



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTINA DE PAULA BARROS DE MELO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *CORDIA*
VERBENACEA NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

CRISTINA DE PAULA BARROS DE MELO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *CORDIA*
VERBENACEA NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM
CAMUNDONGOS SEM PELO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rúbia
Casagrande

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra R.
Georgetti

Londrina
2019

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

de Melo, Cristina de Paula Barros.

Avaliação do efeito do extrato de *Cordia verbenacea* na inflamação e no estresse oxidativo induzidos por radiação UVB em camundongos sem pelo / Cristina de Paula Barros de Melo. - Londrina, 2019.

159 f. : il.

Orientador: Rubia Casagrande.

Coorientador: Sandra Regina Georgetti.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Inclui bibliografia.

1. antioxidantes - Tese. 2. compostos fenólicos - Tese. 3. ácido rosmarínico - Tese. 4. flavonóides - Tese. I. Casagrande, Rubia. II. Georgetti, Sandra Regina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CRISTINA DE PAULA BARROS DE MELO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *CORDIA VERBENACEA*
NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR
RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Micheli Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Josiane Alessandra Vignoli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de julho de 2019.

Jairton, Ana Luiza e Filipe,
i carry your heart with me (i carry it in my heart)
i am never without it (anywhere i go you go, my dear; and
whatever is done by only me is your doing, my darling)
i fear no fate (for you are my fate, my sweet)
i want no world (for beautiful you are my world, my true)
and it's you are whatever a moon has always meant
and whatever a sun will always sing is you
here is the deepest secret nobody knows (here is the root of the
root and the bud of the bud and the sky of the sky of a tree
called life; which grows higher than soul can hope or mind can
hide)
and this is the wonder that's keeping the stars apart
i carry your heart (i carry it in my heart)

E. E. Cummings

AGRADECIMENTOS

A Deus, detentor de todo conhecimento e de toda a sabedoria, pelo seu amor e por me permitir o privilégio de estudar e conhecer um pouco de sua criação.

Aos meus queridos pais, Arnaldo e Helena, que com amor ainda olham e se alegram por mim.

Ao Jairton, meu amado companheiro de jornada, por me desafiar e por estar sempre ao meu lado para ajudar a enfrentar os desafios.

A minha orientadora Prof. Dra. Rubia Casagrande, pela oportunidade, apoio, direção, companheirismo, profissionalismo e pelos bons momentos compartilhados.

A Prof. Dra. Sandra Georgetti, minha co-orientadora e idealizadora desse projeto pela oportunidade, confiança, pela orientação e pelo estímulo.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri Jr. por oferecer seu tempo e orientações que tanto colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e a Profa. Dra. Maria Emília Fávero por todo suporte no laboratório de pós-graduação (LPG) do Centro de Ciências da Saúde.

Aos membros da banca Prof. Dra. Josiane Alessandra Vignoli, Prof. Dra. Marcela Maria Baracat, Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa e Prof. Dra. Renata Micheli Martinez, pela participação atenciosa e pelas preciosas colaborações

Aos meus queridos colegas do grupo de pesquisa Priscila, Camilla, Ingrid, David, Claudia, Talita, Clóvis e Marília que participaram desse projeto em diferentes etapas, e que contribuíram com suas ideias, inspiração, encorajamento e principalmente dedicando trabalho e tempo. Obrigada de coração!

Aos alunos da iniciação científica especialmente Paulo Cunha, Julia Bezerra e Gabriela Amaral cuja colaboração nas coletas e na realização dos testes foi preciosa.

À minha amiga, colega de trabalho e coordenadora Prof. Dra. Fabiane Yuri Yamacita Borin, por todo o apoio e incentivo desde o início desse projeto.

Aos colegas do laboratório de Inflamação, Neuropatia, Dor e Câncer do departamento de Patologia da UEL (o Lab): Vitor, Ana Carolina, Thiago,

Stephanie e Nayara pelas contribuições na realização dos testes. Um agradecimento especial à Larissa pela grande ajuda com o tratamento dos animais e ela orientação na realização de testes. E a todos os colegas do Lab que contribuíram para que o ambiente de trabalho fosse tão acolhedor. Muito obrigada!

Aos colegas do LPG Carine, Kamilla, Keiko, Laura, Luciana e Pauli. Muito obrigada pela colaboração, ideias, suporte e companheirismo!

À Denise, técnica do LPG pela colaboração, apoio, pelo cafezinho que chegava na hora certa e pelo encorajamento. Muito obrigada também pela ajuda com o tratamento dos animais.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-graduação pela orientação e serviços.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma se envolveram com a realização desse trabalho os meus sinceros agradecimentos.

MELO, Cristina de Paula Barros. **Avaliação do extrato de *Cordia verbenacea* na inflamação e no estresse oxidativo induzidos por radiação UVB em camundongos sem pelo.** 2019. 158 f. (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

A exposição a altas doses de radiação UVB solar provoca na pele inflamação e estresse oxidativo, podendo levar ao dano e à morte celular. O controle do processo inflamatório, a inibição da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a recuperação das defesas antioxidantes naturais do organismo são passos importantes para o controle dos danos induzidos na pele pela radiação UVB. *Cordia verbenacea* é uma planta medicinal brasileira cujo uso popular como anti-inflamatória e antioxidante já vem sendo estudado e validado em vários modelos de doenças. No entanto, existe uma carência de estudos experimentais investigando os efeitos desta planta em modelos de danos cutâneos causados por radiação solar. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial do extrato etanólico de folhas de *Cordia verbenacea* (ECV) em controlar os danos causados pela inflamação e pelo estresse oxidativo induzidos por radiação UVB. A capacidade antioxidante do ECV *in vitro* foi avaliada por vários métodos, tendo o extrato demonstrado atividade sequestradora de radicais livres, quelante e inibidora da peroxidação lipídica (LPO) com os seguintes resultados: para 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) apresentou IC50 19,128 µg/ml; para 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)(ABTS) apresentou IC50 12,48 µg/mL; para inibição da produção de hidroperóxidos derivados do ácido linoleico apresentou IC50 10,20 µg/mL; para inibição de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentou IC50 8,90 µg/mL e para capacidade de quelação do ferro avaliada pelo ensaio da batofenantrolina apresentou IC50 47,35 µg/mL. O extrato também inibiu a quimiluminescência gerada por radicais livres apresentando IC50 0,286 µg/mL para o método H2O2/Horseradish peroxidase (HRP)/luminol e IC50 0,42 µg/mL para o método xantina/xantina oxidase/luminol. Para os ensaios *in vivo* camundongos sem pelo foram tratados oralmente (ECV 10, 30 ou 100 mg/kg, 30 minutos antes e imediatamente após a irradiação UVB) e tópicamente (0,5 g de ECV 5% em creme Polawax®, 12 h, 6 h e imediatamente antes do começo da irradiação e 30 minutos depois). A administração, de ECV a camundongos sem pelo expostos a radiação UVB diminuiu o edema (tópicamente e oralmente 30 e 100 mg/kg), a infiltração de neutrófilos (tópicamente e oralmente 10, 30 e 100 mg/kg) e de mastócitos (tópicamente e oralmente 30 mg/kg), inibiu a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 (tópicamente e oralmente 30 mg/kg), a hiperplasia epidérmica (tópicamente e oralmente 30 mg/kg), e o aparecimento de queratinócitos apoptóticos (tópicamente e oralmente 30 mg/kg), controlou a produção de MMP-9 (tópicamente e oralmente 10, 30 e 100 mg/kg) e a consequente degradação do colágeno (tópicamente e oralmente 30 mg/kg) e, no caso do tratamento tópicamente, inibiu a expressão da COX-2. Com relação ao controle do estresse oxidativo, o ECV oral (30 mg/kg) aumentou a expressão dos genes ligados a resposta antioxidante fator nuclear eritróide-2 (Nrf-2), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO-1) e heme-oxigenase 1 (HO-1) e preveniu a formação de peróxidos lipídicos. Tanto no tratamento oral (30 mg/kg) como no tópicamente, os resultados mostraram que o ECV foi capaz de aumentar o GSH e a atividade da catalase, inibir a formação de ânion superóxido e aumentar a capacidade de neutralização de radicais livres pela pele, após a exposição a radiação UVB. Concluindo, os resultados desse estudo sugerem que o ECV pode ser considerado uma boa estratégia para controlar a inflamação e o estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB e, dessa forma, reduzir os danos causados pela exposição solar à pele.

Palavras-chave: Antioxidante. *In vitro*. *In vivo*. Ácido rosmarínico. Flavonoides. Compostos fenólicos.

MELO, Cristina de Paula Barros. **Evaluation the effect of *Cordia verbenacea* extract in UVB-induced inflammation and oxidative stress in hairless mice.** 2019. 158 p. Thesis (Doctorate's degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Parana.

ABSTRACT

Skin exposure to high doses of UVB radiation from the sun leads to inflammation, oxidative stress, and ultimately, to cell damage, death and cancer. The control of the inflammatory response, the inhibition of reactive oxygen species (ROS), and the recovery of natural antioxidants are promising steps to prevent UVB radiation-induced skin damage. *Cordia verbenacea* is a Brazilian medicinal plant used in popular medicine as anti-inflammatory and antioxidant and studied using various experimental disease models. However, there is a lack of studies into the inhibitory effects of the plant on UVB radiation-induced skin damage. This work aims to evaluate ethanolic *Cordia verbenacea* leaves extract (CVE) potential to prevent cell damage induced by UVB radiation. The extract was evaluated for its *in vitro* antioxidant capacity by various methods and showed scavenging, chelating and lipoperoxidation (LPO) inhibition capacity with the following results: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with IC₅₀ 19.128 µg/ml; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) with IC₅₀ 12.48 µg/mL; inhibition of hydroperoxides from linoleic acid with IC₅₀ of 10.20 µg/mL; inhibition of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) with IC₅₀ 8.90 µg/mL; and iron chelating ability measured by bathophenanthroline iron assay with IC₅₀ 47,35 µg/mL. CVE was also able to inhibit chemiluminescence triggered by free radicals with IC₅₀ 0,286 µg/mL for the H₂O₂/hoseradish peroxidase (HRP)/luminol method and IC₅₀ 0,42 µg/mL for xanthine/xanthine oxidase/luminol method. For *in vivo* assays, hairless mice were treated orally (CVE 10, 30 and 100 mg/kg, 30 minutes before and immediately after UVB irradiation) and topically (0,5 g of 5% CVE in Polawax® emulsion, 12 h, 6 h, immediately before beginning UVB exposure and 30 minutes after). CVE treatment was effective to control edema (topical and oral 30 and 100 mg/kg), neutrophil infiltration (topical and oral 30 and 100 mg/kg) and mast cells infiltration (topical and oral 30 mg/kg), inhibit excessive pro-inflammatory TNF-α, IL-1β, and IL-6 cytokine production (topical and oral 30 mg/kg), inhibit epidermal thickening (topical and oral 30 mg/kg) and epidermal apoptotic keratinocytes (topical and oral 30 mg/kg), control collagen degradation (topical and oral 30 mg/kg) by overproduction of MMP-9 (topical and oral 10, 30 and 100 mg/kg), and, in the case of the topical treatment, inhibit the expression of COX-2. Furthermore, oral CVE (30 mg/kg) could protect the natural antioxidant defenses of the skin by increasing the expression of the antioxidant response element (ARE) linked genes like nuclear factor erythroid 2 (Nrf-2), quinone oxidoreductase 1 NAD(P)H quinona oxido-redutase 1 (NQO-1) e heme oxygenase 1 (HO-1); and prevented lipid peroxidation. Results from both oral (30 mg/kg) and topical treatments showed that CVE was able to recover GSH and catalase activity, inhibit superoxide anion production, and enhance ROS scavenging capacity of the skin. In conclusion, results from this study suggest that CVE can be considered a suitable strategy to control UVB-induced inflammation and oxidative stress and thus reduce sunlight damage to the skin.

Keywords: Antioxidant. In vitro. In vivo. Rosmarinic acid. Flavonoids. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Cordia verbenacea</i> DC	29
Figura 2 – Estrutura química das principais classes de flavonoides	32
Figura 3 – Ácido rosmarinico: derivado da esterificação do ácido cafeico e do ácido diidroxifenil-lático	34
Figura 4 – Esquema geral dos protocolos experimentais para avaliação da eficácia de ECV administrado via oral.....	45
Figura 5 – Esquema geral dos protocolos experimentais para avaliação da eficácia de ECV administrado via tópica	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes da formulação contendo ECV	48
Tabela 2 – Constituintes dos géis de poliacrilamida para zimografia.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína-1
APS	Persulfato de amônio
ARE	Elemento de resposta antioxidante
BPX	Batofenantrolina
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ECV	Extrato de folhas de <i>Cordia verbenacea</i> em etanol:água (70:30)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HO-1	Hemeoxigenase-1
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IL	Interleucina
JAK	Tirosinas quinases
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Peroxidação lipídica
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF-Kb	Fator nuclear kappa B

NO•	Radical óxido nítrico
NOX 2	NADPH oxidase 2
NQO-1	NAD(P)H: quinona desidrogenase oxido-redutase 1
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₃	Ozônio
•OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloro acético
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina Tris Hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	PELE	17
1.2	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	18
1.3	RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO	19
1.4	INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	23
1.5	EVENTOS MOLECULARES LIGADOS À INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO UV	25
1.6	FOTOQUIMIOPROTEÇÃO POR AGENTES BOTÂNICOS	27
1.7	CORDIA VERBENACEA	28
1.7.1	Compostos fenólicos	31
1.7.1.2	Flavonoides	32
1.7.1.3	Ácido rosmarínico.....	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	MATERIAL	36
3.1.1	Materiais de consumo	36
3.1.2	Materiais permanentes	36
3.1.3	Material vegetal	37
3.2	MÉTODOS	37
3.2.1	Obtenção do extrato etanólico de folhas de <i>C. verbenacea</i> (ECV)	37
3.2.2	Determinação do teor de sólidos ou resíduo seco	37
3.2.3	Determinação do teor de polifenóis e flavonoides totais por método colorimétrico	38
3.2.4	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	38
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> de ECV.....	38
3.2.5.1	<i>Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH*</i>	38

3.2.5.2	<i>Determinação da atividade doadora de elétrons ao radical ABTS+</i>	39
3.2.5.3	<i>Determinação do poder antioxidante baseado na capacidade de redução do ferro (FRAP)</i>	40
3.2.5.4	<i>Determinação da atividade queladora do Fe²⁺ pela batofenantrolina</i>	40
3.2.5.5	<i>Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica (LPO) induzida por Fe²⁺</i>	41
3.2.5.6	<i>Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe²⁺</i>	41
3.2.5.7	<i>Determinação da atividade inibidora antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina-oxidase</i>	42
3.2.5.8	<i>Determinação da atividade inibidora antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema H₂O₂/luminol/HRP (horse radish peroxidase)</i>	43
3.2.6	<i>Avaliação da eficácia in vivo do extrato de C. verbenacea oral ou tópica na redução do estresse oxidativo e inflamação cutânea induzidos pela radiação UVB</i>	43
3.2.6.1	<i>Animais experimentais</i>	43
3.2.6.2	<i>Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de lesões cutâneas pela radiação UVB</i>	44
3.2.6.3	<i>Medida da irradiância da lâmpada</i>	44
3.2.6.4	<i>Protocolo experimental de avaliação da eficácia de ECV administrada por via oral</i>	45
3.2.6.5	<i>Protocolo experimental de avaliação da eficácia de ECV administrada por via tópica</i>	46
3.2.6.5.1	<i>Preparo da formulação tópica</i>	47
3.2.6.6	<i>Avaliação de parâmetros inflamatórios cutâneos</i>	48
3.2.6.6.1	<i>Avaliação do edema cutâneo</i>	48
3.2.6.6.2	<i>Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	48
3.2.6.6.3	<i>Determinação da atividade da (MMP-9)</i>	49
3.2.6.6.4	<i>Dosagem de citocinas pró-inflamatórias</i>	50
3.2.6.7	<i>Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo cutâneo</i>	51

3.2.6.7.1	<i>Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)</i>	51
3.2.6.7.2	<i>Avaliação da produção de ânion superóxido</i>	51
3.2.6.7.3	<i>Determinação da atividade da catalase (CAT)</i>	51
3.2.6.7.4	<i>Avaliação do poder antioxidante da pele por meio dos ensaios de ABTS e FRAP</i>	52
3.2.6.7.5	<i>Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica (LPO)</i>	53
3.2.6.7.6	<i>Expressão de RNAm para Nrf2, NQO-1, HO-1 e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa</i>	53
3.2.6.7.7	<i>Avaliação histopatológica por microscopia ótica</i>	54
3.2.7	Análise estatística de resultados	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS	55
4.1	<i>Cordia verbenacea</i> extract inhibits inflammation and oxidative stress induced by UVB irradiation in hairless mice	55
4.2	Efficacy of topical formulations containing <i>Cordia verbenacea</i> extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice	106
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
6	REFERÊNCIAS	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, um órgão altamente metabólico e o único que se encontra exposto diretamente ao meio ambiente. Ela representa a primeira linha de defesa do organismo contra estresses ambientais como patógenos, agentes químicos diversos e radiação UV (Xu, Fisher, 2005). Como envoltório do organismo, a pele também regula a troca de água com o meio ambiente e atua no controle da temperatura do corpo. O órgão apresenta estrutura estratificada em três camadas sendo a epiderme a camada mais externa que está em contato direto com o meio ambiente; a derme a camada de sustentação intermediária e a hipoderme ou tecido subcutâneo a camada mais profunda (Brownlow et al., 2015; Natarajan et al., 2014; Pérez-Sánchez et al., 2018).

