660 leucotrienos. A homeostasia cutânea pode ser alterada após exposição a radiação
661 UV, diminuindo os sistemas antioxidantes e aumentando as espécies oxidantes.
662 Além da inflamação, espécies reativas na pele podem ser originadas e como
663 resultado, o sistema imunológico diminui sua capacidade de eliminar células
664 alteradas (44). Diante disso e de uma flora existente que é rica em plantas
665 medicinais e que apresentam atividades antioxidantes, fotoprotetora e
666 antienvhecimento cutâneo, tem-se como alternativa a utilização desses extratos de
667 plantas para a inibição do estresse oxidativo (45-46).

668

669 *R. officinalis* (alecrim) é uma conhecida erva culinária que possui
670 uma longa história de uso medicinal (47). *R. officinalis* apresenta uma gama de
671 atividades biológicas, sendo usado como antiespasmódico na cólica renal,
672 analgésico, antiepiléptico, anti-reumática, carminativa, diurética, expectorante,
673 dismenorreia, tônica e estimulante, aliviando desordens da respiração e efeitos
674 sobre a fertilidade humana (48). Conhecido por sua atividade antioxidante, as folhas
675 de *R. officinalis* não são apenas utilizados na indústria de alimentos, mas também
676 demonstraram ser seguros e atóxicos em testes em animais (49-50). O extrato das
677 folhas, também demonstrou exibir atividade inibitória contra células KB (um ensaio
678 amplamente utilizado para a identificação de agentes anticancerígenos em produtos
679 naturais) (51). Del bano (50) estudou a atividade antioxidante de seis extratos de *R.*
680 *officinalis* com diferentes composições polifenólicas e propôs que são excelentes
681 antioxidantes tanto em solução aquosa quanto sistemas lipídicos.

682

683 Nesse estudo, foi verificado que houve uma diversificação do
684 conteúdo de polifenóis totais encontrados nos extratos obtidos utilizando diferentes
685 sistemas solventes. Esse conteúdo variou em cerca de 6,6 vezes entre os extratos
686 que apresentaram o menor (acetona 50% e etanol 80%) com o de maior conteúdo
687 de polifenóis (etanol 20%). Em adição, observou que a atividade antioxidante
688 analisada pelo método de DPPH dos diferentes extratos também demonstrou que o
689 sistema solvente influencia na extração de compostos com essa ação a partir das
690 folhas de *R. officinalis*. Nesse caso, uma diferença em cerca de 8 vezes foi obtida

688 em relação a atividade sequestradora de radical livre dos extratos obtidos por etanol
689 20% e acetona 20 e 50% (0,46, 0,44 e 0,48 mmol/L de Trolox/ μ g/mL de amostra,
690 respectivamente) com extrato obtido com etanol 80% (3,77 μ Molar Eq. de
691 Trolox/g/mL). Esses resultados demonstraram que apesar do extrato obtido com
692 etanol 80% apresentar o menor conteúdo de polifenóis, o mesmo demonstrou a
693 maior capacidade sequestradora de radical livre. Isso pode estar relacionado com a
694 presença nesse extrato de outros compostos secundários que foram extraídos que
695 também apresentem atividade antioxidante (52).

696 O FPS, estimado por espectrofotometria, é um número que
697 avalia o filtro solar ou a substância em estudo, de acordo com a altura, largura e
698 localização da sua curva de absorção dentro do espectro do ultravioleta (280 – 400
699 nm) (18). De acordo com sua estrutura química, os filtros químicos sintéticos
700 apresentam a absorção máxima em regiões diferentes. Sendo assim, os que
701 absorvem no comprimento de ondas compreendido entre 290 a 320 nm são
702 considerados filtros solares UVB e os que tendem em absorver entre 320 a 400 nm,
703 são denominados filtros solares UVA (53). Esta mesma relação é feita para os filtros
704 solares vegetais (54). Portanto, as plantas que absorvem na região UV, apresentam
705 em sua composição, moléculas ativas semelhantes aos filtros químicos sintéticos
706 (55-56). Na varredura espectrofotométrica dos nove extratos obtidos com diferentes
707 sistemas solventes das folhas de *R. officinalis*, observou-se absorção nos
708 comprimentos de onda da RUVB. Assim, todos os extratos foram submetidos ao
709 teste de FPS *in vitro* que demonstrou valores que foram de 1,13 (etanol 20%) a 11
710 (acetona 80%). De acordo com a legislação brasileira, RDC N° 30, DE 1 DE JUNHO
711 DE 2012 (57) um produto adequado para utilização em cosméticos para bronzear ou
712 fotoprotoger, deve apresentar um FPS igual ou superior a 2. Pinto, et al. (58)
713 avaliaram o FPS de diferentes extratos vegetais, *Achillea millefolium*, *Ginkgo biloba*,
714 *Hamamelis virginiana*, *Matricaria chamomilla*, *Pereskia aculeata* e própolis,
715 encontrando valores que variaram de 0,56 – 0,82. Os resultados mostraram que EA
716 e EE foram melhores quando comparados aos resultados encontrados na literatura,
717 uma vez que EA e EE mostraram valores de 11,16 e 7,56, respectivamente. De
718 acordo com os resultados encontrados acima, foram escolhidos os extratos obtidos
719 com acetona (EA) e etanol (EE) a 80% para incorporação em formulações tópicas
720 com objetivo de fotoquimoprevenção.

721 Em decorrência da grande diversidade química existente nos

722 extratos vegetais, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade
723 antioxidante de amostras. Os métodos diferem entre si no mecanismo de ação, nas
724 condições experimentais, nas espécies-alvo e na forma como os resultados são
725 expressos, não existindo um método universal que reflita todos os antioxidantes
726 presentes em um extrato. Portanto, é necessário o uso de diferentes metodologias
727 para que a atividade antioxidante de um composto seja elucidada por completo (59).
728 Assim, a atividade antioxidante dos EA e EE foi avaliada por diferentes métodos *in*
729 *vitro* e os resultados foram expressos em IC₅₀, que é a concentração necessária do
730 antioxidante para reduzir em 50% o radical livre. Foi observado que em todos os
731 testes utilizados o EE demonstrou um menor valor de IC₅₀ indicando que apresenta
732 uma maior capacidade antioxidante *in vitro* que o EA. No ensaio de FRAP, no qual
733 se verifica a capacidade do antioxidante em reduzir o complexo férrico-
734 tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPTZ) à forma ferrosa (Fe²⁺-TPTZ), os resultados encontrados
735 para os extratos foram próximos entre si.

736 Os resultados apresentados sugerem a possível utilização dos
737 extratos de *R. officinalis* em produtos tópicos para o tratamento e/ou prevenção do
738 fotoenvelhecimento e do câncer de pele decorrentes de danos oxidativos induzidos
739 pela RUV. Porém, essa proteção será eficaz se a atividade antioxidante do extrato
740 for mantida após incorporação em formulações tópicas e se ocorrer penetração
741 destas substâncias antioxidantes em camadas mais profundas, uma vez que a RUV
742 penetra profundamente na pele (60). Além disso, a aplicação tópica de substâncias
743 ativas é de fato uma estratégia poderosa na redução da toxicidade sistêmica e
744 restringe o efeito terapêutico ao tecido alvo (ex. pele) (61). Assim, os ensaios de
745 sequestro do radical DPPH e ABTS foram utilizados com as formulações acrescidas
746 dos extratos de *R. officinalis* para verificar se os mesmos mantinham suas atividades
747 antioxidantes.

748 Foi determinado o pH das formulações (dados não mostrados) que
749 se mantiveram dentro da faixa de pH da pele que é levemente ácido (4,6-5,8) (62) e
750 foi realizado o testes de centrifugação, que fornece informações preditivas sobre a
751 instabilidade do sistema, demonstrando que não houve separação de fases nas
752 diferentes formulações. Contudo, os resultados de atividade antioxidante mostraram
753 uma diminuição estatística significativa da F1 e F3 em relação aos extratos nas
754 mesmas concentrações no meio reacional. Estes resultados indicam que os
755 componentes dessas formulações tópicas podem estar interagindo com os

756 constituintes do extrato que apresentam atividade antioxidante. Na F2 a capacidade
757 sequestradora de radical livre do EA e EE foram mantidas após incorporação na
758 formulação. Portanto, considerando que não houve perda da atividade antioxidante
759 dos extratos quando adicionados à F2, a mesma foi escolhida para estudos do efeito
760 protetor dos extratos contra danos oxidativos causados pela radiação UVB.

761 O tempo de exposição e a intensidade da radiação UV, além da
762 susceptibilidade genética e pigmentação da pele, podem levar a manifestações do
763 organismo como o processo inflamatório, que é caracterizado pelo desenvolvimento
764 de eritema ou queimaduras de graus variados, edema, calor e elevação dos níveis
765 de substâncias como as prostaglandinas (63). Edema é um dos parâmetros mais
766 comuns causados pela inflamação induzida pela RUV (64) o que é caracterizado
767 pelo aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquido para o
768 interstício (65). Apesar da redução em 80% de edema plantar, induzido com
769 formaldeído, após aplicação tópica de extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*
770 (66), a F2 acrescida de EA ou de EE não foi capaz de reduzir o edema de pele
771 induzido pela radiação UVB. Da mesma forma, não foi observado com as
772 formulações aplicadas topicamente um efeito inibitório na atividade da MMP-9. Essa
773 é uma das enzimas primárias relacionadas à degradação do colágeno da pele e
774 componentes da rede de fibras elásticas e são produzidas por fibroblastos,
775 queratinócitos, mastócitos, células endoteliais e leucócitos, tais como neutrófilos e
776 são liberados a partir de grânulos citoplasmáticos (67). Por outro lado, nossos
777 resultados demonstraram que ambos os extratos de *R. officinalis* adicionados na F2
778 foram capazes de reduzir a atividade da MPO aos níveis basais do controle não
779 irradiado. MPO (enzima heme) é um dos produtos especiais dos neutrófilos
780 armazenada em grandes quantidades nos grânulos azurofílicos destas células. O
781 ácido hipocloroso derivado de MPO (HOCl) reage com proteínas, DNA e lipídios
782 para formar oxidantes de longa duração, que foram envolvidos em processos como
783 carcinogênese, aterosclerose e insuficiência renal crônica (25). A infiltração
784 leucocitária é um importante marcador de danos na pele após exposição a
785 irradiação. Estas células produzem uma quantidade de citocinas pró-inflamatórias e
786 EROS aumentando a resposta inflamatória (68).