A epiderme é um tecido estratificado, em constante renovação e intenso metabolismo. Ela apresenta espessura que varia de 0,05 mm em áreas como as pálpebras até 1,5 mm em áreas como a sola dos pés e as palmas das mãos. Os queratinócitos compõem 95% das células da epiderme, mas nela também estão presentes outros tipos celulares como as células de Langherans, responsáveis pela resposta imunológica; as células de Merkel responsáveis por captação de estímulos sensoriais e os melanócitos, células responsáveis pela proteção da pele contra a radiação ultravioleta através da produção do pigmento melanina. A camada basal, que é camada mais interna da epiderme, é formada por células tronco que sofrem divisão e diferenciação programada enquanto migram para a superfície, onde chegam como queratinócitos anucleados e preenchidos por citoqueratinas. Essas células conhecidas como corneócitos, são fortemente conectadas e formam a barreira mais externa da epiderme, a camada córnea. (Proksch et al., 2008; Shimizu, 2017). Os queratinócitos também produzem citocinas pró-inflamatórias e expressam moléculas imunorreativas de superfície como antígenos MHC classe II e moléculas de adesão (Garmin, Yroshi, 2007)

A derme, que compreende a maior porção da pele, localiza-se abaixo da epiderme e é formada de tecido conectivo fibroso, filamentoso e amorfo. Esse tecido é constituído por fibras de colágeno, que conferem resistência à derme; elastina, que é responsável pela elasticidade do tecido e por uma matriz composta por polissacarídeos. Os fibroblastos são as células majoritariamente presentes na derme, mas nela também podem ser encontradas células imunológicas como macrófagos, mastócitos, linfócitos e células dendríticas. Na derme também podem ser encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas, além dos anexos como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos, fatores que tem papel importante na manutenção da temperatura e das funções sensoriais

da pele. Além disso, a hidrofiliçidade das moléculas da matriz dérmica contribui com a manutenção do equilíbrio hídrico da pele. O colágeno compõe 70% do peso da derme. É produzido pelos fibroblastos e organizado em feixes de fibrilas, sendo que sua resistência mecânica depende do tipo de colágeno, bem como da espessura de seus feixes. As fibras de colágeno se encontram em constante renovação, sendo degradadas por enzimas do tipo proteinases, as metaloproteinases, e substituídas por fibras novas. Além do colágeno, a derme também apresenta fibras de elastina, uma proteína que se caracteriza pela elasticidade, sendo encontrada em abundância na face e outras estruturas elásticas como as artérias e tendões (D’Orazio et al., 2013; Kolarsick et al., 2011; Shimizu, 2017).

A hipoderme é constituída por uma camada de gordura subcutânea que funciona como estoque de energia e barreira mecânica. Além disso, a hipoderme também é constituída por tecido conectivo e tem por finalidade manter a adesão da derme aos músculos e ossos (Shimizu, 2017).

1.2 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Por sua capacidade de fornecer energia, a radiação solar é vital para o desenvolvimento e a manutenção da vida na terra. Os benefícios da exposição cuidadosa da pele ao sol são conhecidos; dentre eles, a contribuição fundamental da radiação solar para a produção de vitamina D, que atua no desenvolvimento e manutenção da integridade dos ossos (D’Orazio et al., 2013; Natarajan et al., 2014); a influência sobre o ciclo circadiano, que é controlado pelo hormônio melatonina, um hormônio indutor de sono que tem a sua produção reduzida em presença da luz solar e o estímulo à produção da β -endorfina, um peptídeo opioide endógeno que promove sensação de bem-estar, relaxamento, alívio da dor e da depressão (Holick, 2016).

Embora a luz do sol apresente benefícios à saúde humana, a exposição aguda e exacerbada à radiação solar induz uma série de mudanças patológicas na pele de mamíferos que são amplamente descritos como: eritema, edema, hiperplasia epidérmica, queimaduras solares, inflamação, foto envelhecimento, imunossupressão e carcinogênese. (Dupont et al., 2013; Hassan et al., 2015; Martinez et al., 2015b; Pérez-Sánchez et al., 2018)

O espectro UV pode ser classificado em três grupos, de acordo com as faixas de comprimento de onda: UVC (200 – 290 nm); UVB (290 – 320 nm) e UVA (320 – 400 nm) (Holick, 2016; Svobodova et al., 2006). A camada de ozônio absorve UV nos comprimentos de onda de 200 a 310 nm, com um pico de absorção em 250 nm. As faixas retidas pela camada de ozônio compreendem, dessa forma a totalidade da radiação UVC, mais energética e danosa das três e grande parte da radiação UVB, embora variações da camada de ozônio, quer sejam naturais ou causadas pelo homem, alterem diretamente a

quantidade de radiação que atinge a superfície terrestre. A faixa UVA, menos energética das três, não é absorvida pela camada de ozônio e alcança a superfície quase sem sofrer atenuação, compreendendo dessa forma cerca de 95% da radiação ultravioleta que atinge a crosta terrestre (Grujil, Leun, 2000; Rozema et al., 2002).

Embora a radiação UVB seja, entre as faixas de radiação UV, a que atinge a superfície terrestre em menor proporção, ela é também a mais energética a alcançar a pele e, por causa disso, é capaz de promover uma forte resposta inflamatória aguda que se manifesta com eritema, edema, infiltração de neutrófilos e de outras células responsáveis pela produção de citocinas e de metaloproteinases (Dupont et al., 2013; Natarajan et al., 2014). Ao contrário da radiação UVA, que alcança as camadas mais profundas da derme, a faixa UVB é menos penetrante e atinge principalmente os queratinócitos da camada basal da epiderme e, eventualmente, as estruturas e células da derme superior, incluindo células endoteliais e fibroblastos (Rhodes, Lim, 2007). Nas células ao seu alcance, a radiação UVB causa dano mutagênico direto ao DNA, uma vez que promove a formação de dímeros de ciclobutano-piridina e também de foto-produtos mutagênicos, podendo levar ao desenvolvimento de células cancerosas (Marrot, Meunier, 2008). Além disso, intensifica diretamente ou por meio da produção de radicais livres, várias vias de transdução de sinais que levam ao aumento de expressão de genes que contribuem para o surgimento de células tumorais e também atua comprovadamente na diminuição da eficiência do sistema imune e na indução de tolerância a antígenos (Ichihashi et al.; 2003; Natarajan et al., 2014; Svobodova et al., 2006).

1.3 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO

Radicais livres podem ser definidos como espécies químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou molecular, o que lhes confere alta reatividade (Halliwell, Gutteridge, 1999). Espécies reativas derivadas de oxigênio (as chamadas EROs) e espécies reativas derivadas de nitrogênio (as chamadas ERNs) são produzidas fisiologicamente pela respiração ou por células mediadoras da função imune, nas quais exercem o papel de ativadores de sinalização celular em repostas a agressões (Valko et al., 2007). A exposição à radiação UV, tanto UVA como UVB intensifica a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais promovem dano indireto ao DNA, peroxidação lipídica, degradação de proteínas e a depleção de antioxidantes naturais, o que diminui a capacidade de autoproteção das células contra esses radicais livres (Guaratini et al., 2007; Wei et al., 2002). Essa produção exacerbada de EROs associada ao esgotamento

do sistema antioxidante é conhecido como estresse oxidativo (Fonseca et al., 2010; Poprac et al., 2017; Svobodova et al., 2006; Xu and Fisher, 2005).

EROs são consideradas as mais importantes espécies reativas em sistemas biológicos (Valko et al., 2007). Dentre elas destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o radical óxido nítrico ($NO\cdot$), o radical peroxil (RO_2) e algumas espécies reativas não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete (1O_2), que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados tem potencial para sofrer reações gerando radicais livres (Halliwell, 2009).

A série de reações fotoquímicas causadas pela radiação UVB na pele inicia-se quando fótons altamente energéticos são absorvidos por cromóforos como o ácido urocânico, aminoácidos aromáticos, RNA, melanina e, o mais importante, o DNA (Pinnell, 2003). Essas moléculas têm capacidade de absorver a radiação, passando para um estado mais energético, transitório e instável. Para retornar ao estado inicial mais estável, os cromóforos transferem a energia absorvida para moléculas de oxigênio na sua vizinhança, resultando assim na geração de EROs (Chen et al., 2012; Xu, Fisher, 2005)

As células têm um sistema robusto para lidar com grande parte do dano oxidativo. A integridade celular é mantida por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GRx) (Shindo et al., 1994). SOD catalisa a quebra do ânion superóxido em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enquanto a catalase e glutathione peroxidase convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, completando assim a tarefa da SOD. (Lephart, 2016). Ácido ascórbico, ácido úrico, glutathione reduzida (GSH), ubiquinol-10 e α -tocoferol são algumas das moléculas do sistema antioxidante não enzimático que atuam como neutralizadores de radicais livres, por meio de doação de elétrons ou de transferência de hidrogênio (Shindo et al., 1994).

As moléculas do sistema antioxidante endógeno se encontram mais concentrados na epiderme do que na derme. Sendo assim, a epiderme pode ser considerada a primeira linha de defesa antioxidante do organismo. Dentre os antioxidantes presentes na epiderme apresenta grande importância a glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo hidrofílico que possui grupamentos sulfidríla que reagem prontamente com radicais livres. (Meloni et al., 2003). Tanto a forma reduzida (GSH) como a forma oxidada (GSSH) são encontradas abundantemente nos queratinócitos e o seu estado de oxidação foi escolhido como um indicador precoce e sensível de estresse oxidativo da epiderme (Casagrande et al., 2006b; Huber et al., 2008; Meloni et al., 2003). Estudos demonstraram que a exposição à radiação UVB causa depleção dose-dependente dos níveis de GSH cutâneos (Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Ivan et al., 2014). Essa depleção é considerada o primeiro passo na instalação do estresse oxidativo e pode ocorrer tanto em função da ação direta do

GSH como neutralizante de radicais livres, como por esgotamento do sistema de detoxificação celular protagonizado pela enzima GPx do qual GSH atua como um cofator (Carini et al., 2000). Como antioxidante direto, o grupamento sulfidrílica do GSH permite a neutralização de radicais livres por transferência de hidrogênios (Carini et al., 2000). De forma indireta, a GPx utiliza GSH para catalisar a redução de EROs, produzindo assim GSSH, o qual por sua vez é reduzido para a regeneração do GSH pela glutathione redutase (GR) (Halliwell, 2009).

A enzima catalase é um antioxidante endógeno que se encontra em concentração elevada na epiderme e que catalisa a conversão de H_2O_2 em oxigênio e água. Vários trabalhos demonstram a redução da atividade da catalase após a exposição à radiação UVB (Georgetti et al., 2013; Mantena, Katiyar, 2006; Martinez et al., 2015b, 2017b), o que representa um grande potencial de geração de dano a macromoléculas celulares, uma vez que o radical $\cdot OH$, gerado pelo excesso de H_2O_2 é um poderoso oxidante com potencial de produzir dano a todas as quatro bases do DNA (Halliwell, 2009).

Devido à sua capacidade de iniciar uma via de transdução de sinais, levando a ativação de fatores de transcrição e aumento da expressão gênica, o estresse oxidativo produz uma multiplicidade de respostas. Essa via de sinalização, que é iniciada pela ativação de um receptor induzido por radiação UV, é chamada de resposta UV e tem como objetivo final a modulação da expressão de genes relacionados com a resposta ao estresse oxidativo o chamado elemento de resposta antioxidante (ERA) ou elemento de resposta eletrofílica (Garmyn, Yarosh, 2007). O fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um fator de transcrição que ativa genes relacionados a ERA e a via Nrf2-Era é crítica na regulação do estado de oxi-redução intracelular estando também envolvida nas respostas imune e inflamatória (Zhang et al., 2005). Os genes alvo dessa via codificam uma série de proteínas citoprotetoras como a NAD(P)H quinona oxireductase (NQO-1), glutathione peroxidase, γ glutamil-cisteína sintase, uma enzima fundamental para a biossíntese de GSH (Kobayashi, Yamamoto, 2005) e a heme-oxigenase (HO-1), enzima que cataboliza o grupamento heme a monóxido de carbono (CO) e biliverdina, catabólitos que apresentam ação anti-inflamatória. Além disso a heme-oxigenase também libera Fe^{2+} do centro da molécula heme, induzindo assim a expressão rápida da ferritina, uma proteína sequestradora de Fe^{2+} . Esse último foi identificado como mecanismo através do qual HO-1 confere resistência ao estresse oxidativo a células endoteliais (Choi et al., 2013). Já foi demonstrado que as enzimas desintoxicantes catalase e superóxido dismutase-1 se encontram reduzidas em camundongos Nrf2 knockout sugerindo que essas enzimas também são alvo do Nrf2 (Braun et al., 2002). Também foi demonstrado que a inibição de Nrf2 aumenta a expressão de fatores de transcrição inflamatórios, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Mao et al., 2010), a indução de mediadores inflamatórios como

interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), o número de queratinócitos apoptóticos (células sunburn) (Saw et al., 2011) e a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9) (Saw et al., 2014)

Dentre as macromoléculas que são alvo da ação de EROs estão os fosfolipídios que compõem as membranas celulares. A peroxidação lipídica (LPO) é iniciada quando $\cdot\text{OH}$ retira um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado, que reage com o oxigênio molecular levando a formação da radical peroxil. Esse radical por sua vez, se não for neutralizado rapidamente, tende a reagir com outros ácidos graxos insaturados, em uma cadeia de formação de radicais livres que leva a desorganização da membrana celular, podendo gerar a morte da célula (Chen et al., 2012).

Espécies reativas de oxigênio induzidas pela radiação UV também estão associadas com as fases de iniciação, promoção e progressão de câncer de pele. EROs promovem vários tipos de dano ao DNA, como por exemplo mutações de transição de bases durante a replicação do DNA (ex. guanina por 8-oxoguanina) e modificações do proto-oncogene ras ou do supressor de tumor p53. Além disso, uma grande variedade de respostas imunológicas e inflamatórias geradas durante o estresse oxidativo parecem ter papel importante na carcinogênese gerada por EROs (Nishigori et al., 2004).

Os fotoprodutos de oxidação que promovem dano ao DNA ou a outros cromóforos sinalizam uma cadeia complexa de reações que levam o queratinócito a dois tipos de resposta: o reparo do DNA, quando esse é possível, ou a morte celular induzida, quando o dano é irreparável. Nesse contexto surgem as células *sunburn*, queratinócitos de DNA condensado, núcleo picnótico e citoplasma encolhido, que resultam da ativação da via apoptótica das caspases. A grande importância da formação dessas células está em limitar a sobrevivência de células irreparavelmente mutadas ou danificadas, as quais apresentam potencial carcinogênico (Laethem et al., 2005; Van Laethem, Agostinis, 2009). A presença de células sunburn indica que a lesão causada pela radiação UVB se encontra em estágio avançado (Afaq et al., 2005).

1.4 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A primeira e mais característica resposta da pele ao ser exposta a doses elevadas de radiação ultravioleta é a queimadura solar. Eritema e mudanças histológicas como o espessamento da epiderme, edema e infiltração perivascular são sinais que indicam inflamação induzida por UVB (Balupillai et al., 2015; Pérez-Sánchez et al., 2018)

Queratinócitos são o primeiro alvo da radiação UV. Eles representam um papel importante na resposta inflamatória da pele, sendo responsáveis pela liberação de vários mediadores inflamatórios (Fernando et al., 2016; Reuter et al., 2011). A liberação de

citocinas induzida pela radiação UVB é essencial para o recrutamento de células inflamatórias na pele, as quais estimulam a proliferação dos queratinócitos levando a hiperplasia da epiderme (Hassan et al., 2015)

No início do processo inflamatório, além dos queratinócitos, células do sistema imunológico também são ativadas e passam a produzir grandes quantidades de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (Ahmed et al.; 2017; Reuter et al.; 2011; Rhodes, Lim, 2007). Esses mediadores recrutam células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (Halliday, 2005). Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo e são potentes produtores de EROs, como parte do seu mecanismo de luta contra microrganismos (Witko-Sarsat et al., 2000). Nesse processo, O_2^- é produzido a partir do oxigênio molecular pela ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), em seguida O_2^- é convertido em H_2O_2 , pela ação da enzima superóxido-dismutase (SOD) (Chen et al., 2012; D'Orazio et al., 2013; Halliday, 2005).