787 A irradiação UVB produz EROS diretamente e indiretamente através
788 da resposta inflamatória. Vários sistemas antioxidantes estão presentes em tecidos
789 de mamíferos para eliminar EROS e proteger células. O equilíbrio entre as defesas

790 antioxidantes e a produção de EROS é essencial para manter a função celular,
791 enquanto que uma perturbação a favor dos oxidantes leva ao estresse oxidativo
792 (69). Os resultados do teste de poder antioxidante de redução férrica (FRAP)
793 correlacionam-se bem com os níveis de antioxidantes como ácido ascórbico, ácido
794 úrico e α -tocoferol, enquanto ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-
795 sulfônico) (ABTS), com a capacidade de eliminação de radicais, refletindo os níveis
796 de glutathiona reduzida do antioxidante endógeno (GSH) (70). Neste estudo, a
797 irradiação UVB induziu uma diminuição do FRAP e da capacidade sequestradora de
798 ABTS na pele, refletindo os efeitos pro-oxidantes deste estímulo como descrito
799 anteriormente. O tratamento com F2 adicionado de EA ou EE aplicados topicamente
800 inibiu significativamente esta depleção antioxidante, mantendo a capacidade
801 antioxidante da pele semelhante ao grupo controle (não irradiado) em ambos os
802 testes. Corroborando estes resultados, foi verificado também um efeito inibitório na
803 depleção do GSH que é um dos antioxidantes presentes em abundância na pele
804 humana, em maiores concentrações na epiderme e estrato córneo. Existe uma direta
805 correlação entre os níveis de GSH e a exposição à radiação UVA e UVB (70).

806 As formulações preparadas contendo EA ou EE demonstram
807 atributos interessantes para serem explorados como potenciais produtos para
808 aplicação contra danos fotooxidativos, apesar da necessidade de novos estudos.

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824 **8 CONCLUSÃO**

825

826

827

828 O tipo de sistema solvente influencia as características químicas e
829 ação antioxidante dos extratos obtidos das folhas de *R. officinalis*. Os extratos
830 apresentaram atividade antioxidante esperada quando avaliado *in vitro* e mantiveram
831 a atividade antioxidante quando incorporado em formulação tópica com baixo
832 conteúdo lipídico, protegendo a pele dos efeitos deletérios da radiação UVB. O
833 tratamento com extratos de *R. officinalis* (EA e EE) adicionados em F2,
834 significativamente melhorou a capacidade antioxidante cutânea para níveis do
835 controle não irradiado. Portanto, os resultados sugerem que as formulações
836 contendo extratos de *R. officinalis* podem ser uma fonte tópica de compostos
837 antioxidantes que diminuem os danos oxidativos da pele.

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

REFERÊNCIAS

853

854

855

856

857

858

1. A.P. Teston, D. Nardino, L. Pivato. Envelhecimento cutâneo: Teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. UNINGÁ Review. 1 (2010) 71-84.

859

860

861

2. S. Sun, P. Jiang, W. Su, Y. Xiang, J. Li, L. Zeng, S. Yang, Wild chrysanthemum extract prevents UVB radiation-induced acute cell death and photoaging, Cytotechnology. 68 (2016) 229–240.

862

863

864

3. J.Y. Lim, O.K. Kim, J. Lee, M.J. Lee, N. Kang, J.K. Hwang, Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice, Nutr. Res. Pract. 8 (2014) 398–403.

865

866

4. M. Yaar, B.A. Gilchrest, Photoageing: Mechanism, prevention and therapy, Br. J. Dermatol. 157 (2007) 874–887.

867

868

869

870

5. E. Damiani, L. Rosati, R. Castagna, P. Carloni, L. Greci. Changes in ultravioleta absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. J. Photochem Photobiol B. 82 (2006) 204-213.

871

872

873

874

6. S. Schalka, M.A. Vitale-Villarejo, C.M. Agelune, P.C.P. Bombarda. Benefícios do uso de um composto contendo extrato de *Polypodium loucotomos* na redução da pigmentação e do eritema decorrentes da radiação ultravioleta. Surgical & Cosmetic Dermatology. 4 (2014) 344-348.

875

876

877

878

7. Marina S.S.P. Fotoenvelhecimento: Prevenção e Tratamento. 2014. <https://sapiencia.ualg.pt/bitstream/10400.1/8225/1/Fotoenvelhecimento%20-%20Preven%C3%A7%C3%A3o%20e%20Tratamento%20com%20assinatura%20digital%20%281%29.pdf>. Acessado 07 Jan 2018.

879

880

8. V.P. Baillo, A.C. Lima. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. Rev. Bras. Farmácia (RBF). 3 (2012) 271-278.

- 881 9. Souza P.A. Determinação do fator de proteção solar *in vitro* e avaliação da
882 estabilidade preliminar de emulsão de água em silicone contendo extratos de
883 *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) e própolis verde. Juiz de Fora; 2016.
884
- 885 10. M.C.P.P.R. Mansur. Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e
886 antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var.
887 *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar. Rio de Janeiro; 2011.
888
- 889 11. M.S.M. Teixeira. Avaliação da atividade fotoprotetora de formulação
890 cosmética contendo a associação entre fração em clorofórmio de *Garcinia*
891 *cambogia* Desr. (Clusiaceae) e filtro sintético de amplo espectro. Juiz de Fora;
892 2016.
893
- 894 12. L.D.S. Cabral, S.O. Pereira, A.K. Partata. Filtros solares e fotoprotetores –
895 uma revisão. Infarma (Ciências Farmacêuticas). 25 (2013).107-110.
896
- 897 13. C.M.S. Santos, P.H.G. Souza. Avaliação da atividade fotoprotetora da
898 curcumina. Perspec. Ciên. Tec. 9 (2017). 26-45.
899
- 900 14. K.K.L. Yamaguchi, L.S. Santarém, C.V. Lamarão, E.S. Lima, V.F. Veiga-
901 Junior. Avaliação *in vitro* da Atividade Fotoprotetora de Resíduos de Frutas
902 Amazônicas. Sci. Amaz. 1. (2016).1 09-116.
- 903 15. Dalmarco, J.B. Estudo das propriedades químicas e biológicas de
904 *Rosmarinus officinalis* L. Florianópolis; 2012.
905
- 906 16. Silva, A.M.O. Efeito dos compostos fenólicos presentes no alecrim
907 (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as enzimas antioxidantes e os parâmetros
908 bioquímicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. São Paulo;
909 2008.
910
- 911 17. S.R. Georgetti, R. Casagrande, F.T.M. Vicentini, W.A. Verri, M.J.V. Fonseca.
912 Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro*
913 methods and investigation of this activity after its incorporation in topical
914 formulations. Eur. J. Pharm. and Biopharm. 64. (2006). 99-106.

- 915 18. J.S. Mansur, M.N.R. Brender, M.C.A. Mansur, R.D. Azulay. Determinação do
916 fator de proteção solar por espectrofotometria. An. Bras. Dermatol. 61. (1986).
917 121-124.
918
- 919 19. L.M. Vieira, M.S.B. Souza, J. Mancini-Filho, A. Lima. Fenólicos totais e
920 capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. Ver. Bras.
921 Frutic. 3. (2011). 888-897.
- 922 20. J.A. Vignoli, D.G. Bassoli, M.T. Benassi. Atividade antioxidante de cafés
923 torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. Coffe Science. 1
924 (2011). 68-75.
- 925 21. H. Pasquini-Netto, F.A. Manente, E.L. Moura, L.O. Regasini, M.E.F. Pinto,
926 V.S. Bolzani, O.M.M.F. Oliveira, J.C.R. Velloso. Avaliação das atividades
927 antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de
928 *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). Rev. Bras. plantas med.
929 4. (2012). 666-672.
- 930 22. F.M. Oliveira. Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras
931 contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção
932 cutânea *in vitro* e de eficácia *in vivo*. São Paulo; 2007.
- 933 23. M. Carini, g. Aldini, E. Bombardelli, P. Morazzoni, R.M. Facino. UVB-induced
934 hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape
935 seeds. Life Sci. 15. (2000). 1799-1814.
- 936 24. R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. Santos, M.J.V.
937 Fonseca. Protective effect of topical formulations containing quercetin against
938 UVB-induced oxidative stress in hairless mice. J. Photochem. Photobiol B. 84.
939 (2006). 21-27.
- 940 25. M.Z. Campanini, F.A. Pinho-Ribeiro, A.L. Ivan, V.S. Ferreira, F.M. Vilela, F.T.
941 Vicentini, R.M. Martinez, A.C. Zarpelon, M.J. Fonseca, T.J. Faria, M.M.
942 Baracat, W.A. Verri, S.R. Georgetti, R. Casagrande. Efficacy of topical
943 formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-

- 944 induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. J. Photochem.
945 Photobiol B. 127. (2013). 153-160.
- 946 26. Y. Shindo, E. Witt, D. Man, W. Epstein, L. Packer. Enzymic and non-enzymic
947 antioxidants in epidermis and dermis of human skin. J. Invest. Dermatol. 102
948 (1994). 122-124.
- 949 27. A.L.M. Ivan, M.Z. Campanini, R.M. Martinez, V.S. Ferreira, V.S. Steffen,
950 F.T.M.C. Vicentini, F.M.P. Vilela, F.S. Martins, A.C. Zarpelon, T.M. Cunha,
951 M.J.V. Fonseca, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, W.A. Verri, R. Casagrande.
952 Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and
953 oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidante activity *in vitro*. J.
954 Photochem. Photobiol B. 138. (2014). 124-133.
- 955 28. MM.V.R. Velasco, T.S. Balogh, C.A. Pedriali, F.D. Sarruf, C.A.S.O. Pinto,
956 T.M. Kaneko, A.R. Baby. Novas metodologias analíticas para avaliação da
957 eficácia fotoprotetora (*in vitro*) - revisão. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 1.
958 (2010). 27-34.
- 959 29. E. Bhatia, C. Doddivenaka, X. Zhang, A. Bommareddy, P. Krishnan, D.P.
960 Matthees, C. Dwivedi. Chemopreventive effects of dietary canola oil on colon
961 câncer development. Nutr. Cancer. 63. (2011). 242-247.
- 962 30. A.C. Pereira, E.D. Carmo, V.A.S. Silveira, S.U. Amadei, L.E.B. Rosa. O papel
963 das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. Rev. Bras.
964 Cancerologia. 52. (2006). 257-262.
- 965 31. Y.M. Fonseca, M.O. Franciane, F.T.M.C. Vicentini, N.A.J.C. Furtado, J.P.B.
966 Sousa, Y.M. Lucisano-Valim, M.J.V. Fonseca. Evaluation of the potential of
967 brazilian própolis against UV-induced oxidative stress. Evidence-Based
968 Complementary and Alternative Medicine. (2011). 1-8.
- 969 32. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J.J. Randall. Protein measurement
970 with the Folin phenol reagent. J. J. Biol. Chem. 193. (1951). 265-275.
- 971 33. R.M. Martinez. Trans-Chalcona, Hesperidina Metil Chalcona e Naringenina:
972 Potencial Terapêutico e Mecanismos de Ação nos Danos Cutâneos

- 973 Inflamatórios e Oxidativos Induzidos pela Radiação Ultravioleta B em
974 Camundongos sem Pêlo. Londrina; 2015.
- 975 34. A.S.S.R. Neto. Glutationa: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação
976 de morte celular programada e destoxificação de drogas. Porto; 2010.
- 977 35. P. Srinivasan, K.E. Sabitha, C.S. Shyamaladevi. Attenuation of 4-
978 Nitroquinoline 1-oxide induced *in vitro* lipid peroxidation by green tea
979 polyphenols. Life Scie. 80. (2007). 1080-1086.
- 980 36. V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban. Gender differences in antioxidante
981 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-
982 sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Comp.
983 Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140. (2005). 47-52.
- 984 37. M.Z. Campanini, D.L. Custodio, A.L. Ivan, S.M. Martins, M.J. Paranzini, R.M.
985 Martinez, A.W. Verri, F.T. Vicentini, N.S. Arakawa, M.M. Baracat, S.R.
986 Georgetti. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus*
987 extract: *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* efficacy against UV-B-Induced
988 oxidative stress. AAPS PharmSciTech. 15. (2014). 86-95.
- 989 38. F.P. Souza, G.R. Campos, J.F. Packer. Determinação da atividade
990 fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia*
991 *glabra* L. – Acerola. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 34. (2013).
- 992 39. N. Bhatia, T.A. Demmer, A.K. Sharma, I. Elcheva, V.S. Spiegelman, Role of
993 b-TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin, Arch.
994 Biochem.Biophys. 508. (2011). 178–184.
- 995 40. C.M. Kim, S.M. Kang, H.J. Jeon, S.H. Shin, Production of *Vibrio vulnificus*
996 metalloprotease VvpE begins during the early growth phase: usefulness of
997 gelatin-zymography, J. Microbiol. Methods 70 (2007) 96–102.
- 998 41. G.J. Fisher, Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang, J.J.N. Voorhees Engl.
999 J. Med. 337. (1997). 1419–1429.

- 1000 42. J.F.F. Orlanda, V.V. Vale. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de
1001 extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). Rev. Bras.
1002 Pl. Med. 17. (2015). 730-736
- 1003 43. I.M.P. Violante, I.M. Souza, C.L. Venturini, A.F.S. Ramalho, R.A.N. Santos, M.
1004 Ferrari. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do
1005 cerrado de Mato Grosso. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. 19.
1006 (2009). 452-457
- 1007 44. C.F.G. Silva, M.P. Mendes, V.V. Almeida, R.N. Michels, L.S. Sakanaka,
1008 L.T.D. Tonin. Parâmetros de qualidade físico-químicos e avaliação da
1009 atividade antioxidante de folhas de *Plectranthus baratus* Andr. (Lamiaceae)
1010 submetidas a diferentes processos de secagem. Rev. Bras. Pl. Med. 18.
1011 (2016). 48-56.
- 1012 45. F.T.K. Hussain. Medicinal Plants, Their Cultivation and Contents. Arabic Book
1013 Shop: Libya-Tunisia (1979)
- 1014 46. M.R. Al-Sereiti, K.M. Abu-Amer, P. Sen. Pharmacology of Rosemary
1015 (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol
1016 37. (1999). 124–130.
- 1017 47. Loliger J. In Rancidity in Food, Allen J, Hamiltin R (eds). Elsevier Science.
1018 New York: 1989 105.
- 1019 48. Schuler P. Natural antioxidants exploited commercially. In Food Antioxidants;
1020 Hudson BJB (ed.). Elsevier Applied Science. London: 1990. Chapter 4.
- 1021 49. T. Hayashi, M. Arisawa, T. Bandome et al. Studies on medicinal plants in
1022 Paraguay: Studies on 'Romero': Part 1. Planta Med 53 (1987). 394.
- 1023 50. M.J. del Bano, J. Lorente, J. Castillo et al. Phenolic diterpenes, flavones and
1024 rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems
1025 and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. J Agric Food Chem
1026 51. (2003). 4247–4253.

- 1027 51. G. Angelov, P. Penchev, J.S. Condoret. Optimization of operational conditions
1028 of ethanol extraction of rosmarinic acid from lemon balm (*Melissa officinalis*
1029 L.). Sci. Pap. 35. (2007). 71–76.
- 1030 52. M.D. Vetal, V.G. Lade, V.K. Rathod. Extraction of ursolic acid from
1031 *Ocimumsanctum* leaves: kinetics and modeling. Food Bioprod. Process. 90.
1032 (2012). 793–798.
- 1033 53. A.W. Zibetti. Desenvolvimento de um processo de separação de compostos
1034 bioativos de *Rosmarinus officinalis*. Florianópolis, 2012.
- 1035 54. P. Aikens. Nanomateriais proporcionam proteção solar de amplo espectro.
1036 Cosmet Toiletries 18 (2006). 60-64.
- 1037 55. I.M.P. Violante, I.M. Souza, C.L. Venturini, A.F.S. Ramalho, R.A.N. Santos,
1038 M. Ferrari. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do
1039 cerrado de Mato Grosso. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19 (2009). 452-
1040 457.
- 1041 56. Ministério da Saúde – MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária –
1042 ANVISA 2012.
1043 [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3134554/RDC_30_2012_.pdf/c60](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3134554/RDC_30_2012_.pdf/c600a91b-f20f-40f9-9c0c-28724725bb21)
1044 [0a91b-f20f-40f9-9c0c-28724725bb21](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3134554/RDC_30_2012_.pdf/c600a91b-f20f-40f9-9c0c-28724725bb21). Acessado 08 Jan 2018.
- 1045 57. A.C. Oliveira, I.B. Valentim, C.A. Goulart, E.J.H. Silva, M.T.S. Trevisan.
1046 Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Quim Nova. 32. (2009). 689-702
- 1047 58. J.E.S. Pinto, T.B. Mickos, K.F. Silva, C.F.P. Sarto, D.F. Felipe. Estudo da
1048 atividade fotoprotetora de diferentes extratos vegetais e desenvolvimento de
1049 formulação de filtro solar. Anais eletrônicos. (2013).
- 1050 59. L. Scotti, et al., Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de
1051 moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético, Revista
1052 Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 43 (2007) 153-166
- 1053 60. S.R. Georgetti, R. Casagrande, F.T.M.C. Vicentini, W.A. JR Verri, M.J.
1054 Fonseca, Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different

- 1055 *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in
1056 topical formulations, European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics.
1057 64 (2006) 99-106.
- 1058 61. G.R. Leonardi, L.R. Gaspar & P.M.B.G.M. Campos. Estudo da variação do
1059 pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das
1060 vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. An. Bras.
1061 Dermatol. 77 (2002). 563-69.
- 1062 62. S. Alam, A. Pal, D. Singh, K.M. Ansari. Topical application of Nexrutine
1063 inhibits UVB-induced cutaneous inflammatory responses in SKH-1 hairless
1064 mouse, Photodermatology. (2017).
- 1065 63.F. Afaq, M. Saleem, C.G. Krueger, J.D. Reed, H. Mukhtar. Anthocyanin- and
1066 hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-
1067 κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Intern. J. Cancer.
1068 113. (2005). 423-433.
- 1069 64. R.M. Martinez. Trans-chalcona, hesperidina metil chalcona e naringenina:
1070 potencial terapêutico e mecanismos de ação nos danos cutâneos
1071 inflamatórios e oxidativos induzidos pela radiação ultravioleta B em
1072 camundongos sem pêlo, 2015.
- 1073 65. E.S. Mengoni, G. Vichera, L.A. Rigano, M.L. Rodriguez-Puebla, S.R.
1074 Galliano, E.E. Cafferata, O.H. Pivetta, S. Moreno, A.A. Vojnov. Suppression of
1075 COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin
1076 by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. Fitoterapia 82 (2011)
1077 414–421
- 1078 66. G. Jenkins. Molecular mechanisms of skin ageing, Mech. Age. Dev. 123
1079 (2002) 801–810.
- 1080 67. F. Rijken, C.A. Bruijnzeel-Koomen. Clin. Pharmacol. Ther. 89 (2011). 120–
1081 124
- 1082 68. M.L. Circu, T.Y. Aw. Free Radic. Biol. Med. 48 (2010). 749–762.