A partir de H_2O_2 , a enzima mieloperoxidase (MPO), que se encontra estocada em grandes quantidades nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (Pulli et al., 2013), catalisa a formação de espécies intermediárias de oxigênio, dentre elas o ácido hipocloroso (HOCl) um potente agente citotóxico conhecido por oxidar cadeias laterais de aminoácidos. (Aratani, 2018; Wang et al., 2015). Na ausência de um processo infeccioso, como é o caso da inflamação induzida por exposição ao UVB, a presença de neutrófilos representa uma fonte adicional de EROs que tende a contribuir para intensificação do dano tecidual e da inflamação (Clydesdale et al., 2001). A enzima MPO também está relacionada com processos não implicados na defesa do hospedeiro, como é o caso dos subprodutos carcinogênicos que resultam da interação de EROs com outros substratos (Witko-Sarsat et al., 2000).

A radiação UV é reconhecidamente um potente indutor de produção de citocinas. Diversos trabalhos mostram que a radiação UVB induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 4h após a exposição UVB (Martinez et al., 2018, 2016b, 2015b; Vicentini et al., 2011). A IL-1 β e TNF- α participam da indução de EROs, os quais, por sua vez, induzem a produção de mais citocinas. Entende-se que esse ciclo de EROs e citocinas tende a retroalimentar a produção recíproca, perpetuando assim o processo inflamatório (Fuchs et al., 2001).

As citocinas exercem papéis importantes nos vários estágios da inflamação induzida por UVB. TNF- α e IL-1 β são particularmente ligadas a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B, que é um importante indutor nuclear da expressão de genes relacionados à reação inflamatória. IL-8 e TNF- α são importantes na indução de moléculas de adesão endoteliais e a quimiotaxia de leucócitos dos vasos para a derme (Ahmed et al., 2017; Na, Ryu, 2018; Reuter et al., 2011). Além disso, TNF- α pode ser associado à

angiogênese e, tanto TNF- α como IL-6 estão envolvidos na proliferação celular e resposta anti-apoptótica (Lin et al., 2007). Contrastante com essa ideia, células T expostas a radiação UV podem produzir citocinas inflamatórias que induzem apoptose. Dessa forma, citocinas podem estar associadas tanto com proliferação como com a morte celular (Yoshizumi et al., 2008).

Neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, queratinócitos e células endoteliais podem produzir metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas endopeptidases proteolíticas dependentes de zinco que atuam na matriz extracelular (MEC) (Svobodova et al., 2006). As MMPs são secretadas em vários processos fisiológicos como proliferação, diferenciação e migração celular, e também patológicos como a angiogênese, apoptose e a metástase tumoral (Ahmed et al., 2017). Por estimular a produção de EROs e de mediadores inflamatórios, a radiação UV induz o aumento da expressão de MMPs, sendo que o estímulo da radiação UVB leva mais especificamente à indução de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (Svobodova et al., 2006), as quais tem sido associadas com a intensificação do processo inflamatório, com o desenvolvimento do câncer e com o envelhecimento cutâneo (John, Tuszynski, 2001; Rijken, Bruijnzeel-Koomen, 2011). A MMP-9 é responsável pela degradação do colágeno IV e de fibras elásticas (Jenkins, 2002).

A estimulação dos queratinócitos pela radiação UV também leva a um aumento da produção de prostaglandinas E2 (PGE2) na pele. Esse aumento se deve a vários fatores, dentre os quais: a peroxidação lipídica promovida pelo aumento de EROs, a ativação da enzima fofolipase A2 com aumento da produção de ácido araquidônico e a indução pela RUV da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) (Afaq et al., 2005; Wilgus et al., 2003). O aumento dos níveis de PGE2 na pele contribuem para a manutenção e aumento do processo inflamatório, incluindo eritema, dor, edema e infiltração de leucócitos (Wilgus et al., 2000).

1.5 EVENTOS MOLECULARES LIGADOS A INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR UV.

Através de mecanismos como o estresse oxidativo e a resposta inflamatória de queratinócitos e leucócitos, a exposição à radiação UV promove a indução de várias vias de sinalização coordenadas, que levam aos eventos observados na resposta inflamatória e antioxidante. Os receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR) e receptores de citocinas, como por exemplo o receptor de interleucina-1 (IL-1), são alguns dos primeiros a serem ativados. Essa ativação acontece por meio de citocinas e de fatores de crescimento, mas também pode ocorrer por ação direta da energia proveniente da radiação UV, independente da presença de um ligante (Rhodes, Lim, 2007; Xu, Fisher, 2005). A ativação desses receptores dá início a cascatas de sinalização, como a da via das proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK quinases) (Fuchs et al., 2001) e a da via de ativação do NF- κ B.

As MAPKs são proteínas quinases que contém resíduos de serina e treonina e que, ao serem fosforiladas, iniciam sinais intracelulares associados a uma variedade de atividades da célula, dentre elas a proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação celulares. Em mamíferos são conhecidas três vias de transdução relacionadas a MAPK, são elas: a quinase reguladora de sinal extracelular (ERK 1/2), que é predominantemente ativada por sinais mitogênicos, estimulando a proliferação e diferenciação celular; a via p38 e a via da proteína quinase ativada por estresse ou quinase c-JUN amino terminal (JNK). Enquanto a ativação de ERK estimula a proliferação e diferenciação, a fosforilação de JNK e p38 está relacionada com a resposta inflamatória, sendo ativadas por citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina IL-1 β , ou em resposta a estresses celulares como o estresse oxidativo (Duan et al., 2019; Kim, Choi, 2010; Mantena, Katiyar, 2006; Zaganjor, Cobb, 2011).

Cada via de sinalização MAPK consiste em três componentes que promovem a fosforilação um do outro, sendo ativados em cascata. O objetivo final dessa cascata é a fosforilação de alvos intracelulares, incluindo fatores de transcrição como a proteína ativadora 1 (AP-1) (Cooper, Bowden, 2007).

Dentre as famílias de fatores de transcrição nucleares ativadas por MAPKs, a proteína ativadora AP-1 é constituída por um heterodímeros de proteínas codificadas por genes *jun* e *fos* e de homodímeros de proteínas codificadas por genes *jun*. A ativação de proteínas da família AP-1 está ligada a expressão de grande número de genes que comandam o a sobrevivência e o metabolismo celular. A atividade de transcrição de AP-1 depende de fatores como a fosforilação de c-Jun e a expressão de c-fos. Estudos demonstram que a exposição de vários tipos celulares a radiação UVB promove fosforilação de c-Jun e expressiva indução de c-fos levando a um aumento da atividade de AP-1 (Afaq et al., 2005; Cooper, Bowden, 2007).

O aumento da expressão de genes ligados a produção de metaloproteinases, especificamente MMP-1, MMP-3, MMP-8 e MMP-9 em vários tipos celulares é um dos vários efeitos da ativação dos fatores de transcrição AP-1. O aumento dessas proteases está relacionado com processos de inflamação e envelhecimento celular e pode ocorrer por ação direta do UVB ou por meio de estresse oxidativo e do aumento da produção de citocinas induzidos por UVB (Chen et al., 2012; Duan et al., 2019; Xu and Fisher, 2005).

Os complexos NF- κ B/Rel contém tanto homo quanto heterodímeros de proteínas pertencentes às famílias componentes de NF- κ B e Rel. Pertencem à família Rel as proteínas RelA/p65 c-Rel e RelB e enquanto a família NF- κ B é composta das proteínas p50 (após processamento da p105 ou NF- κ B1) e p52 (após processamento da p100 ou NF- κ B2)

(Karin, Greten, 2005). A sequência homóloga denominada Rel (RHD), que é comum aos membros da família NF- κ B/Rel, atua na interação com I κ B, na dimerização do complexo e na ligação ao DNA (Baldwin Jr., 1996). Em condições de latência, o NF- κ B se encontra no citoplasma como complexo inativo, no qual as proteínas p65 e p50 estão ligadas a uma proteína inibitória da família I κ B, o que torna a sequência Rel inacessível e mantém o NF- κ B no citoplasma. Sinais ativadores internos ou externos promovem a fosforilação das proteínas I κ B com subsequente ubiquitinação e degradação nos proteossomos. Dessa forma o domínio Rel se torna liberado e NF- κ B migra rapidamente para o núcleo onde promove a transcrição de vários genes ligados ao processo inflamatório (Cooper, Bowden, 2007; Karin, Greten, 2005; Lawrence, 2009)

O NF- κ B é um importante regulador da resposta imune presente na maior parte das células. Funciona como um sensor citoplasmático que responde a ameaças imunológicas e a uma grande diversidade de fatores endógenos e exógenos, estresses químicos ou físicos como por exemplo a radiação UV e o estresse oxidativo (Hayden, Ghosh, 2008; Karin, Greten, 2005). Na inflamação e estresse oxidativo induzidos por radiação UVB, alguns dos principais agentes indutores da fosforilação do I κ B são o oxigênio singlete, os lipoperóxidos, IL-1 β e TNF- α (Fuchs et al., 2001). Na reação inflamatória induzida por UV, NF- κ B está associado ao aumento da expressão de genes para produção de óxido nítrico sintase, óxido nítrico, prostaglandinas, ciclooxigenase-2 (COX-2) e também de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (Ahmed et al., 2017; Na,Ryu, 2018; Reuter et al., 2011).

Tanto AP-1 como NF- κ B estão implicados na instalação do processo de carcinogênese. Enquanto AP-1 está ligada a promoção e progressão tumoral, NF- κ B está mais ligado a iniciação, desenvolvimento e promoção do câncer de pele (Vicentini et al., 2011).

1.6 FOTOQUIMIOPREVENÇÃO POR PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

Como já descrito anteriormente, a exposição da pele à radiação UV, especialmente radiação UVB apresenta uma variedade de efeitos danosos a saúde humana. Dentre esses eventos, a possibilidade do aparecimento de câncer de células escamosas e basais, bem como do melanoma, são as maiores preocupações. Apesar de bastante difundidas, medidas de prevenção ao dano causado pela radiação UV, como uso de roupas de proteção e a aplicação de filtros e bloqueadores solares, ainda não tem demonstrado completa eficácia em diminuir a incidência de câncer de pele (Cooper, Bowden, 2007).

Dentre as estratégias para prevenir o aumento da incidência da doença está a fotoquimioprevenção, que é definida como o uso de agentes capazes de reverter os efeitos adversos da radiação UV na pele e tem sido apreciada como um modo viável de reduzir a ocorrência de câncer de pele (Afaq et al., 2005).

Nesse sentido, muitos agentes botânicos que já tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e antioxidantes apresentam potencial de serem utilizados como agentes fotoquimiopreventivos relacionados ao câncer e a outras condições patológicas associadas ao estresse oxidativo e a inflamação induzidas pela radiação UV (Afaq, Mukhtar, 2006; Mantena, Katiyar, 2006).

A administração oral de extrato hidroetanólico (50:50) de *Calendula officinalis* L. e tópica de formulação contendo extrato etanólico de *Pimenta pseudocaryophyllus* controlaram vários fatores ligados a inflamação e ao estresse oxidativo em camundongos expostos a irradiação UVB (Campanini et al., 2013; Fonseca et al., 2010). A epigalocatequina do chá verde (*Camélia sinensis*) demonstrou ser capaz de reduzir a produção de EROs induzida pela radiação UV (Katiyar, Mukhtar, 2001) e de prevenir a depleção de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase, catalase e GSH na pele de camundongos irradiados com radiação UVB (Vayalil et al., 2003). Da mesma forma, muitas outras substâncias de origem natural como quercetina (Casagrande et al., 2006b), naringenina, trans-chalcona, hesperidina metil-chalcona (Martinez et al., 2015b; 2015a; 2017) ácido cafeico e ácido ferúlico (Balupillai et al., 2015) tem demonstrado comprovada eficácia na proteção contra danos oxidativos na pele.

Corroborando com os achados listados anteriormente e considerando a necessidade de suplementação da pele com antioxidantes exógenos na prevenção dos danos causados pela radiação UV e a riqueza da flora brasileira em substâncias com potencial terapêutico, pode-se afirmar que, a exploração de extratos obtidos de plantas brasileiras, para a obtenção de novos e melhores produtos, destinados a proteger a pele contra os danos causados pela radiação UV, seria uma abordagem promissora.

1.7 CORDIA VERBENACEA

A *Cordia verbenacea* é uma planta da família Boraginaceae também conhecida pelos nomes botânicos de *Cordia salicina* DC, *Varronia curassavica* Jacq. *Cordia curassavica* Jacq. e pelos nomes populares de erva-baleeira, baleeira, camarinha, erva-balieira, erva-preta, maria-milagrosa, maria-preta, salicinia, catinga-preta, maria rezadeira e camaramoneira-do-brejo (Lorenzi e Matos, 2002).

A família Boraginaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas por todo o globo, estando concentradas em áreas tropicais e compreende um

grupo de plantas de grande importância para farmacologia e cosmetologia (Akisue et al, 1983). Dentre os constituintes químicos mais comumente isolados de plantas dessa família estão os fenóis, flavonoides, terpenóides e naptóquinonas, os quais apresentam ação antimicrobiana, anti-tumoral, anti-viral, anti-inflamatória, cardiotônica, contraceptiva e antiplaquetária (Dresler et al., 2017)

A *C. verbenacea* se apresenta como um arbusto de altura entre 1,5 e 2,5 m, muito ramificado, ereto e aromático, com hastes cobertas por uma casca fibrosa, que apresenta folhas simples, alternadas, coriáceas e aromáticas. As flores são pequenas, brancas e dispostas em inflorescências racemosas de 10 a 15 cm de comprimento (Figura 1) (Lorenzi, Matos, 2002). Em estudo histoquímico foram identificados dois tipos de tricomas glandulares de folhas que caracterizam histologicamente a identidade da *C. verbenacea* (Ventrella, Marinho, 2008).

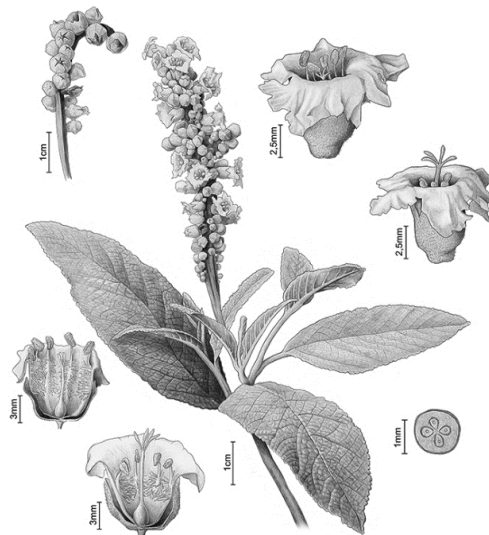


Figura 1 – *Cordia verbenacea* DC (sin. *Varronia curassavica* Jacq) (Boraginaceae) (Hoeltgebaum et al., 2018).

No Brasil a planta se distribui nas regiões de restingas da Mata Atlântica em quase todo o litoral brasileiro, especialmente nas regiões sudeste e sul, entre os estados de São Paulo e Santa Catarina e na áreas baixas da Amazônia (Bayeux et al., 2002; Gilbert, Favoreto, 2013).

O extrato bruto das partes aéreas da *C. verbenacea* é tradicionalmente usado por indígenas brasileiros para o tratamento tópico de processos inflamatórios. Suas folhas aromáticas também são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-ulcerogênicas e analgésicas na forma de extratos hidro-alcoólicos, decoctos e infusos para o tratamento da artrite, reumatismos e problemas de coluna (Lorenzi, Matos, 2002; Souza et al, 2004; Silva Jr et al, 1995). Em função de sua ampla

utilização popular, a composição fitoquímica da planta tem sido pesquisada por algum tempo e essas pesquisas levaram ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico de uso tópico, o Acheflan[®], desenvolvido e produzido por Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A e baseado na ação anti-inflamatória e analgésica do óleo essencial da planta, tendo como marcador o α -humuleno (Dutra et al., 2016). Além disso, a planta faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (Brasil - Ministério da Saúde, 2009).