- 1083 69. V. Katalinic, D. Modun, I. Music, M. Boban. *Comp. Biochem. Physiol. C*
1084 *Toxicol. Pharmacol.* 140 (2005). 47–52.
- 1085 70. A. Godic, B. Poljšak, M. Adamic, R. Dahmane, The role of antioxidants in skin
1086 cancer prevention and treatment, *Oxid Med Cell Longev.* (2014) 6.
- 1087
- 1088
- 1089
- 1090
- 1091
- 1092
- 1093
- 1094
- 1095
- 1096
- 1097
- 1098
- 1099
- 1100
- 1101
- 1102
- 1103
- 1104
- 1105
- 1106
- 1107
- 1108
- 1109
- 1110
- 1111

APÊNDICE A

Tabelas

1112
1113
1114
1115
1116

Tabela 1: Componentes das formulações p/p (%)

Matérias-primas			
	F1 ^a	F2 ^b	F3 ^c
Polawax®	15,0	2,0	-
Propilenoglicol	5,0	5,0	2,0
TG de ácidos cáprico e caprílico	3,0	3,0	-
Phenonip®	0,8	0,8	0,8
Natrosol®	-	1,5	-
Transcutol®	-	15,0	-
Álcool Cetoestearílico 30/70	-	-	8,0
Álcool Cetoestearílico 20OE	-	-	3,6
Monoestearato de glicerila	-	-	2,0
Miristato de isopropila	-	-	3,0
Metoxicinamato de octila	-	-	5,0
Benzofenona-3	-	-	4,0
Água deionizada qsp	100,0	100,0	100,0

1117
1118
1119
1120

^aFormulação 1 - Creme; ^bFormulação 2 – Gel Creme; ^cFormulação 3 - Fotoprotetor.

1121 **Tabela 2:** Determinação do conteúdo de polifenóis totais, FPS e atividade
 1122 sequestradora do DPPH.

	Polifenóis (mg ácido gálico/g extrato)	FPS	DPPH (μ Molar Eq. de Trolox/g/mL)
Acetona 20%	47	2,58	0,44
Acetona 50%	25,1	3,62	0,48
Acetona 80%	62,25	11,16	1,65
Etanol 20%	159,75	1,13	0,46
Etanol 50%	56,5	8	1,39
Etanol 80%	24,15	7,56	3,77
Metanol 20%	46,8	2,48	0,52
Metanol 50%	46,25	5,28	1,01
Metanol 80%	39,8	7,58	2,83

1123
 1124
 1125
 1126
 1127
 1128
 1129
 1130
 1131
 1132
 1133
 1134
 1135
 1136

APÊNDICE B

Legenda das Figuras

1137

1138

1139

1140

1141 Figura 1: Curva concentração-resposta da atividade antioxidante do EA (A) e EE (B)
1142 utilizando o método de sequestro de radicais DPPH. Os resultados são
1143 representados pela média \pm EPM.

1144

1145 Figura 2: Curva concentração-resposta da atividade antioxidante do EA (A) e EE (B)
1146 utilizando o método de sequestro de radicais ABTS. Os resultados são
1147 representados pela média \pm EPM.

1148

1149 Figura 3: Curva concentração-resposta da atividade sequestradora de radicais livres
1150 gerados pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP do EA (A) e do EE (B). Os resultados são
1151 representados pela média \pm EPM.

1152

1153 Figura 4: Curva concentração-resposta da atividade sequestradora de ânion
1154 superóxido gerado pelo sistema xantina/luminol/XOD do EA (A) e do EE (B). Os
1155 resultados são representados pela média \pm EPM.

1156

1157 Figura 5: Avaliação da manutenção da capacidade antioxidante de EA e EE
1158 incorporados em formulações tópicas pelo ensaio de sequestro do radical livre
1159 DPPH. Creme (A), Gel creme (B) e Fotoprotetor (C). Os resultados são
1160 representados pela média \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas
1161 utilizando-se one-way-ANOVA seguido de Bonferroni. *Diferença estatística
1162 significativa se $p < 0,05$ em comparação ao extrato com mesmo solvente.

1163

1164 Figura 6: Avaliação da manutenção da capacidade antioxidante de EA e EE
1165 incorporados em formulações tópicas pelo ensaio de sequestro do radical livre
1166 ABTS. Creme (A), Gel creme (B) e Fotoprotetor (C). Os resultados são
1167 representados pela média \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas
1168 utilizando-se one-way-ANOVA seguido de Bonferroni. *Diferença estatística
1169 significativa se $p < 0,05$ quando comparado com extrato e formulação.

1170

1171 Figura 7: Avaliação da eficácia de Gel creme adicionada de EA ou EE na diminuição
1172 da formação de edema induzido pela radiação UVB quando comparados a B (Base).
1173 O edema na pele foi determinado 12h após o término da irradiação. As barras
1174 representam médias \pm EPM de 2 experimentos separados, 5 camundongos por
1175 grupo, *p < 0,05 em comparação ao grupo controle não irradiado.

1176

1177 Figura 8: Avaliação da eficácia de Gel creme adicionada de EA ou EE na diminuição
1178 da atividade da MPO induzida pela radiação UVB quando comparados a B (Base).
1179 As barras representam médias \pm EPM de 2 experimentos separados, 5
1180 camundongos por grupo, *p < 0,05 em comparação ao grupo controle não irradiado
1181 e #p < 0,05 em comparação ao grupo controle irradiado e formulação controle.

1182

1183 Figura 9: Avaliação da eficácia de Gel creme adicionada de EA ou EE na diminuição
1184 da atividade da MMP-9 induzida pela radiação UVB. (A) Representa a zimografia em
1185 gel e (B) representam médias \pm SEM de 5 camundongos por grupo e são
1186 representativas de dois experimentos separados, *p < 0,05 em comparação ao
1187 grupo controle não irradiado.

1188

1189 Figura 10: Avaliação da eficácia de Gel creme adicionada de EA ou EE na depleção
1190 da capacidade antioxidante da pele induzida pela radiação UVB. (A) Níveis de GSH,
1191 (B) Poder redutor de ferro pelo ensaio FRAP e (C) Capacidade sequestradora do
1192 radical ABTS. As barras representam médias \pm EPM de 2 experimentos separados,
1193 5 camundongos por grupo, *p < 0,05 em comparação ao grupo controle não
1194 irradiado e #p < 0,05 em comparação ao grupo controle irradiado e formulação
1195 controle.

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

APÊNDICE C

Figuras

1207

1208

1209

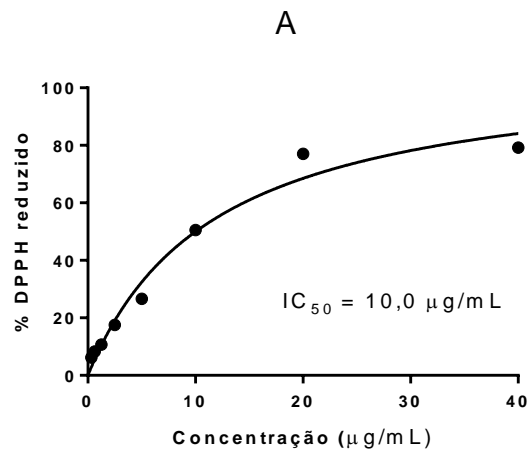
1210

1211 Figura 1:

1212

1213

1214



1215

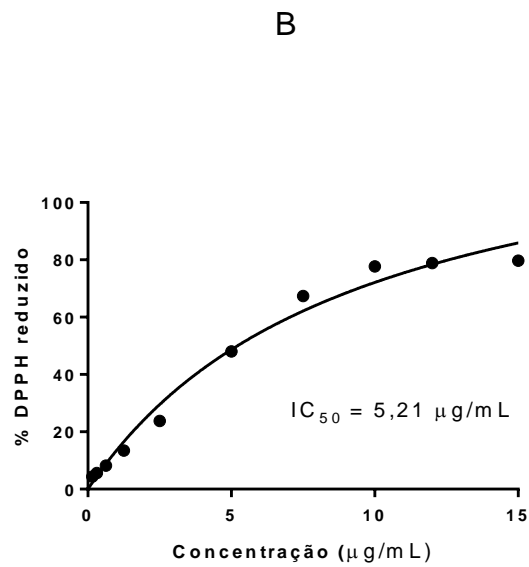
1216

1217

1218

1219

1220



1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228

1229 Figura 2:

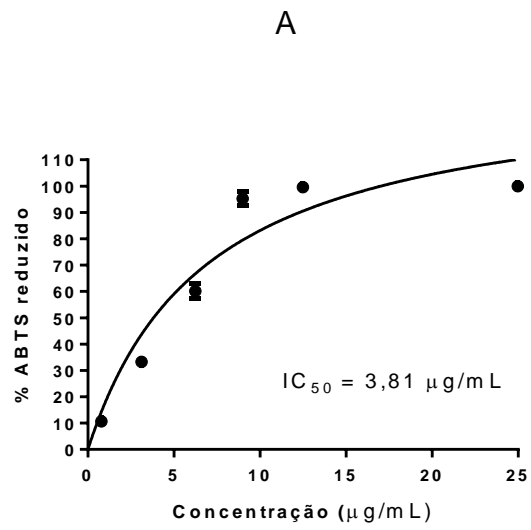
1230

1231

1232

1233

1234



1235

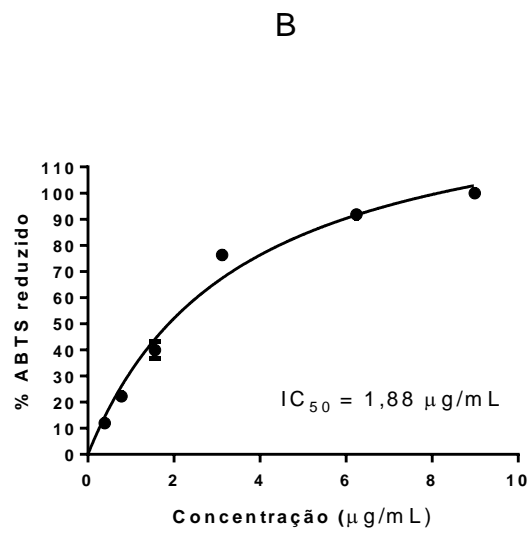
1236

1237

1238

1239

1240



1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250 Figura 3:

1251

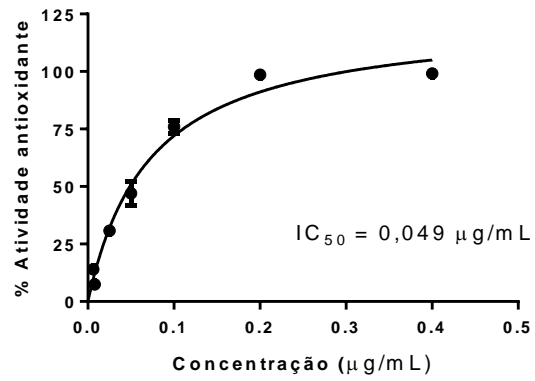
1252

1253

1254

1255

A



1256

1257

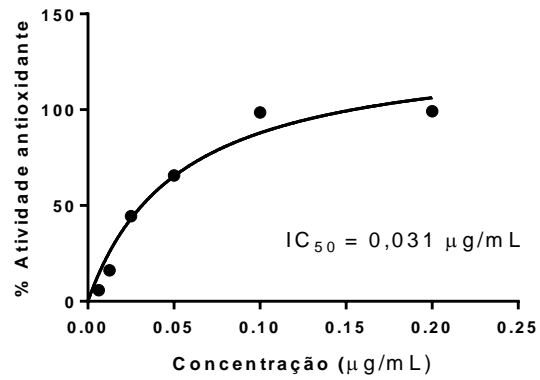
1258

1259

1260

1261

B



1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270 Figura 4:

1271

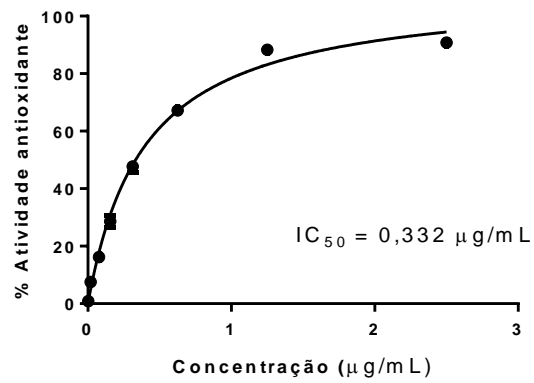
1272

1273

1274

1275

A



1276

1277

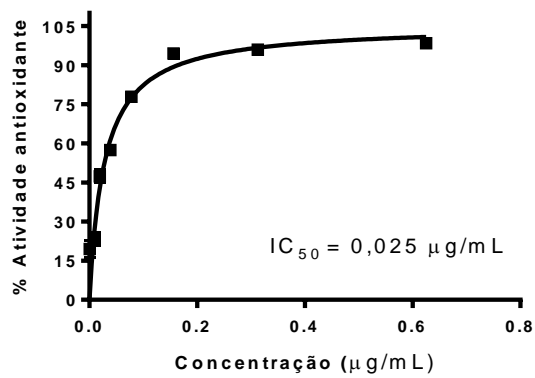
1278

1279

1280

1281

B



1282

1283

1284

1285

1286

1287

1288

1289

1290 Figura 5:

1291

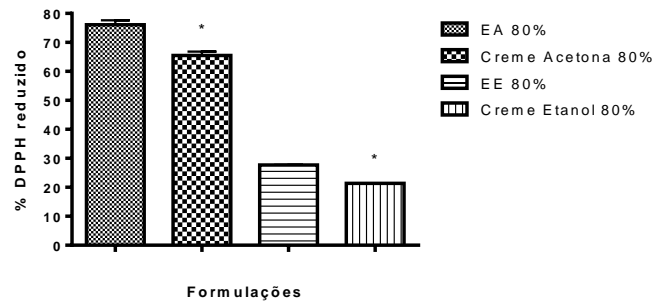
1292

1293

1294

1295

A



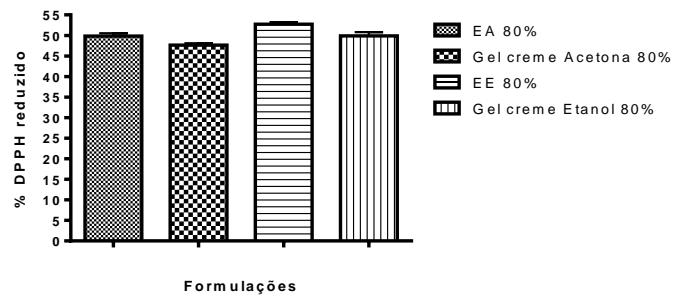
1296

1297

1298

1299

B



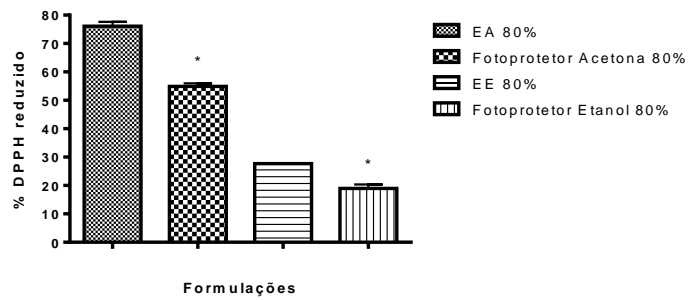
1302

1303

1304

1305

C



1308

1309

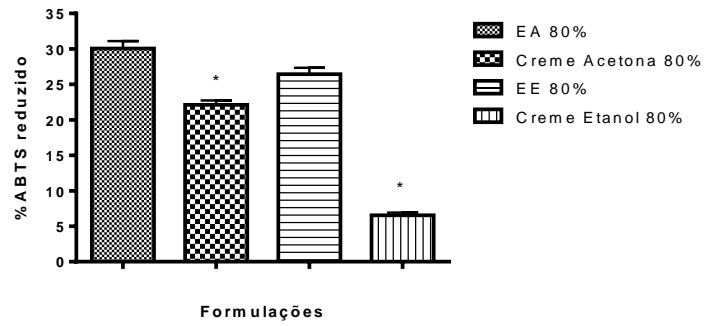
1310 Figura 6:

1311

1312

1313

A

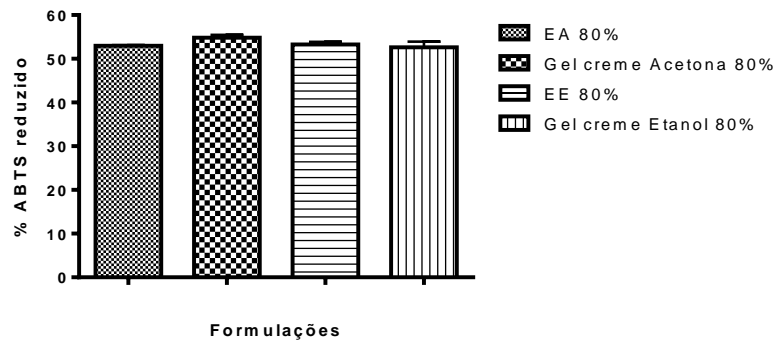


1314

1315

1316

B



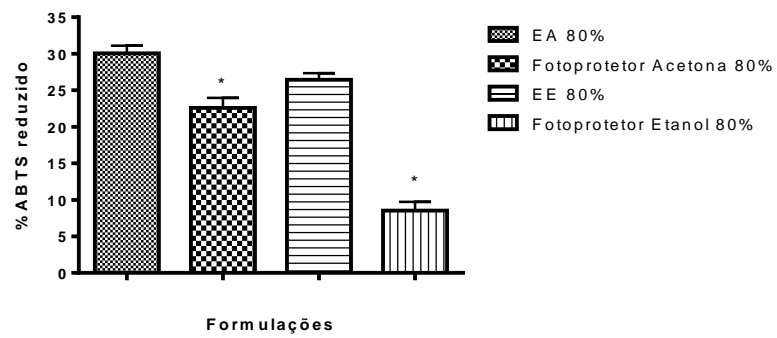
1317

1318

1319

1320

C



1321

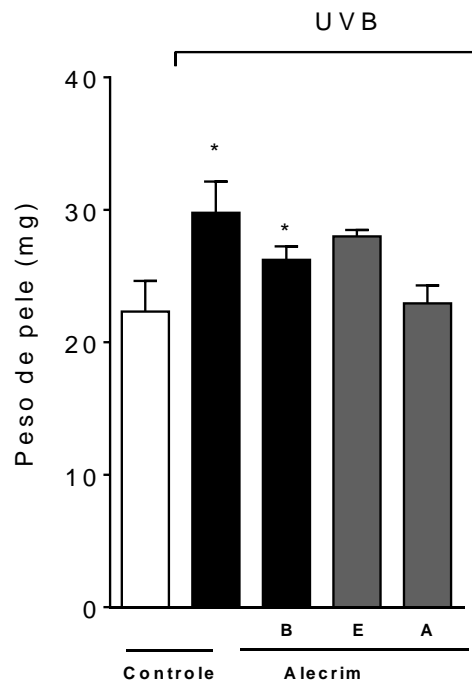
1322

1323

1324 Figura 7:

1325

1326



1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

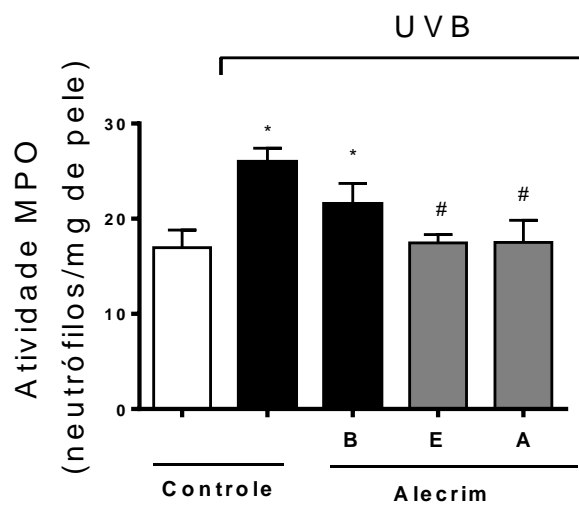
1337

1338

1339 Figura 8:

1340

1341



1342

1343

1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356 Figura 9:

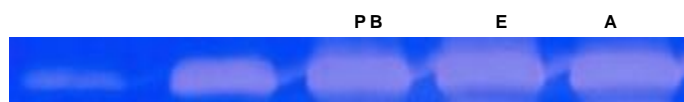
1357

1358

1359

1360

A



1361

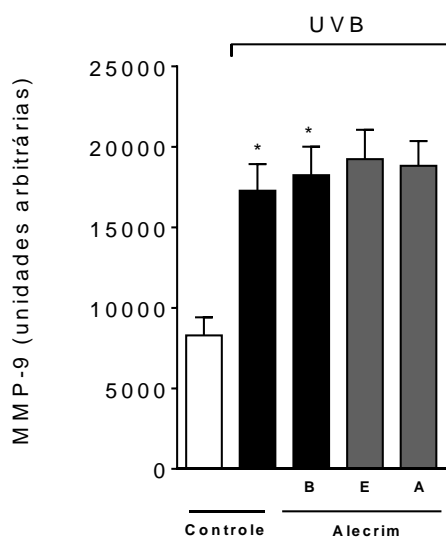
1362

1363

1364

1365

B



1366

1367

1368

1369

1370

1371

1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

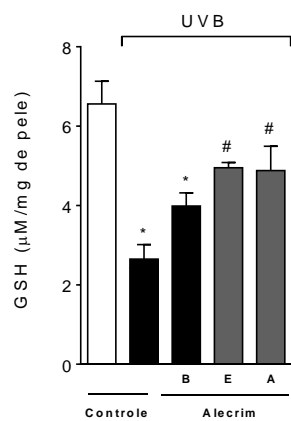
1381 Figura 10:

1382

1383

1384

A



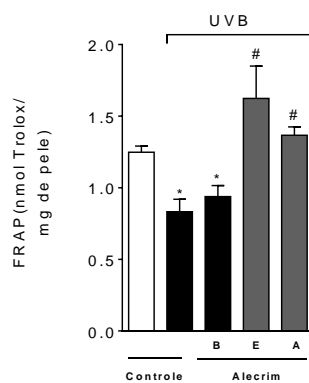
1385

1386

1387

1388

B

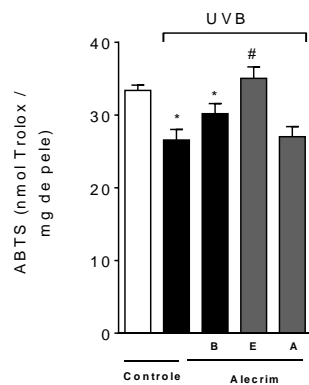


1389

1390

1391

C



1392

1393 ANEXO: GUIA PARA AUTORES – AAPS PHARMSCITECH

1394

1395

1396 INTRODUCTION

1397 *AAPS PharmSciTech* (ISSN 1530-9932) is a peer-reviewed online-only journal owned by the
1398 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). The journal's mission is to
1399 disseminate scientific and technical information on drug product design, development,
1400 evaluation, and processing to the global pharmaceutical research community. The journal is
1401 indexed by PubMed/Medline, Index Medicus, Institute of Scientific Information's Science
1402 Citation Index Expanded, and Chem Abstracts.

1403

1404 Editor-in-Chief Robert O. (Bill) Williams III, Ph.D., oversees an international editorial board of
1405 leading researchers in the pharmaceutical sciences. Williams is a professor of pharmacy at the
1406 University of Texas at Austin, College of Pharmacy.

1407

1408 TYPES OF MANUSCRIPTS

1409 *AAPS PharmSciTech* publishes the following article types. For examples of published articles,
1410 please visit www.PharmaGateway.net.

1411

1412 **Reviews**, usually by invitation and sometimes organized into theme issues, report on recent
1413 advances in pharmaceutical research. Unsolicited reviews are considered only if they are
1414 authored by investigators who have demonstrated expertise in the relevant areas.

1415

1416 **Mini-reviews** discuss a more narrowly focused topic of recent research. Unsolicited mini-
1417 reviews are considered only if they are authored by investigators who have demonstrated
1418 expertise in the relevant areas.

1419

1420 **Original research papers** contain innovative, hypothesis-driven research that is supported by
1421 sound experimental design, methodology, and data interpretation.

1422

1423 **Brief technical notes**, normally more limited in scope than original research papers, must be of
1424 high quality, general interest, and sufficient importance to warrant publication.

1425

1426 **Rapid communications** provide a venue for fast-breaking research updates or other news
1427 items. The justification for rapid communication should be stated in the cover letter during
1428 submission.

1429

1430 **Regulatory notes** provide a summary of regulatory decisions made and rationale for the
1431 regulatory decision made on a product. These notes are typically submitted by invitation only,
1432 but authors may propose notes to the editors.

1433

1434 **Editorials, commentaries, or summaries** are usually published by invitation only. These
1435 articles contain topical issues of public and scientific interest.

1436

1437 **Meeting reports** on AAPS or AAPS-affiliated meetings provide readers with summaries of such
 1438 meetings, including consensus views. When a meeting report purports to be a consensus report,
 1439 it may, at the editor-in-chief's discretion, adhere to the AAPS Guideline for Review of Opinions
 1440 and Summary Reports, available at www.aaps.org/guidelineopinions. The corresponding author
 1441 must complete and submit the Corresponding Author's Consent to Publish form
 1442 (www.aaps.org/consentcorr) and all contributing authors must complete and submit the
 1443 Contributing Author's Consent to Publish form (www.aaps.org/consentcont).
 1444

1445 **Meeting notices** provide readers with information on upcoming AAPS or AAPS-affiliated
 1446 meetings. They should include the title of the meeting, date, time, location, an outline,
 1447 description of meeting topics, and a list of invited speakers. If possible, meeting notices should
 1448 include contact information for the organizers and a URL to the meeting's webpage. Meeting
 1449 notices should be submitted to the AAPS Editorial Office 2–3 months prior to the meeting.
 1450

1451 **Letters to the editor** may be submitted by readers commenting on articles already published by
 1452 the journal.
 1453

1454 **White Papers** describe a current problem or issue and propose a solution. White papers written
 1455 on behalf of AAPS groups are subject to the AAPS Guideline for Review of Opinions and
 1456 Summary Reports (www.aaps.org/guidelineopinions) at the discretion of the editor-in-chief.
 1457 All articles published in the journal will follow the Springer Online First production workflow,
 1458 enabling publication on the SpringerLink website after receipt of author corrections to page
 1459 proofs.
 1460

1461 MANUSCRIPT SUBMISSION

1462 AAPS uses Editorial Manager as its peer review tracking system. Manuscripts must be submitted
 1463 online by the corresponding author at www.editorialmanager.com/aapspt. You may be required
 1464 to register as a new user with Editorial Manager upon your first visit. Straightforward sign in
 1465 and registration procedures can be found on the website. Editorial Manager allows authors to
 1466 track the progress of manuscript review in real time. Detailed, step-by-step instructions for
 1467 submitting manuscripts can be found on the website. All correspondence regarding your
 1468 manuscript must go through Editorial Manager.
 1469

1470 *SPECIAL FEATURES, APPENDICES, AND SUPPLEMENTARY MATERIAL*

1471 These materials can be accommodated and may contain highly interactive features or large
 1472 databases. All authors are encouraged to take full advantage of the Web-only capabilities of
 1473 online publishing, including 3-D, video, and interactive graphics. All special features must be
 1474 created by the author.
 1475

1476 Authors who wish to publish electronic supplementary material with their article (Excel files,
 1477 images, audio/video files, etc.) must submit the supplementary files/materials with their
 1478 manuscript submission via our online peer review tracking system, Editorial Manager. These
 1479 files may be submitted as one file or multiple files as desired by the authors. Accepted formats
 1480 for these files include DOC, DOCX, XLS, XLSX, JPG, PDF, and for videos, MPEG-3 format. If a
 1481 desired technical feature is in a different format or not covered in the author instructions, please
 1482 contact the AAPS Editorial Office (AAPSPT@aaps.org) for assistance. Note that supplementary
 1483 files are not automatically sent to production if the article is accepted. Please therefore note in a
 1484 cover letter if these materials should be evaluated by reviewers only (not published), or if the
 1485 supplemental files should be included for review and be published with the article should the
 1486 manuscript be accepted 3
 1487

1488 for publication. If the supplemental files are intended for publication, references using
1489 “supplemental 1,” “supplemental 2,” etc. should be placed in the appropriate location within the
1490 text of the manuscript body. Supplemental files are published as-is, with no copyediting or
1491 formatting by Production.