Em 1982 foram isolados dois triterpenos do extrato cetônico de folhas de *C. verbenacea*, denominados então de Cordialina A e B (Velde et al., 1982). Em 1988, Sertié et al. investigaram o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas da planta contra o edema induzido por carragenina, o granuloma induzido pela introdução subcutânea de pellet de algodão e a permeabilidade vascular induzida pela histamina. Nos ensaios citados, o extrato demonstrou atividade anti-inflamatória significativa e similar à do anti-inflamatório não esteroide (AINE) fenilbutazona nos três parâmetros testados, com baixa toxicidade. Dessa forma, pela primeira vez, no caso da *C. verbenacea*, a pesquisa ratificou o uso popular da planta como anti-inflamatória e anti-reumática de uso oral (Sertié et al., 1988). Mais tarde, em 1990, foi isolada do extrato cetônico das folhas um flavonoide denominado artemitina, que também demonstrou efeito anti-inflamatório semelhante ao do extrato, sobre os mesmos parâmetros testados no ensaio de Sertié et al. (1988) e também com baixa toxicidade (Sertié et al., 1990). Em 1991, o extrato hidro-etanólico 70% de folhas de *C. verbenacea* foi testado por via oral em modelos de edema de pata induzido por nistatina em ratos e comparado a um outro AINE, o naproxeno. O extrato apresentou efeito anti-inflamatório similar ao naproxeno, porém, em um modelo de indução de lesão gástrica, as doses anti-inflamatórias do extrato apresentaram também um efeito protetor da mucosa gástrica reduzindo significativamente o número de lesões (Sertié et al., 1991). O mesmo extrato se mostrou eficaz na prevenção de edema de pata induzido por miconazol, apresentando efeito similar ou superior a nimesulida, um outro AINE, e a dexametasona, um corticosteróide. Nessa mesma ocasião, por meio de um protocolo de toxicidade fetal, o extrato se mostrou não teratogênico, uma vez que não provocou nenhuma alteração de formação ou de desenvolvimento de fetos (Sertié et al., 2005). Em um estudo sobre atividade antiulcerogênica, a administração do extrato etanólico das folhas de *C. verbenacea* em ratos foi efetivo na prevenção de lesões gástricas induzidas por administração oral de etanol/HCl e etanol. No mesmo trabalho, o extrato apresentou atividade antioxidante frente a peroxidação lipídica. Dessa forma, a atividade antiulcerogênica foi correlacionada a atividade antioxidante do extrato (Roldão et al., 2008).

Além dos extratos hidro-etanólicos, o óleo essencial extraído das folhas também foi amplamente estudado. Estudos pré-clínicos iniciais demonstraram a capacidade do óleo,

administrado por via oral, em reduzir a formação de edema induzido por agentes como carragenina, veneno de abelhas, substância P, histamina e fator agregador de plaquetas (Passos et al., 2007). Dois compostos sesquiterpênicos isolados do óleo essencial, α -humuleno e trans-cariofileno, administrados oralmente, produziram redução da formação de edema, da migração leucocitária, da ativação de citocinas, das MAPquinases e do NF- κ B no mesmo modelo em patas de ratos (Medeiros et al., 2007).

O composto fenólico ácido rosmarínico foi isolado pela primeira vez do extrato de *C. verbenacea* por Ticli et al. (2005), que também demonstrou que ratos tratados com o extrato metanólico ou com o ácido rosmarínico isolado apresentaram significativa redução do edema de pata induzido pelo veneno da cobra *Bothrops jararacussu* ou suas PLA₂ homólogas. Em 2010 foi demonstrado que o ácido rosmarínico se constituía no principal componente fitoquímico do extrato metanólico de outra planta do gênero, a *C. americana* (Geller et al., 2010) e mais tarde também foi identificado como o principal componente fitoquímico do extrato hidro-etanólico 70% de folhas de *C. verbenacea*, (Matos et al., 2015). Além do ácido rosmarínico, o extrato clorofórmico também demonstrou a presença de vários outros compostos fenólicos como os ácidos gálico, clorogênico e cafeico, os flavonóides rutina e quercetina (Matias et al., 2013).

Michielin et al. (2011) estudaram a atividade antioxidante de extratos de folhas da planta produzidos por diferentes métodos e utilizando solventes de polaridades diversas. Os resultados mostraram que os melhores valores de atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e inibição do radical superóxido correspondem a extratos obtidos por Soxhlet, usando água e etanol a 25% e 50% em água e ao extrato obtido por maceração com acetato de etila. A melhor atividade inibitória da peroxidação lipídica correspondeu ao extrato obtido por Soxhlet usando acetato de etila como solvente. Esses resultados demonstram a presença de substâncias antioxidantes em solventes mais polares (Michielin et al., 2011). O extrato etanólico 95% de folhas obtido por maceração também demonstrou intensa atividade antioxidante pelo método DPPH, particularmente a fração acetato de etila desse extrato, que apresentou atividade superior ao padrão de quercetina. Essa fração também apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonóides avaliados por métodos espectrofotométricos (Santi et al., 2013).

1.7.1 Compostos fenólicos

Os fenólicos compreendem cerca de 8000 substâncias de ocorrência natural em plantas. Esses compostos se caracterizam pela presença de um anel aromático no qual pelo menos um dos substituintes é uma hidroxila. Compostos fenólicos que tipicamente apresentam ação antioxidante são os ácidos fenólicos (gálico, cafeico, rosmarínico), fenóis diterpênicos (carnosol e ácido carnosínico), flavonóides (quercetina, rutina, artemitina,

hidroxi-artemítina, catequina) e monoterpenos componentes de óleos voláteis (eugenol, cavacrol, timol e mentol) (Brewer, 2011; Svobodová et al., 2003). Destacam-se na composição do extrato hidroetanólico de *C. verbenacea* os ácidos fenólicos e, dentre esses o ácido rosmarínico e seus precursores, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidrofênil-lático e os flavonoides.

1.7.1.1 Flavonóides

Os flavonoides consistem em um grupo grande de substâncias polifenólicas de baixo peso molecular, derivados das fenilbenzopironas e formados por um sistema de dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por um anel pirano oxigenado (anel C). Apresentam uma grande variedade de estruturas e, de acordo com a oxidação do anel C, a hidroxilação do núcleo e os substituintes do carbono 3, os flavonoides podem ser categorizados em subclasses: flavona, isoflavona, flavanol (catequina), flavonol, flavanona, antocianina e protoantocianidina (Figura 2) (Leopoldini et al., 2011; Svobodová et al., 2003).

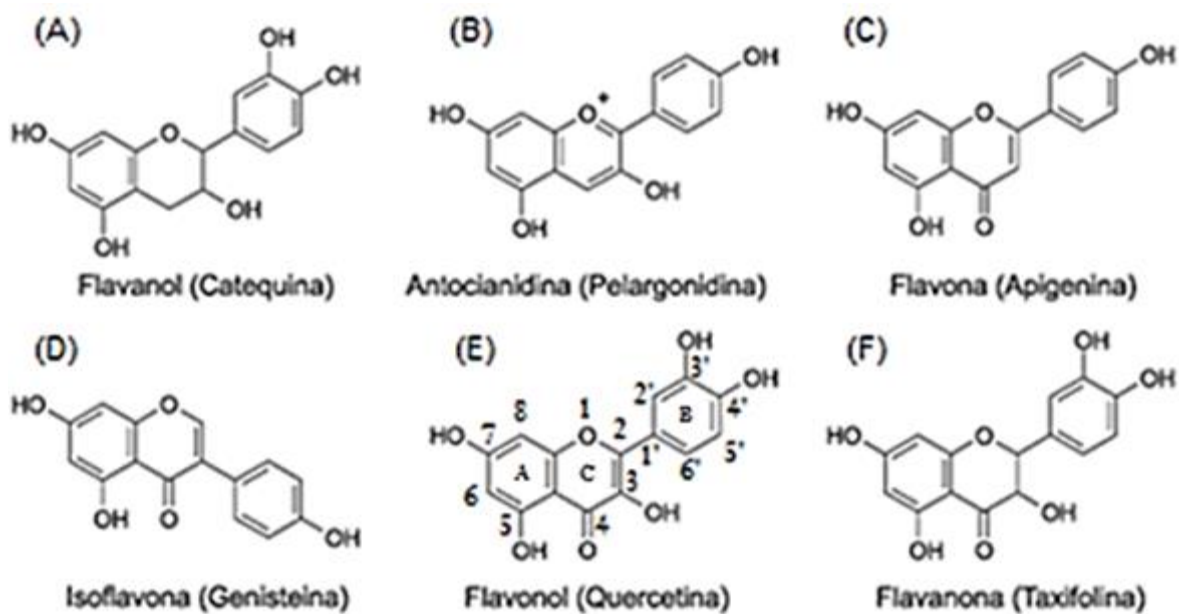


Figura 2 – Estrutura química das principais classes de flavonoides com destaque para as características estruturais que favorecem a atividade antioxidante no exemplo da quercetina (E): a presença de insaturação na posição C2 – C3 em conjunção com a função 4-oxo do anel C, a estrutura catecol ou orto-3,4-dihidroxi no anel B, a presença de grupos hidroxila nas posições C3 e C5.

O potencial de neutralização de radicais livres dos flavonoides está ligado às características estruturais da molécula. As características que favorecem a atividade antioxidante são: a presença de insaturação na posição C2 – C3 em conjunção com a função 4-oxo do anel C, a estrutura catecol ou orto-3,4-dihidroxi no anel B, a presença de grupos hidroxila nas posições C3 e C5, que são apresentadas no exemplo da quercetina (Figura 2E) (Brewer, 2011; Rice-Evans et al., 1997). Essas características favorecem a doação de hidrogênios que permite ao flavonoide sofrer uma reação redox que auxilia na captura dos radicais livres. Os anéis aromáticos heterocíclicos conjugados a insaturações ajudam a relocar a distribuição de elétrons após a oxidação, estabilizando a molécula.

Os flavonoides exercem seus efeitos antioxidantes de diversas formas: atuam como sequestradores de radicais livres (Casagrande et al., 2006b; Georgetti et al., 2003; Martinez et al., 2015b; van Acker et al., 1996), como quelantes de metais (Casagrande et al., 2006b), como inibidores de enzimas oxidases (Campanini et al., 2013); ativam Nrf-2 e estimulam a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e dessa forma atuam como reguladores das defesas antioxidantes naturais (Brewer, 2011; Heim et al., 2002; van Acker et al., 1996).

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides também tem sido intensamente estudada. Um dos mecanismos mais importantes propostos é a inibição das MAP quinases como ERK, p38 e/ou JNK e da sinalização do NF- κ B com consequentemente redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e as enzimas MPO e MMP-9 (Campanini et al., 2013; Duan et al., 2019; Schroeter et al., 2002; Vicentini et al., 2011). Flavonoides também apresentam mecanismo anti-inflamatório baseado na redução da produção de prostaglandinas e leucotrienos por inibição da fosfolipase A2 (PLA2), ciclo-oxygenase (COX) e lipo-oxygenase (LOX) (Ribeiro et al., 2014; Yin et al., 2013)

1.7.1.2 Ácido rosmarínico

O composto natural ácido rosmarínico é um éster derivado do ácido cafeico e do ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)lático que apresenta ampla distribuição no reino vegetal, particularmente entre as plantas da família Boraginaceae como a *C. verbenacea* (Matias et al., 2013; Matos et al., 2015; Ticli et al., 2005) sendo encontrado abundantemente em plantas medicinais e bastante reconhecido por suas muitas propriedades biológicas e farmacológicas (Amoah et al., 2016; Petersen, Simmonds, 2003).

O ácido rosmarínico apresenta várias atividades biológicas de interesse terapêutico, dentre elas ação antioxidante, anti-inflamatória, adstringente, antibacteriana, antiviral e antimutagênica (Petersen, Simmonds, 2003). Muitas dessas propriedades e consequentes aplicações terapêuticas estão ligadas à atividade antioxidante da molécula, bem como à sua capacidade de interferir em vias de sinalização e na expressão gênica de mediadores envolvidos no metabolismo celular e no processo inflamatório (Amoah et al., 2016; Colica et al., 2018). A atividade anti-inflamatória do ácido rosmarínico tem sido atribuída à sua capacidade de inibir a fosfolipase A2 (Dos Santos et al., 2011; Ticli et al., 2005) e a COX-2 (Kelm et al., 2000), bem como à sua capacidade de se ligar a C3 e interferir na cascata do complemento (Englberger et al., 1988), de inibir a produção de citocinas, inclusive induzidas por EROs (Gamaro et al., 2011; Lembo et al., 2014), de neutralização de EROs, de inibir a sinalização do NF- κ B e os mediadores de inflamação ativados por essa via (Moon et al.,

2010) e de ativar o Nrf-2 com aumento da expressão de seus genes alvo (HO-1, SOD, CAT), estimulando assim as defesas antioxidantes (Hahn et al., 2017).

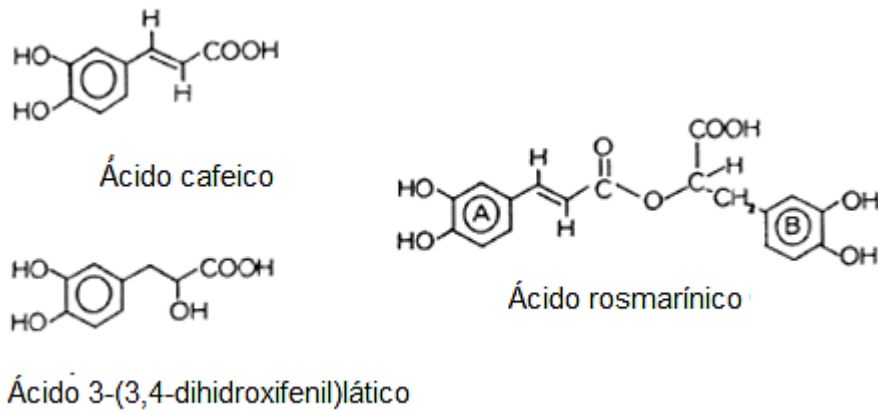


Figura 3 – Ácido rosmarínico: derivado da esterificação do ácido cafeico e do ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)lático.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico de *C. verbenacea* (erva baleeira), bem como os efeitos fotoquimiopreventivos do extrato *in vivo* por via oral e tópica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de flavonóides e polifenóis totais do extrato hidroetanólico de *C. verbenacea*;
- Identificar o ácido rosmarínico no extrato etanólico de *C. verbenacea* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato por diferentes métodos *in vitro*;
- Avaliar a eficácia *in vivo* do extrato de *C. verbenacea*, oral e em formulação de uso tópico na redução do estresse oxidativo e inflamação cutânea induzidos pela radiação UVB com enfoque em:
 - Redução do edema de pele;
 - Redução do infiltrado leucocitário (ensaio da mieloperoxidase);
 - Redução da atividade/secreção de metaloproteinases-9;
 - Redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e 1L-6)
 - Manutenção dos níveis do antioxidante endógeno GSH;
 - Inibição da produção de peróxidos lipídicos
 - Produção de ânion superóxido e atividade de catalase;
 - Avaliação do poder antioxidante da pele por meio dos ensaios de ABTS (2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (Poder antioxidante de redução férrica);
 - Expressão de RNAm Nrf2, NqO-1, OH-1 e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa.
 - Avaliação histológica da pele para determinar:
 - Espessura e número de queratinócitos apoptóticos na epiderme
 - Número de mastócitos na derme
 - Densidade das fibras de colágeno da derme

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Materiais de consumo

2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ), acetonitrila, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), ácido linoléico, ácido fosfórico, ácido tiobarbitúrico (TBA), bisacrilamida, brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB), corante azul brilhante, fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila, glutationa reduzida (GSH), n-etilmaleimida, *nitroblue tetrazolium* (NBT) *o*-dianisidina, reagente de Folin-Ciocalteu e Trolox® foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), batofenantrolina (BPS), terc-butil hidroperóxido da Acros (Pittsburgh, PA, USA). Hidroximetil aminometano (Tris) e xilene cianol e da Amresco (Solon, OH, USA). Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem das citocinas da eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), enzima transcriptase reversa (Superscript® III), Oligo (dT)12-18 primers, Platinum SYBRGreen® e primers da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Os excipientes usados para o preparo da formulação tópica foram obtidos da Galena (Campinas, SP, Brasil). Etanol, cloreto de alumínio, cloreto de potássio e todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico.

3.1.2 Materiais permanentes

Agitador mecânico Fisatom®; Agitador Orbital 255 Fanem®; Balança analítica HR-120, A&d®, precisão de 4 casas; Banho-Maria 314/2 DN Nova Ética®; Banho-Maria 100 Fanem; Centrífuga Baby I 206-BL Fanem®; Centrífuga refrigerada Rotina 46 R Hettich Zentrifugen®; Compartimento de madeira projetado para radiação; Contador β , LS 6000, Beckman® LS 6000; Deionizador de água Purebal Option-Q Elga®; Espectrofotômetro Evolution 60 Thermo Scientific®; Espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic®; Estufa 0-120 °C De LEO & Cia®; Fonte elétrica para eletroforese MS 300V Major Science®; Homogeneizador de tecido Tissue-Tearor Biospec®; Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB Medical Holand®; Leitor de microplaca, EnSpire, Perkin Elmer®; Leitor de microplaca Multiskan 36 GO, Thermo Scientific; pHmetro Tec-3MP, TECNAL®; Radiômetro IL 1700 Research Radiometer. Detectores: SED240 – filtro UVB (290 nm), SED005 – filtro UV (350 nm); SED033 – filtro TRED (633 nm), International Light-USA; Sistema de eletroforese Mini Vertical Mini-Protean® Tetra System, Bio-RAD®; Sistema

de PCR em tempo real StepOnePlus™, Applied Biosystems; Termociclador TX96, AmpliTherm®; Ultra-som TSO, Thornton®. Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo, Japan), bomba L2130®, injetor L2200®, PurospherStar RP C18® (150 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany), forno para coluna L2300® e detector L2455 DAD® (Hitachi®, Tokyo, Japan).

3.1.3 Material vegetal

As folhas de *C. verbenacea* foram doadas pela empresa Santosflora, lote número 1507080477 e registo no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) número de cadastro A19CACE. O material botânico foi seco a temperatura ambiente (25°C) e pulverizado em moinho de facas para posteriormente ser submetido à extração.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do extrato etanólico de folhas da *C. verbenacea* (ECV)

O extrato hidroetanólico foi obtido por maceração de 2h seguida de percolação em vazão de 3 a 5 mL por minuto usando álcool etílico 70°GL. A extração foi realizada na razão 1:2 (m/v) (1 g de folhas para 2 mL de líquido extrator). Após a extração, parte do solvente foi eliminado em rota-evaporador a temperatura inferior a 40°C e o extrato restante foi conservado a baixa temperatura (-20°C) (Matos et al., 2015)

3.2.2 Determinação do teor de sólidos ou resíduo seco.

O resíduo seco foi determinado de acordo com o método da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010). Aproximadamente 2 g do extrato foram transferidos para um pesa-filtro e seco em estufa 100 a 105°C até peso constante. O pesa filtro foi resfriado em dessecador e pesado. O resíduo seco foi calculado como porcentagem sobre a massa inicial. A amostra foi pesada em triplicata e o resultado corresponde à média das amostras.

3.2.3 Determinação do teor de polifenóis e flavonoides totais por método colorimétrico

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Georgetti et al., 2006; Kumazawa et al., 2004). 0,5 mL da amostra foram

misturados a 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na₂CO₃. A absorvância foi medida a 760 nm após 1 h de incubação a temperatura ambiente.

O conteúdo de flavonóides totais presentes no extrato foi determinada pela reação com cloreto de alumínio (Georgetti et al., 2007). Nesse método 0,5 mL de amostra foi adicionada de 0,5 mL de AlCl₃. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi determinada a 420 nm.

Os conteúdos de polifenóis e flavonoides totais foram expressos em mg/g de extrato, tendo o ácido gálico como padrão de polifenóis e a quercetina como padrão de flavonoides.

3.2.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo, Japan), contando com bomba L 2130, injetor L 2200, forno para coluna L 2300 mantido a 25°C e detector L 2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan). Foi utilizada uma coluna PurospherStar RP C18® (150 x 4.6 mm, tamanho de partícula igual a 5 mm, Merck, Germany), acoplada a uma pré-coluna de mesmas características (4 x 4; tamanho de partícula igual a 5 mm, Merck, Germany). A fase móvel se constituiu de solução de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). O gradiente empregado foi de 80% A e 20% B por 0 min., 60% A e 40% B por 30 min., 30% A e 70% B por 35 min., 5% A e 95% B por 50 min com vazão de fase móvel de 0,8 mL/min. O detector foi ajustado para uma faixa de varredura de 230 nm a 400 nm, e o cromatograma foi obtido a 330 nm. Os dados foram adquiridos por EZChrom Elite software (versão 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.) (Matos et al., 2015).

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato de ECV

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

A atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical estável DPPH* foi determinada pela medida do decaimento da absorvância.(Blois, 1958; Casagrande et al., 2006a; Georgetti et al., 2006). Para preparar a curva dose-resposta, alíquotas de 20 µL de diluições da amostra de ECV foram adicionadas a tubos contendo como meio reacional 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 µM, de modo que as concentrações de finais ECV no meio reacional em cada tubo foram: 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 51,19 e 102,39 µg/mL. A absorvância foi medida a 517 nm, após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente (espectrofotômetro Helios alfa

Thermo Spectronic®). Foi preparado um controle positivo, correspondente a 100% de radicais livres em ausência de ECV e contendo apenas 20 µL veículo de diluição da amostra. Todas as medidas foram feitas em triplicata. A capacidade de ECV neutralizar o radical DPPH• foi calculada utilizando a seguinte equação:

Equação I:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{\text{absorv\~{a}ncia da amostra}}{\text{absorv\~{a}ncia do controle}} \right) \right] \times 100\%$$

3.2.5.2 Determinação da atividade doadora de elétrons ao radical ABTS+

Os ensaios usando o radical ABTS estão baseados na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o radical de longa vida ABTS. Neste ensaio o ABTS é oxidado pelo radical peróxido ou outros oxidantes para seu radical cátion, ABTS+, que é intensamente colorido. A capacidade antioxidante é medida pela capacidade do composto em teste em descolorir a solução reagindo diretamente com o radical ABTS+ (Prior et al., 2005). O método foi realizado de acordo com Sánchez-Gonzalez et al. (2005), com algumas modificações. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso e o cátion ABTS foi obtido após a reação de 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até uma atingir absorvância de 0,7 em 730 nm. Para preparar a curva de dose-resposta, uma alíquota de 50 µL da amostra diluída de ECV foi adicionada ao meio reacional contendo 4 mL da solução de ABTS diluída, de modo que as concentrações de finais ECV no meio reacional em cada tubo foram: 1,01; 2,02; 4,04; 8,08; 16,16 e 32,31 µg/mL. A mudança de absorvância foi mensurada após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente a 730 nm com um espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic®. Um controle positivo correspondente a 100% de radicais livres em solução foi preparado em ausência de ECV e contendo apenas 50 µL do diluente da amostra. Todas as medidas foram feitas em triplicata. A capacidade de ECV em neutralizar o radical ABTS foi calculada usando a equação I.

3.2.5.3 Determinação do poder antioxidante baseado na capacidade de redução do ferro (FRAP)

A reação de FRAP mede a redução férrica de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) para um produto colorido. O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 40 mM foram adicionados a 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH

3,6). Essa solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos antes do uso. Para a avaliação da capacidade antioxidante, 900 µL do reagente de FRAP preparado previamente foram adicionados de 90 µL de água deionizada e 10 µL do padrão de Trolox ou 10 µL da amostra diluída de ECV (concentração final no meio reacional igual a 8,24 µg/mL). As amostras foram então incubadas a 37°C por 30 minutos e o aumento da absorbância foi mensurado a 595 nm com um espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic®. Para comparação do poder redutor dos flavonóides uma curva analítica com diferentes concentrações de Trolox. Os resultados foram expressos em µM de equivalente de Trolox por grama de extrato. Todas as medidas foram feitas em triplicata (Sánchez-González et al., 2005).

3.2.5.4 Determinação da atividade queladora do Fe²⁺ pela batofenantrolina

O íon Fe²⁺ é um catalizador de reações oxidativas, sendo assim, a determinação da capacidade da amostra em retirar esse íon do meio fornece importante dado de atividade antioxidante. A atividade queladora de Fe²⁺ foi determinada utilizando a batofenantrolina (BPS), um forte agente quelante de Fe²⁺ que forma um complexo colorido quando se liga a esse íon. Esta metodologia baseia-se na redução da formação do complexo Fe₂(BPS)₃ por amostras antioxidantes por meio do decaimento da absorbância mensurado em 530 nm e 700 nm (Bolann and Ulvik, 1987). Ao meio reacional contendo 2 mL KCl/Tris-HCl 130 mM e 10 mM respectivamente (pH 7,4), foi adicionado 50 µM de sulfato ferroso amoniacal. Para preparar a curva de dose-resposta, alíquotas de 50 µL de ECV foram adicionadas ao meio reacional de modo que as concentrações finais foram: 3,02; 6,04; 12,07; 24,15; 48,30; 96,60; 193,18; 241,48 µg/mL. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente foram adicionados 0,2 mM de BPS. Em seguida a reação foi incubada novamente por 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente as absorbâncias foram determinadas em 530 e 700 nm usando um espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic® (Casagrande et al., 2006b). Foi preparado um controle positivo correspondente a 100% de Fe₂(BPS)₃ em solução, em ausência de ECV e contendo apenas 50 µL do diluente da amostra. Todas as medidas foram feitas em triplicata. A atividade queladora de ferro foi calculada pela equação I.

3.2.5.5 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica (LPO) induzida por Fe²⁺

A medida da atividade inibidora de LPO induzida por Fe²⁺ foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) provenientes da LPO (Buege and Aust, 1978). Para preparar a curva de dose-resposta, 10 µL da amostra de ECV foram adicionados em 1 mL de meio de reação (130 mM de KCl e 10

mM de tris-HCl, pH 7,4), 2 mM de citrato de sódio, de modo que as concentrações finais de ECV em cada tudo foram: 1,90; 3,80; 7,59; 15,18; 30,36; 60,71; 121,43 e 242,85. Em seguida foi adicionada uma fonte de lipídeos (suspensão de mitocôndrias de camundongos correspondente a 1 mg de proteína/mL no meio reacional) e 50 µM de sulfato ferroso amoniacal. A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Para determinar a concentração de TBARS, 1 mL de TBA 1% preparado em 50 mM de NaOH, 0,1 mL de NaOH 10 M e 0,5 mL de ácido H₃PO₄ 20% foram adicionados. A reação foi incubada. TBARS foram extraídas com 2 mL de n-butanol, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos e a absorbância foi medida a 535 nm com um espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic®. Um controle positivo foi preparado em ausência de ECV e de ferro e contendo apenas 10 µL do diluente da amostra. Um branco foi preparado em ausência de mitocôndria. Todas as medidas foram feitas em triplicata. A avaliação da inibição da peroxidação lipídica dependente de ferro foi calculada usando a equação I.

3.2.5.6 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe²⁺

A atividade inibidora da peroxidação lipídica (LPO) independente de Fe²⁺ foi determinada pela diminuição da formação de hidroperóxido lipídico (LOOH), um produto primário da peroxidação lipídica (Lingnert et al., 1979). Primeiramente, preparou-se a emulsão de ácido linoleico 10 mM, em tampão fosfato de potássio monobásico/dibásico (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0,1 M (pH 6,5), com auxílio de Tween 20. Para preparar uma curva de dose-resposta, em 2 mL da emulsão foram adicionados 10 µL das diluições de ECV, de modo que as concentrações de ECV no meio reacional em cada tubo foram: 1,06; 2,13; 4,26; 8,52; 17,03; 34,06; 68,12; 136,24 µg/mL. Foi preparado um lote sem incubação e um lote com incubação de 8 horas a 37°C. Após a incubação ou ao lote sem incubação foram adicionados 1 mL de metanol e 3 mL de metanol a 60%. A absorbância foi determinada a 234 nm com um espectrofotômetro Helios alfa Thermo Spectronic® (Martinez et al., 2012). Foi preparado um controle na ausência de amostra contendo apenas 10 µL do diluente da amostra. O branco se constituiu de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) com Tween 20. LPO foi calculada com a seguinte equação:

Equação II:

$$\% \text{ atividade} = \frac{1 - (\text{Abs A após incubação} - \text{Abs A sem incubação})}{(\text{Abs C após incubação} - \text{Abs C sem incubação})} \times 100$$

Abs A = absorbância da amostra

Abs C = absorvância do controle positivo

3.2.5.7 Determinação da atividade antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina-oxidase

O método se baseia na capacidade do antioxidante em inibir a quimiluminescência que é emitida pelo luminol em consequência da presença do ânion superóxido que é gerado pela reação da xantina com oxigênio em presença de xantina-oxidase. A mistura reacional deve ser preparada imediatamente antes da análise contendo: 400 µL de tampão glicina (0.1 M pH 9.4, 1 mM EDTA). 150 µL de xantina (6 mM em tampão glicina) e 10 µL de luminol (0.6 mM). Para preparo de uma curva dose-resposta são adicionados ao meio reacional 10 µL de diluições de ECV, de forma que as concentrações finais em cada tubo serão: 0,037; 0,070; 0,300; 0,600; 1,200; 2,390; 4,780; 9,560 µL/mL. A adição de 100 µL de solução de xantina-oxidase (20 IU/ml) inicia a reação. A quimiluminescência é medida durante 10 segundos a temperatura ambiente com auxílio de um luminômetro Sirius (Bethold detector systems). Foi preparado um controle contendo 10 µL do diluente da amostra, no qual a quimiluminêscia observada equivale a 100%. A quimiluminescência da quercetina também foi determinada como antioxidante padrão. A atividade antioxidante por quimiluminescência foi calculada utilizando a seguinte equação:

Equação III:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{\text{quimiluminescência da amostra}}{\text{quimiluminescência do controle}} \right) \right] \times 100\%$$

3.2.5.8 Determinação da atividade antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema H₂O₂/luminol/HRP (horse radish peroxidase)

O método se baseia na capacidade do antioxidante em inibir a quimiluminescência emitida pelo luminol em presença dos radicais livres gerados pela ação da peroxidase sobre H₂O₂. A mistura reacional deve ser preparada imediatamente antes da análise contendo: 380 µL de tampão fosfato (KH₂PO₄ 0.1 M; NaOH 0,1 M pH 7,4) e 10 µL de luminol (concentração no meio reacional 1,13.10⁻⁴). Para preparo de uma curva dose-resposta são adicionados ao meio reacional 10 µL de diluições de ECV, de forma que a concentrações finais em cada tubo serão: 0,13; 0,19; 0,25; 0,38; 0,51; 0,76; 1,02 µL/mL. No momento da leitura adicionou-se H₂O₂ (concentração final no meio reacional de 5.10⁻⁵ M) e solução HRP (concentração final no meio reacional 0,2 U/mL) para iniciar a reação. A quimiluminescência foi medida durante 10 segundos a temperatura ambiente com auxílio de um luminômetro

Sirius (Bethold detector systems). Foi preparado um controle contendo 10 μ L do diluente da amostra, no qual a quimiluminescência observada equivale a 100%. A quimiluminescência da quercetina também foi determinada como antioxidante padrão. A atividade antioxidante por quimiluminescência foi calculada utilizando a equação III.

3.2.6 Avaliação da eficácia *in vivo* do extrato de *C. verbenácea* oral ou em formulação tópica na redução do estresse oxidativo e inflamação cutânea induzidos pela radiação UVB.

3.2.6.1 Animais experimentais

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, do mesmo sexo, 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 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 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) sob nº 030/2015, processo nº 1818.2015.2400.

3.2.6.2 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 400nm com pico máximo de emissão em 313 nm. A fonte foi instalada em um compartimento retangular de madeira desenvolvido para os experimentos. Os camundongos foram colocados em caixas de plástico, onde podiam movimentar-se, porém foram cobertos com tela plástica (1 mm de espessura, com rede de malha de 2 x 2 mm) a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação. Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). A altura da tela permitiu conter os animais dentro da caixa e ao mesmo tempo garantiu que a radiação os atingisse sempre na região dorsal. Os resultados da determinação das taxas de radiação dentro da caixa mostraram que a intensidade da radiação varia ao longo da lâmpada, portanto as posições

das caixas foram modificadas periodicamente durante a irradiação (Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b).

3.2.6.3 Medida da radiância da lâmpada

A radiância é a taxa do fluxo de energia em watts (W) (ou J/seg) por unidade de área, ou seja, W/cm^2 . A dose de exposição em J/cm^2 é obtida multiplicando-se a radiância (W/cm^2) pelo tempo de exposição em segundos. Para obter a medida da radiância, utilizou-se um radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com detectores para radiação UV (SED005) e especialmente para UVB (SED240). A radiância da lâmpada foi medida em toda a extensão do compartimento, a uma distância de 20 cm da mesma e com a presença da tela plástica utilizada para conter os animais. Para indução da inflamação e estresse oxidativo em camundongos hairless foi utilizada a dose de radiação de $4,14 J/cm^2$ (Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014; Shindo et al., 1994). Shindo et al., 1994 demonstrou que a dose de $25 J/cm^2$ equivale a 4-5 horas de exposição ao sol de outono na latitude da Califórnia ($38^\circ N$).