1492

1493 *HYPertext LINKS*

1494 Authors may identify URLs for websites that provide the reader with additional information on
1495 the topic addressed in the manuscript. Although URLs are an important feature of electronic
1496 publishing, authors are encouraged to be selective in their choice of sites to include. Do not
1497 include URLs for webpages with newspaper or journal articles that will be removed or archived
1498 to another web page. Links to pharmaceutical manufacturers or other sources of product
1499 information are acceptable; however, providing a URL to the reader should not be substituted
1500 for adequate discussion within the manuscript itself. Do not include links to sites that are not
1501 accessible without a password.

1502

1503 www.editorialmanager.com/aapspt

1504

1505 TERMS OF MANUSCRIPT CONSIDERATION

1506

1507 *AAPS JOURNALS ETHICS POLICY*

1508 The editors-in-chief of the three AAPS journals, *Pharmaceutical Research*, *The AAPS Journal*, and
1509 *AAPS PharmSciTech*, along with the AAPS Publications Committee, developed an integrated
1510 ethics policy to guide decision-making across the three journals. The document is based on the
1511 recommendations on publication ethics policies for medical journals published by the World
1512 Association of Medical Editors (WAME), posted at [www.wame.org/about/recommendations-on-](http://www.wame.org/about/recommendations-on-publication-ethics-policie)
1513 [publication-ethics-policie](http://www.wame.org/about/recommendations-on-publication-ethics-policie).

1514

1515 Authors are required to review and adhere to the AAPS Journals Ethics Policy
1516 (www.aaps.org/journalsethics) in full prior to submitting manuscripts to *AAPS PharmSciTech*.
1517 Excerpts from the policy are outlined below.

1518

1519 *FULL DISCLOSURE*

1520 During the manuscript submission process, all authors will be required to confirm that the
1521 manuscript has not been previously published in any language anywhere and that it is not under
1522 simultaneous consideration by another journal. The journal policy regarding compound
1523 disclosure centers on the data presented. If specific data relating to the study compound are
1524 reported, then the journal requires identification so that reviewers and readers can judge, based
1525 on general principles, whether the data are plausible and internally consistent, and to potentially
1526 allow future examination and/or validation of the results and conclusions reported. If however a
1527 library of compounds is used to generate correlations, such as in QSAR when the scope and
1528 diversity of the compounds are described, then it is possible that the specific chemical
1529 compositions of the compounds need not be identified, subject to the discretion of the reviewers
1530 and the editor.

1531

1532 *CONFLICTS OF INTEREST*

1533

1534 Authors will be required to declare all conflicts of interest (or their absence) during the
 1535 submission of a manuscript. This conflict declaration includes conflicts or potential conflicts of
 1536 all listed authors. If any conflicts are declared, AAPS will publish them with the paper. In cases of
 1537 doubt, the circumstance should be disclosed so that the editors may assess its significance.

1538
 1539 Conflicts may be financial, academic, commercial, political, or personal. Financial interests may
 1540 include employment, research funding (received or pending), stock or share ownership, patents,
 1541 payment for lectures or travel, consultancies, nonfinancial support, or any fiduciary interest in a
 1542 company.

1543
 1544 www.aaps.org/journalsethics
 1545

1546 *COPYRIGHT TRANSFER*

1547 The corresponding author, on behalf of all authors, must transfer copyright of the work to the
 1548 publisher (the American Association of Pharmaceutical Scientists) in order to provide for the
 1549 widest possible dissemination of professional and scientific literature. A signed Transfer of
 1550 Copyright form must be submitted online with the manuscript. The Transfer of Copyright form
 1551 for an accepted manuscript must be on file with the AAPS Editorial Office prior to production for
 1552 publication. Corresponding authors may print and sign or electronically sign the form on behalf
 1553 of all authors. The Transfer of Copyright form can be found at www.aaps.org/copyright.

1554 1555 *RESEARCH DATA POLICY*

1556 The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the
 1557 findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a
 1558 preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data
 1559 policy.

1560 List of Repositories

1561
 1562 Research Data Policy

1563
 1564
 1565 General repositories – for all types of research data – such as figshare and Dryad may also be
 1566 used.

1567
 1568 Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in
 1569 the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by
 1570 DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

1571
 1572 DataCite

1573
 1574 Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which
 1575 can be contacted at researchdata@springernature.com.

1576
 1577 This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data
 1578 repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and
 1579 does not advise on specific manuscripts.

1580
 1581 Helpdesk

1582

1583 **ETHICS IN ANIMAL AND CLINICAL INVESTIGATIONS**

1584

1585 *HUMAN SUBJECTS AND CLINICAL TRIALS*

1586 AAPS journals require author(s) at the time of manuscript submission to make a statement in
 1587 the cover letter indicating documented review and approval from a formally constituted review
 1588 board (Institutional Review Board or ethics committee) for all studies involving people, medical
 1589 records, and human tissues, per the uniform guidelines from the World Medical Association
 1590 (www.wma.net/en/30publications/10policies/index.html).

1591

1592 Studies and research using human subjects, medical records, and human tissues (including
 1593 educational research) must also state this compliance within the Methods section of the paper.

1594

1595 AAPS journals also require that controlled clinical trials must be registered in a publicly
 1596 available database or the journals will not publish the results of these trials. Manuscripts
 1597 submitted to the journals must include trial registration information in the cover letter. To
 1598 register a clinical trial, authors should go to the NIH registry (www.clinicaltrials.gov) or the
 1599 International Standard Randomized Controlled Trials database (<http://isrctn.org>). Further
 1600 information can be obtained from the International Committee of Medical Journal Editors
 1601 (ICMJE) at www.icmje.org/about-icmje/faqs/clinical-trials-registration.

1602

1603 *ANIMAL USE AND ASSURANCES*

1604 AAPS journals require author(s) at the time of manuscript submission to make a statement in
 1605 the cover letter indicating that animal experiments are conducted in full compliance with local,
 1606 national, ethical, and regulatory principles and local licensing regulations, per the spirit of
 1607 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)
 1608 International's expectations for animal care and use/ethics committees
 1609 (www.aaalac.org/education/module_1.cfm). Investigations using experimental animals
 1610 (including educational research) must also state this compliance within the Methods section of
 1611 the paper.

1612

1613 **ORIGINALITY OF MANUSCRIPTS**

1614 Authors of manuscripts submitted to AAPS are obliged to present accurate representation of the
 1615 research performed along with an objective discussion of the significance of their findings. The
 1616 author's submission should be original work that reflects research undertaken with integrity
 1617 and honesty, and that conforms to ethical practices outlined in the AAPS Journals Ethics Policy.
 1618 Authors should be willing to reply to any reasonable request from editors, referees, and
 1619 scientists for materials, methods, or data necessary for verification of the conclusions reported
 1620 in the paper.

1621

1622 *USE OF COPYRIGHTED TABLES AND FIGURES*

1623 It is the authors' responsibility to obtain permission of any tables/figures in compliance with the
 1624 AAPS Journals Transfer of Copyright Agreement and AAPS Electronic Journals Ethics Policy for
 1625 any copyrighted material used in an AAPS journal submission.

1626

1627 A copy of the granted permission to use copyrighted figures, tables, or other material must be
 1628 included with the submitted manuscript.

1629

1630 *PEER REVIEW*

1631

1632 All submissions will be reviewed anonymously by at least 2 independent reviewers. Authors are
 1633 encouraged to submit names and email addresses of expert reviewers, but selection remains the
 1634 prerogative of the editors. Authors should not recommend work colleagues or
 1635 coauthors/collaborators as expert reviewers for their own papers. Authors may include
 1636 supplementary notes to facilitate the review process. If an accepted paper is cited that has not
 1637 yet appeared in print and is required for evaluation of the submitted manuscript, authors should
 1638 provide an electronic version for use by the reviewers. Authors are responsible for all
 1639 statements in their work, including changes made by the copyeditor after a manuscript is
 1640 accepted.

1641
 1642 [www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-](http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-submission.html)
 1643 [submission.html](http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation/preparing-for-submission.html)

1644

1645 POINTS ON NOVELTY AND SIGNIFICANCE

1646 **Novelty**—Your results must be new and not resemble something formerly known or used. You
 1647 must clearly make the case that your paper presents novel results.

1648
 1649 **Significance**—Your paper must emphasize why anyone would care about your work and why
 1650 someone would want to read your work. You must make a compelling case in the Introduction
 1651 and Discussion sections of the significance of your work.

1652

1653 MANUSCRIPT ORGANIZATION

1654 Several components of the manuscript must be submitted as individual files within Editorial
 1655 Manager: cover letter, title page, manuscript body (including references list), individual
 1656 figure/table files, and the Transfer of Copyright.

1657

1658 *COVER LETTER*

1659 A cover letter is recommended, but not required. Please note, a cover letter is required for a
 1660 rapid communication submission.

1661

1662 Authors who wish to submit names and email addresses of recommended reviewers for the peer
 1663 review process may indicate those in the cover letter or during the submission process.

1664

1665 **TITLE PAGE*

1666 The title page must be submitted as a separate file and should include:

1667

- 1668 1. the title of the article,
- 1669 2. author names with full first name (no degrees),
- 1670 3. each author's affiliation, and
- 1671 4. a suggested running head (of less than 50 characters, including spaces).

1672

1673 The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city,
 1674 and state (or nation) and should be typed as a footnote to the author's name. For the
 1675 corresponding

1676

1677 author designated to correspond with the AAPS Editorial Office and review proofs, indicate
1678 his/her complete mailing address, office/cellular telephone number, fax number, and email
1679 address.