3.2.6.4 Protocolo experimental de avaliação da eficácia da *Cordia verbenacea* administrada por via oral

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em grupos de 5 animais como segue: grupo controle não irradiado, grupo controle irradiado e os grupos irradiados e tratados com 3 diferentes doses de ECV 10, 30 e 100 mg/kg. Os grupos foram irradiados simultaneamente.

Para o preparo das doses, ECV foi diluído em água e as doses foram administradas via oral, por gavagem, 30 minutos antes do início da irradiação e 6 horas após o primeiro tratamento, ou seja, logo após a irradiação (Figura 4). As doses foram calculadas com base nos experimentos de Sertié et al, (1988, 1991) e derivadas para camundongo através do cálculo de dose de referência por peso corporal (EPA, 2011). Foi administrado um volume de 200 µl/animal em cada um dos tratamentos.

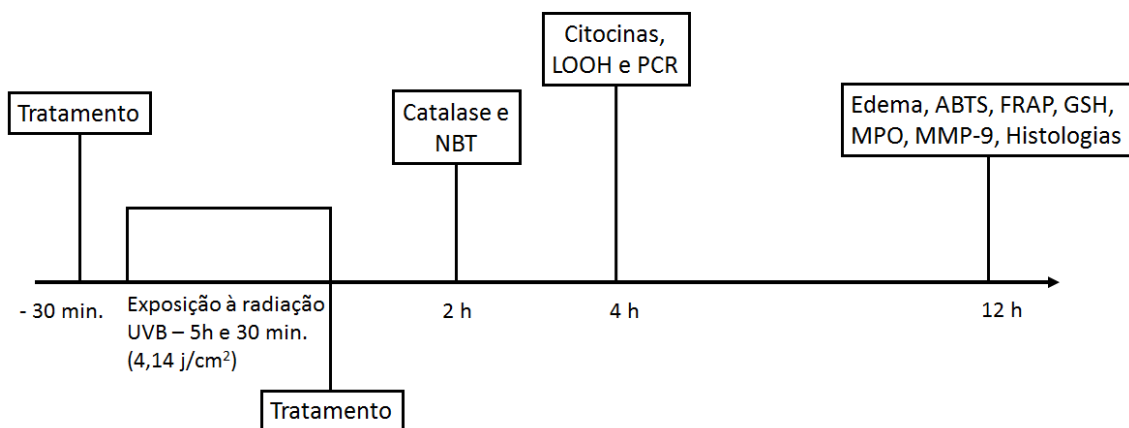


Figura 4 - Esquema geral dos protocolos experimentais para avaliação da eficácia do ECV administrado por via oral. Os animais foram expostos a radiação UVB durante 5,5 horas (4,14 J/cm²). Trinta minutos antes do início e imediatamente após a irradiação foram tratados com diferentes doses de extrato de *C. verbenacea* (10, 30, 100 mg/kg) e foram eutanasiados para a coleta de amostras de pele 2 horas depois do término da irradiação para avaliação da produção de ânion superóxido (NBT) e da atividade da catalase (CAT), 4 horas após o término da irradiação para avaliação da produção hidropéroxidos lipídicos (LOOH), citocinas e da expressão de RNAm por reação em cadeia da polimerase (PCR quantitativo) e 12 horas após o término da irradiação para avaliação do edema, da atividade de MPO e MMP-9, dos níveis de GSH, da atividade de FRAP e da capacidade em reduzir o radical ABTS, além das análises histológicas para avaliação da infiltração de neutrófilos e mastócitos, espessura epidérmica, presença de queratinócitos apoptóticos e degradação do colágeno.

Os animais foram eutanasiados e as peles do dorso foram coletadas 12 horas após o início da irradiação para a avaliação do edema, da atividade da MPO, da atividade de MMP-9, dos níveis de GSH, da atividade de FRAP, da capacidade em reduzir o radical ABTS e para as análises histológicas de avaliação de infiltração de mastócitos na derme, espessamento epidérmico, presença de queratinócitos apoptóticos (células *sunburn*) e

degradação das fibras de colágeno. A eutanásia e a coleta ocorreram 4 horas após o início da irradiação para os testes de produção de LOOH, citocinas e expressão do mRNA por PCR quantitativo e 2 horas após o início da irradiação para a avaliação da produção de $O_2^{\cdot-}$ (NBT) e avaliação da atividade da catalase (Figura 4). Amostras coletadas para edema foram pesadas imediatamente após a remoção, amostras coletadas para histologia foram estocadas em formol a 10% a temperatura ambiente e amostras coletadas para os demais testes foram divididas em amostras de tamanho adequado para cada teste e estocadas a -70°C para posterior análise. Para a eutanásia, os animais receberam anestesia terminal de 1,5% de isoflurano, no caso dos testes de 12 horas, ou foram anestesiados e em seguida decapitados no caso dos testes de 2 e 4h.

3.2.6.5 *Protocolo experimental de avaliação da eficácia da Cordia verbenacea administrada por via tópica*

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em grupos de 5 animais como segue: grupo controle não irradiado, grupo controle irradiado, grupo irradiado e tratado somente com a emulsão sem ECV, grupo irradiado e tratado com a emulsão contendo 5% de ECV. Os grupos foram irradiados simultaneamente.

Os animais foram tratados topicamente com 0,5 g de emulsão (com ou sem ECV), aplicada com um pincel, de 6 em 6 horas, num total de 4 tratamentos, começando 12 horas antes do início da irradiação e terminando logo após a irradiação, de forma que os animais receberam três tratamentos antes da irradiação e um tratamento após a irradiação como no esquema da figura 5.

Os animais foram eutanasiados e as peles do dorso foram coletadas 12 horas após o início da irradiação para a avaliação do edema, da atividade da MPO, da atividade de MMP-9, dos níveis de GSH, da atividade de FRAP, da capacidade em reduzir o radical ABTS e para as análises histológicas de avaliação de infiltração de mastócitos na derme, espessamento epidérmico, presença de células *sunburn* e degradação das fibras de colágeno. A eutanásia e coleta ocorreram 4 horas após o início da irradiação para avaliação da produção de citocinas e expressão do mRNA por PCR quantitativo e 2 horas após o início da irradiação para a avaliação da produção do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ (NBT) e avaliação da atividade da catalase (Figura 5). Amostras coletadas para edema foram pesadas imediatamente após a remoção, amostras coletadas para histologia foram estocadas em formol a 10% a temperatura ambiente e amostras coletadas para os demais testes foram divididas em amostras de tamanho adequado para cada teste e estocadas a $-$

70°C para posterior análise. Para a eutanásia, os animais receberam anestesia terminal de 1,5% de isoflurano no caso dos testes de 12 horas, ou foram anestesiados e em seguida decapitados no caso dos testes de 2 e 4h.

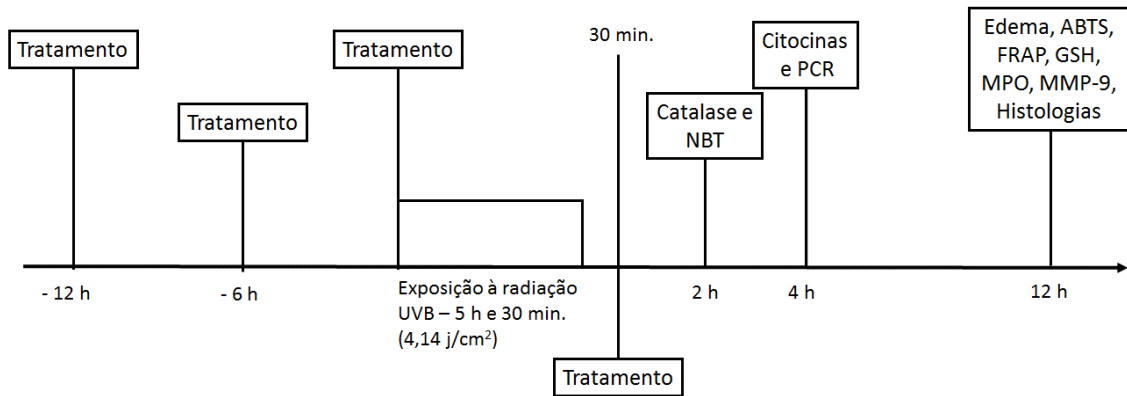


Figura 5. Esquema geral dos protocolos experimentais para avaliação da eficácia do ECV por via tópica. Os animais foram expostos a radiação UVB durante 5,5 horas (4,14 J/cm²). Doze horas, seis horas, imediatamente antes da irradiação e uma hora após a irradiação os animais foram tratados emulsão de Polawax® contendo 5% de ECV e foram eutanasiados para a coleta de amostras de pele 2 horas depois do término da irradiação para avaliação da produção de ânion superóxido (NBT) e da atividade da catalase (CAT), 4 horas após o término da irradiação para avaliação da produção de citocinas e expressão de RNAm por reação em cadeia da polimerase (PCR quantitativo) e 12 horas após o término da irradiação para avaliação do edema, da atividade de MPO e MMP-9, dos níveis de GSH, da atividade de FRAP e da capacidade em reduzir o radical ABTS, além das análises histológicas para avaliação da infiltração de neutrófilos e mastócitos, espessura epidérmica, presença de queratinócitos apoptóticos e degradação do colágeno.

3.2.6.5.1 Preparo da formulação tópica

A proporção de ingredientes para o preparo da emulsão consta na Tabela 1. Para preparo da formulação aqueceu-se separadamente a fase A (lipossolúvel) e a fase B (hidrossolúvel) até a temperatura de 70°C. Após a fusão dos sólidos e quando as duas fases atingiram a temperatura determinada, verteu-se a fase B sobre a fase A com agitação constante para a formação da emulsão, até que atingisse a temperatura ambiente. Adicionou-se então as fases C e D. Após 24 horas do preparo da formulação o extrato foi incorporado na concentração de 5% a temperatura ambiente.

Tabela 1 – Componentes da formulação contendo ECV

<i>Matérias-primas</i>	%
A) Polawax ^{®1} (emulsionante e doador de viscosidade)	10
Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (emoliente)	5
B) Água destilada qsp*	100
C) Phenonip (conservante)	0,4
D) Propilenoglicol (umectante e solubilizante)	6

**quantidade suficiente para;*

¹Polawax[®]: base auto emulsionante não iônica (álcool cetoestearílico + monoestearato de sorbitol polietoxilado – 20 OE);

3.2.6.6 Avaliação de parâmetros inflamatórios cutâneos

3.2.6.6.1 Avaliação do edema de pele

Com o auxílio de um molde de área fixa (5 mm diâmetro) foi coletada e pesada uma área constante de pele do dorso de cada animal, (Afaq et al., 2005; Bhatia et al., 2011; Campanini et al., 2013). O efeito do ECV no edema cutâneo induzido pela radiação UVB foi mensurado por meio do peso do corte de pele da região dorsal. A análise se deu pela diferença de peso de pele entre os diferentes grupos. Os resultados foram expressos em mg de pele.

3.2.6.6.2 Determinação da atividade de mieloperoxidase (recrutamento de neutrófilos)

A quantificação da migração de neutrófilos para a pele induzida por radiação UVB foi determinada indiretamente pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Neste método, a MPO catalisa a oxidação do substrato o-dianisidina, resultando em um composto colorido que é detectado espectrofotometricamente em 450 nm (Bradley et al., 1982; Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Ivan et al., 2014). As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram trituradas em 400 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB) com a ajuda de um turrax Tissue-Tearor (Biospec[®]). O homogenato foi centrifugado a 16.100 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio (30 µL). A alíquota do sobrenadante foi adicionada a um poço em uma microplaca de 96 poços, sendo adicionados posteriormente 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 0,0167 % de α -

dianisidina e 0,015% de H₂O₂ em água deionizada. Após 20 minutos de reação a atividade da MPO das amostras foi determinada em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) e comparada com uma curva padrão de neutrófilos de concentração conhecida. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de pele.

3.2.6.6.3 Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS)

Para avaliação da MMP-9, foi utilizado a técnica de zimografia em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), um método utilizado para detecção de proteases. A análise detecta enzimas que degradam a gelatina presente no gel (FONSECA et al., 2011a; KIM et al., 2007). Um pool das amostras de pele de cada grupo foi preparado e armazenado em microtubos a - 70° C até o momento da determinação. As amostras foram então homogeneizadas com auxílio do triturador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370), na proporção 1 g de pele para 4 mL em tampão fosfato Tris/HCl 50mM (pH 7,4) com cloreto de cálcio (CaCl₂) e 1% de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida). Os homogenatos foram centrifugados duas vezes a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram submetidos ao ensaio de zimografia. Uma aliquota de 50 µL do sobrenadante foi diluída em 10 µL de tampão Tris/HCl (pH 6,8) contendo 20% de glicerol, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,001% de azul de bromofenol. Em seguida estas amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C durante 8 minutos imediatamente antes de ser aplicada no gel de eletroforese. A espessura do gel utilizado foi de 1 mm, composto por um gel de separação e um gel de concentração, preparado conforme Tabela 2.

Os géis de concentração e de separação foram colocados no aparato específico do sistema de eletroforese vertical (Bio-RAD®). O interior da cuba de eletroforese foi preenchido com tampão Tris/glicina 190 mM (pH 8.3) contendo 0,1% de SDS. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída a uma corrente de 10 mA por 15 minutos. Foram então aplicados 15 µL de cada amostra a cada um dos poços do gel de concentração separadamente. Durante a eletroforese foi aplicada uma corrente de 10 mA para o gel de concentração e de 13 mA para o gel de separação, sendo essa última mantida constante por 15 minutos após ter sido observado o desaparecimento das bandas coradas pelo azul de bromofenol.

Tabela 2 – Constituintes dos géis de poliácridamida para zimografia

Substância	Quantidade (μL)	
	Gel de concentração	Gel de separação
Água ultrapura	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	10	6,6

Ao término da eletroforese, o gel de poliácridamida foi lavado por 1 hora com solução de Triton X-100 2%, sob constante agitação e foi posteriormente incubado por 16 horas a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) contendo CaCl_2 10 mM. Ao final da incubação, o gel foi corado com uma solução contendo 0,25% de azul brilhante, 10% de ácido acético e 50% de metanol em água ultrapura. Para visualização das bandas, o gel foi descorado com ácido acético 20% (FONSECA et al., 2011b). A atividade proteolítica foi analisada por meio da comparação das diferenças de densidades de cor entre as bandas de cada grupo pelo programa ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2.6.6.4 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6

A quantificação das citocinas $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, e IL-6 nas amostras de pele foi realizada utilizando-se a técnica de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), do tipo sanduíche, utilizando kits comerciais (eBioscience), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de pele foram homogeneizadas em salina (500 μL) utilizando um triturador Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas a 2000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação das citocinas $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$. Os ensaios foram realizados em microplaca e os resultados foram obtidos comparando as densidades óticas em 490 nm das amostras com as densidades das respectivas curvas padrões das citocinas (Verri et al., 2008).

3.2.6.7 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

3.2.6.7.1 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)

As amostras de pele (aproximadamente 0,1 g) foram diluídas (1 g de pele para 4 mL de EDTA 0,02 M) e homogeneizadas utilizando o triturador Tissue-Tearor (Biospec 985370). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 2.700 g por mais 15 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi retirado para análise. Para o ensaio, foram utilizados 50 µl do sobrenadante da amostra, 100 µl de tampão Tris 0,4 M pH 8,9 e 5µl de uma solução de 1,9 mg/mL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) em metanol. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) após 5 minutos de incubação, em 405 nm. A curva padrão foi preparada com 0 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (Srinivasan et al., 2007).

3.2.6.7.2 Avaliação da produção de ânion superóxido

A produção do ânion superóxido foi avaliada pela sua capacidade de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (Campanini et al., 2013) As amostras de pele (cerca de 0,1 g) foram homogeneizadas com o Tissue-Tearor (Biospec 985370) em 500 µL EDTA 0,02 M e centrifugadas (2000 g por 20 segundos a 4°C). Para a reação, o sobrenadante (50 µL) foi incubado em microplaca por 1 hora para fixação das células. Em seguida, o sobrenadante foi removido e NBT foi adicionado (1 mg/mL) às células fixadas. Após 15 minutos, o NBT foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixação. O composto formado pela redução do NBT pelo ânion superóxido (Formazan) foi solubilizado com 120 µL de KOH 2M e 140 µL de dimetilsufóxido (DMSO). A redução do NBT para formazan foi medida em espectrofotômetro de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/10 mg de pele.

3.2.6.7.3 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

O método é baseado no decaimento da concentração de H₂O₂ que é diretamente proporcional a diminuição da absorbância a 240 nm. A diferença de absorbância por unidade de tempo é a medida da atividade da catalase (AEBI, 1984). As amostras de pele

dos animais foram homogeneizadas em 500 μL de EDTA 0,02M utilizando o triturador Tissue-Tearor (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi retirado para análise. A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca por meio da adição de 10 μL amostra, 160 μL tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 μL água deionizada e 20 μL H_2O_2 200 mM. Foi incluído um branco para cada amostra preparado com 10 μL do sobrenadante da amostra, 180 μL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 μL de água deionizada. A velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela ação da CAT foi avaliada através da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H_2O_2 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 240 nm com temperatura mantida em 25°C. Os valores de catalase foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto (Aebi, 1984).

3.2.6.7.4 Avaliação do poder antioxidante da pele por meio dos ensaios de ABTS e FRAP

As amostras de pele (aproximadamente 30 mg) dos diferentes grupos de animais foram coletadas em microtubos contendo 400 μL de KCl (1,15%) e homogeneizadas com auxílio de triturador (Tissue-Tearor, Biospec). Foram então centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. Ambos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços.

Para a reação de FRAP foram utilizados 30 μL do sobrenadante das amostras e 150 μL do reagente FRAP (2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl 40 mM, 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6) incubada a 37°C por 30 min). A leitura da reação foi realizada a 595 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,039 a 40 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele (Katalinic et al., 2005).

Para a reação de ABTS, 7 μL do sobrenadante das amostras foram adicionados a 200 μL 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 temperatura ambiente por, no mínimo, 16 horas antes do uso. A solução ABTS a ser usada na reação foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) até uma absorbância de 730nm. A reação foi incubada por 6 min e a leitura das amostras foi também realizada a 730 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,039 a 40 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol de equivalente de Trolox/mg de pele (Katalinic et al., 2005).

3.2.6.7.5 Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica (LPO)

A produção de hidroperóxido foi avaliada por método de quimiluminescência (Martinez et al., 2015a). O método é baseado na determinação de quimiluminescência iniciada pelo terc-butil hidroperóxido (Gonzalez Flecha et al., 1991). As amostras de pele dos animais (cerca 0,1 g) foram homogeneizadas em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,4) com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, foram centrifugadas a 700 g por 2 minutos a 4 °C. Para o ensaio, 250 µL do sobrenadante foram adicionados a 1730 µL de meio de reação (KCl 120 mM, tampão fosfato pH 7,4 30 mM) e 20 µL de terc-butil hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador β marca Beckman® LS 6000 (FULLERTON, CA, EUA) em uma faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30°C, durante 120 minutos. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm) por mg de pele.

3.2.6.7.6 Expressão de RNAm para Nrf2, NQO-1, HO-1 e COX-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

As amostras de pele foram coletadas em reagente Trizol e homogeneizadas para a extração do RNA total. O RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa, e o DNAc obtido foi usado para amplificação específica do RNAm de interesse. A expressão quantitativa de RNAm para Nrf2, NQO-1, HO-1 e COX-2 foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, em que foram utilizados o reagente SYBRGreen Master Mix (o qual contém fluoróforo SYBRGreen; enzima DNA polimerase; DNTPs e fluoróforo ROX), a solução de DNAc, água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato e uma solução contendo cada primer. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras no termociclador ABI5700 (APPLIED BIOSYSTEMS, WARRINGTON, REINO UNIDO) por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor do limiar do ciclo, em que a amplificação das amostras atinge um limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado (Campanini et al., 2014; Martinez et al., 2016b; Verri et al., 2008).

3.2.6.7.7 Avaliação histopatológica por microscopia ótica

Para análise histológica, amostras de pele do dorso dos animais foram coletadas 12 horas após irradiação e armazenadas em formol 10%. Subsequentemente, foram fixadas em paraformaldeído 4% e desidratadas em banhos de soluções de etanol em concentrações crescentes (70%, 95% e 100%). Em seguida, foram diafanizadas com xilol e incluídas em parafina. Foram preparados cortes de 5 μm , os quais foram corados com Hematoxilina Eosina (HE), Azul Toluidina e Tricrômico de Masson. Os cortes corados com H & E foram examinados utilizando microscopia ótica a uma ampliação de 400 vezes (objetiva de 40) para determinação da espessura epidérmica (Deng et al., 2016) e uma amplificação de 1000 vezes (objetiva de 100) para contagem do número de queratinócitos apoptóticos (Schwarz et al., 1995). Para contagem de mastócitos, os cortes foram corados com Azul de Toluidina e a análise feita em microscopia ótica a uma ampliação de 400 vezes (objetiva de 40). As análises foram feitas com o software Infinity Analyze (Lumenera® Software). Já os cortes corados com Tricrômico de Masson foram examinadas utilizando microscopia ótica a uma ampliação de 100 vezes (objetiva de 10) para visualizar alterações nas fibras de colágeno, por meio da análise da intensidade da coloração azul nas áreas dérmicas da pele exposta a radiação UVB, com auxílio do software Image J (NIH) (Song et al., 2016).

3.2.7 Análise estatística dos resultados

As concentrações de ECV *in vitro* necessárias para inibir o processo oxidativo em 50% (IC 50) foram determinadas usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), utilizando uma curva hiperbólica. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados *in vivo* foram avaliados estatisticamente por análise de variância com um fator, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, e apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo e representativos de 2 experimentos separados. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 *Cordia verbenacea* extract inhibits inflammation and oxidative stress induced by UVB irradiation in hairless mice.

Cristina de Paula Barros de Melo^a, Priscila Saito^a, David Laios do Vale^a, Camilla Arriero^a, Ingrid Caroline Pinto^a, Renata Micheli Martinez^a, Julia Rojo Bezerra ^a, Marcela Maria Baracat^a, Waldiceu Aparecido Verri Jr. ^b, Yris Maria Fonseca-Bazzo^c, Sandra Regina Georgetti^a, Rubia Casagrande^{a*}.

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

^bDepartamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, PR445, Cx. Postal 10.011, 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

^cLaboratório de Controle da Qualidade, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, Brazil. CEP 70910-900.

* Corresponding author address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475. E-mail address: rubiacasa@yahoo.com.br (R. Casagrande).

E-mail of each author:

Cristina de Paula Barros de Melo: cristinademelo@hotmail.com

Priscila Saito: prsaito@gmail.com

David Laios do Vale: dlvale31@msn.com

Renata Micheli Martinez: renatamimartinez@gmail.com

Camilla Arriero: camilla_arriero@hotmail.com

Ingrid Caroline Pinto: carol.ingrid2@gmail.com

Julia Rojo Bezerra: julia.bz@hotmail.com

Marcela Maria Baracat: baracat1903@yahoo.com.br

Sandra Regina Georgetti: sangeorgetti@gmail.com

Waldiceu Aparecido Verri Jr: waldiceujr@yahoo.com.br

Yris Maria Fonseca-Bazzo: yrisfonseca@unb.br

Rubia Casagrande: rubiacasa@yahoo.com.br

Abreviados

ACTB	actin beta
ABTS	2,2 -azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BPS	2-deoxy-D-ribose bathophenathroline
CAT	catalase
CO	carbone monoxide
COX	cicloxygenase
CVE	<i>Cordia verbenacea</i> ethanolic leaves extract
DPPH•	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GPx	glutathione peroxidase
GRx	glutathione reductase
GSH	reduced glutathione
HaCaT	aneuploid immortal keratinocyte cell
HO-1	heme oxygenase-1
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
IL	interleukin
LOOH	lipid hydroperoxides
LOX	lipoxigenase
LPO	lipoperoxidation
LT	leukotriene
MMP	matrix metalloproteinase
MPO	myeloperoxidase
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
NBT	nitroblue tetrazolium
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
NQO-1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NMSC	non melanoma skin cancer
NO	nitric oxide
Nrf 2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

·OH	hydroxyl free radical
O ₂ ^{·-}	superoxide anion
PG	prostaglandin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RA	rosmarinic acid
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error mean
SOD	superoxide dismutase
TBA	thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
TNF-α	tumor necrosis factor-α
UV	ultraviolet
XOD	xanthine oxidase

Cordia verbenacea extract inhibits inflammation and oxidative stress induced by UVB irradiation in hairless mice.

Abstract

Skin exposure to high doses of UVB radiation from the sun leads to inflammation, oxidative stress, and ultimately, to cell damage, death and cancer. The control of the inflammatory response, the inhibition of reactive oxygen species (ROS), and the recovery of natural antioxidants are promising steps to prevent UVB radiation-induced skin damage. *Cordia verbenacea* is a Brazilian medicinal plant used in popular medicine as anti-inflammatory and antioxidant and studied using various experimental disease models. However, there is a lack of studies into the inhibitory effects of the plant on UVB radiation-induced skin damage. This work aims to evaluate ethanolic *Cordia verbenacea* leaves extract (CVE) potential to prevent cell damage induced by UVB radiation. The extract was evaluated for its *in vitro* antioxidant capacity by various methods and showed scavenging, chelating and lipoperoxidation (LPO) inhibition capacity with the following results: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with IC_{50} 19.128 $\mu\text{g/ml}$; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) with IC_{50} 12.48 $\mu\text{g/mL}$; inhibition of hydroperoxides from linoleic acid with IC_{50} of 10.20 $\mu\text{g/mL}$; inhibition of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) with IC_{50} 8.90 $\mu\text{g/mL}$; and iron chelating ability measured by bathophenanthroline iron assay with IC_{50} 47,35 $\mu\text{g/mL}$. CVE was also able to inhibit chemiluminescence triggered by free radicals with IC_{50} 0,286 $\mu\text{g/mL}$ for the H_2O_2 /hoseradish peroxidase (HRP)/luminol method and IC_{50} 0,42 $\mu\text{g/mL}$ for xanthine/xanthine oxidase/luminol method. For *in vivo* assays, hairless mice were treated orally (CVE 10, 30 and 100 mg/kg, 30 minutes before and immediately after UVB radiation exposure). CVE treatment was effective to control edema (30 and 100 mg/kg), neutrophil infiltration (30 and 100 mg/kg), and overproduction of MMP-9 (10, 30 and 100 mg/kg). Because 30 mg/kg was the lower effective dose on the previous essays, it was the dose of choice for the next essays performed. Therefore, CVE 30 mg/kg was able to control mast cells infiltration, inhibit excessive pro-inflammatory $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and IL-6 cytokine production, inhibit epidermal thickening and epidermal apoptotic keratinocytes and control collagen degradation. Furthermore CVE 30 mg/kg could protect the natural antioxidant defenses of the skin by increasing the expression of the antioxidant response element (ARE) linked genes, like nuclear factor erythroid 2 (Nrf-2), quinone oxidoreductase 1 NAD(P)H quinona oxido-reductase 1 (NQO-1) e heme oxygenase 1 (HO-1); and prevent lipid peroxidation. Results also showed that treatment with CVE 30 mg/kg was able to recover GSH and catalase activity, inhibit superoxide anion production, and enhance ROS scavenging capacity of the skin. In conclusion, results from this study suggest that oral treatment with CVE 30 mg/kg can be considered a suitable strategy to control UVB-induced inflammation and oxidative stress and thus reduce sunlight damage to the skin.

Keywords: inflammation, antioxidant, *in vitro*, *in vivo*, rosmarinic acid, flavonoids, phenolic compounds.

1 Introduction

Sunlight is vital to life on Earth and the benefits of sensible exposure to the sun are well known (Holick, 2016; Natarajan et al., 2014). However, excessive exposure to UV radiation from the sun generates a series of events that can lead to cell damage, cancer and death (Halliday, 2005).

UVB radiation, a highly energetic type of UV radiation, induces keratinocytes and immune cells to produce inflammation mediators (such as prostaglandins and cytokines), through which promotes vasodilation, vascular permeation, leucocytes infiltration, and epidermal thickening (Clydesdale et al., 2001; D'Orazio et al., 2013; Rhodes and Lim, 2007). In this sense, the primary effect of acute exposure to high doses of UVB radiation is sunburn, an inflammatory response that presents erythema and edema as its hallmarks (Balupillai et al., 2015; Pérez-Sánchez et al., 2018).

UVB radiation also induces oxidative stress by enhancing the production of reactive species of oxygen (ROS) and the depletion of natural skin antioxidants, both enzymatic (catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase e glutathione reductase) and non-enzymatic (glutathione, α -tocopherol, ascorbic acid and β -carotene) (Melo et al., 2013). Oxidative stress can activate the expression of some genes and signal transduction pathways, such as MAP kinase/AP-1 and nuclear factor kappa B (NF- κ B), causing the cells to continue on inducing pro-inflammatory cytokines and other mediators, what aggravates the inflammation and engages an inflammation-ROS feedback loop (Cooper and Bowden, 2007; Fuchs et al., 2001). UVB and ROS are also involved in lipid peroxidation, damage to collagen and to DNA (Afaq et al., 2005; Fuchs et al., 2001; Halliday, 2005), as well as changes in cell structure and metabolism that may lead to photoaging, auto-immune manifestations, pre-neoplastic lesions and eventually skin cancer (Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Holick, 2016).

Photochemoprevention using natural substances that can regulate the inflammatory response, inhibit excessive ROS production, and promote the recovery of natural skin antioxidants represent a very effective strategy to control the damage caused by UVB radiation to the skin (Filip et al., 2009; Martinez et al., 2015). Plants are a rich source of anti-inflammatory and antioxidant molecules. Their use to protect skin against the effects of sunlight exposure has gained more attention in the last few years (Bolfá et al., 2013; Kostyuk et al., 2017; Pérez-Sánchez et al., 2018; Ribeiro et al., 2018, Sharma et al., 2018; Zhang et al., 2017).

Cordia verbenacea DC (*Boraginaceae*) popularly known as “erva baleeira” is a flowered shrub, widespread through the Brazilian coast, which anti-inflammatory activity is recognized both by general public and by the scientific community (Dutra et al., 2016). The hydro-ethanolic extract of *C. verbenacea* (CVE) leaves has already demonstrated the

presence of potentially anti-inflammatory and antioxidant molecules, among which flavonoids, such as arthemitin and quercetin (Matias et al., 2013; Sertié et al., 1990), and rosmarinic acid (RA) (Matias et al., 2013; Matos et al., 2015).

Despite the extensive research on the potential therapeutic applications of *C. verbenacea*, its effects against UVB-induced damage to the skin are yet to be investigated. Therefore, the purpose of this work is to evaluate the mechanisms of the *in vitro* antioxidant activity of the hydro-ethanolic extract of *C. verbenacea*, as well as its photochemopreventive effect against UVB-induced inflammation and oxidative stress in hairless mice.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals

2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+); 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ), acetonitrile, luminol, horseradish peroxidase (HRP), xanthine, xanthine oxidase (XOD), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), linoleic acid, phosphoric acid, thiobarbituric acid (TBA), bisacrylamide, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB), brilliant blue stain, phenanthroline, phenyl methyl sulfonyl fluoride, reduced glutathione (GSH), nitroblue tetrazolium (NBT), *o*-dianisidine dihydrochloride, Folin-ciocalteu and Trolox were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bathophenanthroline (BPS) and tert-butyl hydroperoxide from Acros (Pittsburgh, PA, USA). Tris from Amresco (Solon, OH, USA). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits from eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrylamide sodium dodecyl sulfate (SDS), Superscript1III, Oligo(dT)12-18 primers, Platinum SYBRGreen1 and primers from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents used were of pharmaceutical grade.

2.2 Plant material and extract

The leaves of *Cordia verbenacea* were donated by the company Santosflora®, lot number 1507080477. The leaves were dried at room temperature (25°C) (RT) and pulverized using a knife mill. The ethanolic extract of leaves of *C. verbenacea* (CVE) was obtained by 2 h maceration at RT, followed by percolation at a flow rate of 3 to 5 mL per minute. The solvent used was ethanol 70°GL, and the ratio dry leaves:solvent was 1:2 (w/v). After the extraction, the solvent was partially dried under vacuum using a rotary evaporator with the temperature maintained at less than 40°C. The extract was kept at – 20°C until use (Matos et al., 2015).

2.3 Extract Characterization

2.3.1 Dry weight

The dry weight of CVE was determined by gravimetric analysis according to Farmacopeia Brasileira 5th edition method (Brasil, 2010).

2.3.2 Total flavonoids and polyphenol contents

Total polyphenol content in CVE was determined by Folin–Ciocalteu colorimetric method (Georgetti et al., 2006; Kumazawa et al., 2004). 0.5 mL of CVE diluted extract was mixed with 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent and 0.5 mL of 10% Na₂CO₃. After 1 h of incubation at RT, the absorbance was measured at 760 nm. Total polyphenol content was calculated as gallic acid equivalents (mg/g) from an analytical curve. Total flavonoid content was determined using the aluminum chloride colorimetric method (Georgetti et al., 2007). 0.5 mL of 2% AlCl₃ ethanolic solution was added to 0.5 mL of CVE diluted extract. After 1 h at RT, the absorbance was measured at 420 nm. Total flavonoid content was calculated as quercetin equivalents (mg/g) from an analytical curve.