1680

1681 **TRANSFER OF COPYRIGHT*

1682 A signed copy of the Transfer of Copyright must be submitted online as part of the manuscript
1683 submission process. The Transfer of Copyright is available at:

1684

1685 www.aaps.org/copyright

1686

1687 *ABSTRACT*

1688 The abstract is limited to 250 words or less. For original research articles, the abstract should
1689 include a brief (2 to 3 sentence) statement for each of the following sections: Introduction,
1690 Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusion, written in paragraph form. All
1691 abstracts must be written in one paragraph, with no subheadings, equations, tables, reference
1692 citations, or graphics.

1693

1694 The abstract must state the significance of the paper and the problem or question being
1695 addressed in the first sentence; what you found (include key data numbers); and what you
1696 conclude. Tenses should not be mixed in the paper: use the past tense.

1697

1698 Only reviews, mini-reviews, original research articles, rapid communications, and meeting
1699 reports require an abstract.

1700

1701 AAPS journals do not publish graphical abstracts.

1702

1703 **KEYWORDS*

1704 Provide a list of no more than 5 key words.

1705

1706 **MANUSCRIPT BODY*

1707 For original research articles, brief technical notes, and rapid communications, organize the
1708 main text as follows:

1709

1710 1. Introduction

1711 2. Materials and Methods

1712 3. Results

1713 4. Discussion

1714 5. Conclusion

1715

1716 The use of subheadings to divide the text is encouraged. Primary, secondary, and tertiary level
1717 headings should be clearly defined; do not use numbers or letters in headings.

1718

1719 **Introduction**—The introduction must define the scope of your paper; articulate the question or
1720 hypothesis; summarize relevant work to the study being reported; and inform the reader of the
1721 rationale and significance of the study.

1722 Required for reviews, mini-reviews, original research articles, and meeting reports only.

1723

1724 **Materials and Methods**—Clearly define in detail how you conducted the study. Colleagues
 1725 reading your paper must be able to replicate your experiments and determine whether your
 1726 conclusions are warranted.

1727
 1728 **Results**—Report what you found. Supplement the text with tables and figures.
 1729

1730 **Discussion**—In this section, preferably separate from the Results section, explain what your
 1731 findings mean, using the literature in great detail to compare and contrast your data with
 1732 literature; use the literature as evidence to support your assertion. Explain the significance of
 1733 your results and their practical implications.

1734
 1735 Recommended maximum word counts are as follows:
 1736

1737 ☑ Reviews, original research articles, meeting reports, and white papers: 5,000

1738 ☑ Mini-reviews: 2,500

1739 ☑ Brief technical notes and rapid communications: 1,200

1740
 1741 **Conclusion**—Did your findings support your hypothesis? Explain.
 1742

1743 **Citations**—45–50 relevant citations
 1744

1745 **General Manuscript Body Guidelines**

1746
 1747 ☑ The submission must include continuous line numbers in the manuscript body file.

1748 ☑ Use abbreviations sparingly and define them at the first insertion in the text. Define all
 1749 abbreviations used in tables within the table footnotes.

1750 ☑ Use the metric system for all measurements. Express metric abbreviations in lowercase letters
 1751 without periods (cm, mL, sec).

1752 ☑ Define all symbols used in equations and formulas. When symbols are used extensively, the
 1753 authors may include a list of all symbols in a table.

1754 ☑ Numbers should be reported to reflect the precision of the instrumentation utilized. Calculated
 1755 numbers, such as means and standard deviations, should be expressed to no more than one
 1756 significant digit beyond the precision of the instrument. Normally, data reported to more than 3
 1757 significant figures should be justified. The precision of the variability (e.g., standard deviation)
 1758 should not exceed that of the reported mean value.

1759
 1760 *ACKNOWLEDGEMENTS*

1761 May be included in the manuscript body. Include funding source(s) and other contributions. If
 1762 the work has been funded by NIH, please provide name(s) of funding institute(s) and grant
 1763 number(s). This information is required for automatic deposit into PUBMED Central by the
 1764 publisher.

1765
 1766 *These elements are required for all submissions.

1767 1768 **REFERENCES**

1769 References should conform to Vancouver style and be numbered consecutively in the order in
 1770 which they are cited in the text. Cite in the text by the appropriate Arabic numeral enclosed in

1771

1772 parentheses, e.g., (1), (2-5), etc. You should typically use 45–50 relevant references, including
 1773 references from this journal, but you may use more if warranted.

1774

1775 Maximum reference limits are as follows:

1776

1777 ☑ Reviews, original research articles, meeting reports, and white papers: 100

1778 ☑ Mini-reviews: 40

1779 ☑ Brief technical notes and rapid communications: 20

1780

1781 References to unpublished, peer-reviewed, personal communications, including conference
 1782 abstracts and papers in preparation or in review, cannot be listed but can be notated
 1783 parenthetically in the text.

1784

1785 Abbreviations for journal names should conform to those of Vancouver style. The style and
 1786 punctuation of the references should conform to the following examples:

1787

1788 *EXAMPLES BY TYPE*

1789 1. **Journal article** Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234–5.

1790

1791 2. **Journal article with DOI (and with page numbers)** O'Mahony S, Rose SL, Chilvers AJ,
 1792 Ballinger JR, Solanki CK, Barber RW, et al. Finding an optimal method for imaging lymphatic
 1793 vessels of the upper limb. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31:555–63. doi:10.1007/s00259-
 1794 003-1399-3.

1795

1796 3. **Journal article by DOI (before issue publication with page numbers)** O'Mahony S, Rose
 1797 SL, Chilvers AJ, Ballinger JR, Solanki CK, Barber RW, et al. Finding an optimal method for imaging
 1798 lymphatic vessels of the upper limb. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004. doi:10.1007/s00259-
 1799 003-1399-3.

1800

1801 4. **Article in electronic journal by DOI (no paginated version)** Slifka MK, Whitton JL. Clinical
 1802 implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000.
 1803 doi:10.1007/s801090000086.

1804

1805 5. **Journal article in a supplement** Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia:
 1806 demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 59 Supple 1:26-32.

1807

1808 6. **Book chapter** Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In:
 1809 Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic;
 1810 1980. p. 251–306.

1811

1812 7. **OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)** Saito Y,
 1813 Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry
 1814 breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128_2006_108. 10

- 1815 8. **Book, authored** Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the
1816 management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.
1817
- 1818 9. **Online document** Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and
1819 their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document)
1820 document. Accessed 15 Jan 1999.
1821
- 1822 10. **Online database** Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998.
1823 <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.
1824
- 1825 11. **Supplementary material/private homepage** Doe J. Title of supplementary material. 2000.
1826 <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.
1827
- 1828 12. **University site** Doe, J.: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999).
1829
- 1830 13. **FTP site** Doe, J.: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999).
1831 Accessed 12 Nov 1999. Accessed 25 Dec 1999.
1832
- 1833 14. **Organization site** ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006).
1834 Accessed 20 Feb 2007.
1835
- 1836 For a full description of the Vancouver reference style, including numerous examples, please
1837 access:
1838
1839 www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

1840

1841 TABLES

1842 Tables must be created in Microsoft Word table format. Tables should be numbered (with
1843 Roman numerals) and referred to by number in the text. Center the title above the table and type
1844 explanatory footnotes (indicated by superscript lowercase letters) below the table. Data must be
1845 placed in separate cells of the table to prevent text and numbers from shifting when the table is
1846 converted for publication on the Internet. Empty cells may be inserted to create spacing. Tables
1847 should not duplicate information provided in the text. Instead, tables should be used to provide
1848 additional information that illustrates or expands on a specific point the author wishes to make.
1849 Each table should be self-explanatory.

1850

1851 FIGURES

1852 *AAPS PharmSciTech* offers authors the use of color figures in online published manuscripts, free
1853 of charge. Figures (as well as photographs, drawings, diagrams, and charts) are to be numbered
1854 in 11
1855

1856 sequential Arabic numerals. The description of each figure should be separated from the
 1857 manuscript body text and collated in a separate file called "Legend to Figures." All electronic
 1858 artwork must be submitted online via our online peer review tracking system, Editorial
 1859 Manager. Figure files should be submitted in TIFF or EPS format (1200 dpi for line drawings and
 1860 300 dpi for half-tones and gray-scale art); however, JPG, GIF, BMP, and PDF files may also be
 1861 submitted as long as the dpi specifications above are met. Use of a professional graphics
 1862 program such as Adobe Photoshop to edit and/or save photographs and graphics is highly
 1863 recommended. Because of quality issues, it is not recommended that images be submitted in
 1864 DOC, DOCX, PPT, or PPTX format.

1865

1866 Maximum combined count for tables and figures are as follows:

1867

1868 ☑ Reviews, original research articles, meeting reports, and white papers: 10 (suggested)

1869 ☑ Mini-reviews: 6

1870 ☑ Brief technical notes and rapid communications: 6

1871

1872 FOOTNOTES

1873 **FOOTNOTES IN THE MANUSCRIPT BODY SHOULD BE AVOIDED. WHEN**
 1874 **THEIR USE IS ABSOLUTELY NECESSARY, FOOTNOTES SHOULD BE**
 1875 **NUMBERED CONSECUTIVELY USING ARABIC NUMERALS AND SHOULD**
 1876 **BE TYPED AT THE BOTTOM OF THE PAGE TO WHICH THEY REFER.**
 1877 **PLACE A LINE ABOVE THE FOOTNOTE, SO THAT IT IS SET OFF FROM**
 1878 **THE TEXT. USE THE APPROPRIATE SUPERSCRIT NUMERAL FOR**
 1879 **CITATION IN THE TEXT. DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH**
 1880 **LANGUAGE SUPPORT?**

1881 For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need
 1882 to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with
 1883 writing in English you should consider:

1884

1885 ☑ Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

1886 ☑ Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in
 1887 English.

1888 ☑ Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure
 1889 that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services
 1890 are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

1891 ○ English language tutorial

1892 ○ Nature Research Editing Service

1893 ○ American Journal Experts

1894

1895 Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this

1896

- 1897 journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or
1898 accepted.
1899 If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style
1900 before publication.