2.3.3 High-Performance Liquid Chromatography Analysis

The extract was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with L 2131 pump, L 2300 column oven injector at 25°C, and 2455 diode array detector (Hitachi, Tokyo, Japan). Separation was performed on an analytical reverse-phase column PurospherStar RP C18® (150 x 4.6 mm, 5 mm particle size, Merck, Germany), attached to a pre-column with the same features (4 x 4, 5 mm particle size, Merck, Germany). Mobile phase was 1% phosphoric acid (Pump A) and acetonitrile (Pump B) in a gradient of 80% A and 20% B for 0 min., 60% A and 40% B for 30 min., 30% A and 70% B for 35 min., 5% A and 95% B for 50 min with a flow rate of 0,8 mL/min. Sample solution was prepared diluting 50 µL of extract into 1.0 mL MeOH. Data was collected between 230 – 400 nm and the chromatogram was acquired at 330 nm. The results were analyzed by comparing ECV chromatogram and an authentic rosmarinic acid standard chromatogram. Data was analyzed by EZChrom Elite software (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.) (Matos et al., 2015).

2.4 Evaluation of *in vitro* antioxidant efficacy of CVE

2.4.1 Hydrogen-donating ability by DPPH• assay

The ability of CVE to scavenge DPPH• radical was measured by absorbance decrease due to suppression of the purple-colored radical (Blois, 1958; Casagrande et al.,

2006a; Georgetti et al., 2006). To prepare a concentration-response curve, 20 μL of CVE diluted sample, was added to the reaction media containing 1 mL of 0.1 M acetate buffer (pH 5.5), 1 mL of ethanol, and 0.5 mL of ethanolic solution of DPPH \cdot 250 μM . The final concentrations of CVE in each tube were 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 51,19 and 102,39 $\mu\text{g/mL}$. The absorbance was measured with a Helios alfa Thermo Spectronic $\text{\textcircled{R}}$ spectrophotometer at 517 nm after 15 min of incubation at RT. A positive control, correspondent to 100% free radical in solution, was prepared in the absence of CVE. All measurements were made in triplicate. The ability of scavenging DPPH \cdot was calculated as follows:

Equation I:

$$\% \text{ antioxidant activity} = \left[1 - \left(\frac{\text{absorbance of the sample}}{\text{absorbance of the control}} \right) \right] \times 100\%$$

2.4.2 Scavenging ability of CVE using ABTS+ assay

The ability to scavenge the ABTS+ free radical was measured by absorbance decrease due to suppression of the green-colored radical. The method was carried out according to Sánchez-Gonzalez et al. (2005). Radical cation ABTS+ was obtained after the reaction of 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate at RT in the dark for 16 h before use. This solution was diluted in phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) until absorbance of 0.7 at 730 nm. To prepare a concentration-response curve, 50 μL of CVE diluted sample were added to 4 mL of the diluted ABTS+ solution. The final concentrations of CVE in each tube were 1,01; 2,02; 4,04; 8,08; 16,16 e 32,31 $\mu\text{g/mL}$. The absorbance was measured with a Helios alfa Thermo Spectronic $\text{\textcircled{R}}$ spectrophotometer at 730 nm after 6 min of incubation at RT. A positive control, correspondent to 100% free radical in solution, was prepared in the absence of CVE. All measurements were made in triplicate. The ability of scavenging ABTS was calculated using equation I.

2.4.3 Evaluation of the Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP)

FRAP was evaluated according to Sánchez-Gonzalez et al. (2005), with some modifications. FRAP reagent was prepared with 2.5 mL of TPTZ solution (10 mM) in HCl (40 mM), 2.5 mL of 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution, and 25 mL of acetate buffer (pH 3.6, 0.3 mM). The solution was incubated at 37°C for 30 min. For the assay, 900 μL of FRAP reagent were added to 90 μL of water and 10 μL of Trolox standard or 10 μL of CVE (final concentration in the reaction media was 8,24 $\mu\text{g/mL}$). After incubation at 37°C for 30 min, the absorbance was measured with a Helios alfa Thermo Spectronic $\text{\textcircled{R}}$ spectrophotometer at 595 nm. An analytical curve with different concentrations of Trolox was used for subsequent calculation

of results in micromoles of Trolox equivalent per gram of extract. All measurements were made in triplicate (Sánchez-González et al., 2005).

2.4.4 Evaluation of iron-chelating power by bathophenanthroline (BPS) assay

The method is based on the decrease of absorbance for the reduction of the colored Fe^{2+} -bathophenanthroline complex ($\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$) by an antioxidant (Bolann and Ulvik, 1987). To prepare a concentration-response curve, 2 mL of reaction media containing 130 mM KCl and 10 mM Tris-HCl pH 7,4 were added of 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, and 50 μL of CVE diluted sample (final concentration of CVE in the reaction media were: 3,02; 6,04; 12,07; 24,15; 48,30; 96,60; 193,18; 241,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 15 minutes RT, 0,2 mM BPS were added, and the reaction was incubated again for 15 minutes RT. The absorbance was measured with a Helios alfa Thermo Spectronic® spectrophotometer at 530 e 700 nm (Casagrande et al., 2006b). A positive control was prepared in the absence of CVE and was considered 100% of $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$ complex. All measurements were made in triplicate. The iron-chelating activity was calculated using equation I.

2.4.5 Evaluation of iron induced lipid peroxidation (LPO) inhibition

Iron induced LPO inhibition was evaluated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Buege and Aust, 1978). To prepare a concentration-response curve, to 1 mL of reaction media (130 mM KCl, 10 mM tris-HCl, pH 7,4), 2 mM sodium citrate; 10 μL of CVE diluted sample (final concentrations of CVE in the reaction media were: 1,90; 3,80; 7,59; 15,18; 30,36; 60,71; 121,43 e 242,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$); a lipid source (mice mitochondria suspension at the concentration of 1mg of protein/mL in the reaction media); and 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ were added. The reaction was incubated at 37 °C for 30 minutes. To determine TBARS concentration, 1 mL of 1% TBA was prepared in NaOH 50 mM and 0,1 mL of 10 M NaOH and 0,5 mL of 20% H_3PO_4 were added. The reaction was incubated for 20 minutes at 85°C. TBARS were extracted with 2 mL of n-butanol, the samples were centrifuged at 2000 g for 10 minutes and the absorbance was measured with a Helios alfa Thermo Spectronic® spectrophotometer at 535 nm. A positive control was prepared in the absence of CVE and iron. A blank was prepared with absence of mitochondria. All measurements were made in triplicate. Evaluation of iron induced lipid peroxidation (LPO) inhibition was calculated using equation I.

2.4.6 Evaluation of lipoperoxidation (LPO) inhibition

LPO was evaluated through the formation of lipid hydroperoxides (LOOH) (Lingnert et al., 1979). To prepare a concentration-response curve, 10 μL of CVE diluted was added to 2 mL of 10 mM linoleic acid emulsion in 0,1 M phosphate buffer (pH 6.5) containing tween 20.

The final concentrations of CVE in the tubes were: 1,06; 2,13; 4,26; 8,52; 17,03; 34,06; 68,12; 136,24 $\mu\text{g/mL}$. After 8 h incubation at 37°C 1 mL of methanol and 3mL of methanol 60% were added to the reaction. The absorbance was determined at 234 nm with a Helios alfa Thermo Spectronic® spectrophotometer (Martinez et al., 2012). A positive control was prepared with absence of CVE and a blank was prepared containing phosphate buffer 0.1 M (pH 6.5) with tween 20. LPO was calculated as follows:

Equation II:

$$\% \text{ antioxidant activity} = \frac{1 - (\text{Abs } S \text{ after incubation} - \text{Abs } S \text{ before incubation})}{(\text{Abs } C \text{ after incubation} - \text{Abs } C \text{ before incubation})} \times 100$$

Abs S = sample absorbance

Abs C = control absorbance

2.4.7 Chemiluminescence assay

2.4.7.1 H₂O₂/luminol/(horseradish peroxidase) HRP system

This method is based on the capacity of inhibition of luminescence emitted by luminol as a consequence of the formation of the complex H₂O₂-peroxidase. The reaction media was prepared immediately before the analysis as follows: 380 μL of phosphate buffer (0.1M; pH 7,4) and 10 μL de luminol (final concentration in reaction media of $1,13 \cdot 10^{-4}\text{M}$). To prepare a concentration-response curve, 10 μL of CVE diluted sample were added and the final concentrations of CVE in each tube were: 0,13; 0,19; 0,25; 0,38; 0,51; 0,76; 1,02 $\mu\text{L/mL}$. The addition of H₂O₂ (final concentration in reaction media of $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$) and HRP solution (final concentration in reaction media of 0,2 U/mL) starts the reaction. Chemiluminescence was measured for 10 seconds at RT with Sirius Berthold Detection Systems. A positive control was prepared in the absence of CVE. Quercetin antioxidant activity was also determined as a reference substance. The H₂O₂/luminol/HRP inhibition activity was calculated as follows:

Equation III:

$$\% \text{ antioxidant activity} = \left[1 - \left(\frac{\text{chemiluminescence of the sample}}{\text{chemiluminescence of the control}} \right) \right] \times 100\%$$

2.4.7.2 Xanthine/luminol/xanthine oxidase (XOD) system

This method is based on the capacity of inhibition of luminescence generated by luminol as a consequence of the xanthine-xanthine oxidase reaction. The reaction media was prepared immediately before the analysis as follows: 400 μL of glycine buffer (0.1M; pH 9.4; 1mM EDTA), 150 μL de xanthine (6mM in glycine buffer), and 10 μL of luminol. To

prepare a concentration-response, 10 μL of CVE diluted sample were added and the final concentrations of CVE in each tube were: 0,037; 0,070; 0,300; 0,600; 1,200; 2,390; 4,780; 9,560 $\mu\text{L}/\text{mL}$. To begin the reaction, 100 μL XOD (20 IU/ml in 0.1mM EDTA). Chemiluminescence was measured for 10 seconds at RT with Sirius Berthold Detection Systems. A positive control was prepared in the absence of CVE. Quercetin antioxidant activity was also determined as a reference substance. The xanthine/ luminol/ xanthine oxidase inhibition activity was calculated using equation III.

2.5 Evaluation of *in vivo* anti-inflammatory and antioxidant efficacy of CVE

2.5.1 Animals

In vivo experiments were performed using sex matched hairless mice (HRS/J), weighing 20–30 g, obtained from the University Hospital of Londrina State University. Mice were kept at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 2$, in a 12 h light and 12 h dark cycle, with free access to water and food. The experimental protocol for this study was approved by The Animal Ethics Committee of the Londrina State University (CEUA) n^o 030/201/ process n^o 1818.2015.2400. Hairless mice were randomly designed to groups with 5 mice each, as follows: non-radiated control, radiated control, radiated and treated with CVE. Treated groups received oral dilutions of CVE in water in the doses of 10, 30, and 100 mg/kg, 1 h before the radiation session and immediately after. The UVB source used was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holland) emitting a continuous spectrum between 270 and 400 nm with a peak emission at 313 nm cm^2 (Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014). There was 20 cm distance between the lamp and the mice, with a radiation of 0.209 mW/cm^2 . An IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with UV (SED005) and UVB (SED240) sensors was used to determine the radiation intensity. The inflammation inducing UVB dose was 4.14 J/cm^2 (Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014; Shindo et al., 1994). Groups were radiated simultaneously. Mice were terminally anesthetized with 5% isoflurane (Abbott [Abbott Park, IL, USA]) 12 h after radiation exposure for edema, GSH, FRAP, ABTS, myeloperoxidase (MOP), metalloproteinase-9 (MMP-9) tests and histology analysis; anesthetized and decapitated 4 h after the exposure for cytokine levels, lipid peroxidation and qPCR tests, and 2 h after the exposure for catalase activity and NBT tests. Afterwards the full thickness of the dorsal skin was removed. Samples collected for edema determination were weighed immediately after the dissection, samples for histology were kept in formol 10% at RT until analysis, and samples for the remaining tests were stored at -70°C until analysis.

2.5.2 Skin edema.

Skin edema was determined by the increase of weight in the dorsal skin (expressed in mg) exposed to UVB radiation. Samples with the same area were cut with the aid of a mold and weighed. The results from non-exposed and exposed controls were compared with the results from CVE treated mice (Afaq et al., 2005; Bhatia et al., 2011; Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014).

2.5.3 Myeloperoxidase (MPO) and neutrophil infiltration

Neutrophil infiltration was indirectly determined by MPO activity. MPO catalyzes the oxidation of *o*-dianisidine to a colored compound (Bradley et al., 1982; Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Ivan et al., 2014). Each sample of skin (weighing around 30 mg) was homogenized with 400 μ L of 0.05 M (pH 6.0) phosphate buffer added of 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB) with the aid of a Tissue-Tearor (Biospec®). The resulting homogenate was centrifuged at 16,100 g for 2 minutes at 4°C. The reaction was performed adding 200 μ L of 0.0167mg/mL *o*-dianisidine in 0,05 M phosphate buffer (pH 6,0) and 0.015% hydrogen peroxide to a 30 μ L aliquot of the sample supernatant. Absorbance was measured at 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) and compared to a neutrophil standard curve. Results were expressed as number of neutrophils/mg of skin.

2.5.4 Cytokine measurement.

Each sample of skin was homogenized in 500 μ L of saline solution with the aid of a Tissue-Tearor (Biospec). The homogenates were centrifuged (2,000 g, 15 min, 4°C) and supernatants were used to measure the cytokine levels by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (eBioscience) (Verri et al., 2008). Absorbance was determined at 450 nm and the results were expressed as picograms (pg) of each cytokine/mg of skin.

2.5.5. Metalloproteinase-9 (MMP-9)

MMP-9 was determined by zymography in polyacrylamide sodium dodecyl sulphate (SDS) added of gelatin (Fonseca et al., 2010; Vicentini et al., 2011). The quantification was based on the degree of gelatin degradation by MMP-9 (Kim et al., 2007). Each skin sample was homogenized in 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) phosphate buffer added of 10 mM CaCl₂ and 1% proteinase inhibitors (phenanthroline, phenyl methyl sulfonyl fluoride, and *n*-ethylmaleimide). The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 4°C and 50 μ L of the supernatant were diluted in 10 μ L Tris/HCl (pH 6.8) buffer added of 20% glycerol, 4% SDS and 0.001% bromophenol blue. The samples were placed at 37 °C for 8 minutes before applied to the electrophoresis gel (13.5% acrylamide and 0.025% gelatin). The

running buffer was 190 mM Tris/glycine (pH 8.3) added of 0.1% SDS, and the run was performed at a current of 13 mA. After the procedure, the gel was washed with 2.5% Triton-X solution, under agitation, for 1 h and then incubated for 12 h at 37°C in 50mM Tris-HCl (pH 7.4) added of 5 mM CaCl₂. The gel was stained with Coomassie Blue and washed with a 20% acetic acid solution. Enzymatic activity was detected by discolored zones against dark background. Proteolytic activity was quantitatively analyzed by comparing data from treated and untreated animals using ImageJ® software (NIH, Bethesda, MD, USA). (Casagrande et al., 2006a; Fonseca et al., 2010; Martinez et al., 2015a; Onoue et al., 2003).

2.5.6 FRAP assay.

Each skin sample was homogenized with 400 µL of KCl (1.15%), using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C). A 30 µL aliquot of the supernatant was mixed with the FRAP reagent (0.3 mM acetate buffer pH 3.6; 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine in 40 mM hydrochloride acid; and 20 mM ferric chloride). The absorbance was determined at 595 nm. The results were compared to a Trolox curve (0.01 – 20 nmol) and presented as nmol Trolox equivalent per mg of skin (Katalinic et al., 2005).

2.5.7 ABTS assay

The ABTS radical scavenging ability of skin was measured by the decrease in absorbance at 730 nm. Each skin sample was homogenized with 400 µL of KCl (1.15%), using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C). A 7 µL aliquot of the supernatant was mixed with ABTS reagent (7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate) diluted with phosphate buffer pH 7.4 to obtain absorbance of 0.7 at 730 nm. Samples absorbance were determined after 6 min at 730 nm. The results were compared to a Trolox curve (0.01–20 nmol) and presented as nmol Trolox equivalent per mg of skin.

2.5.8 Catalase assay

Catalase activity was evaluated by the decay of H₂O₂ concentration with generation of oxygen (Aebi, 1984). Each skin sample was homogenized in 500 µL of 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). The reaction mixture contained 10 µL of sample, 160 µL 1M Tris-HCl buffer with 5 mM EDTA (pH 8.0), 20 µL of deionized water and 20 µL 200 mM of H₂O₂. Catalase activity was determined at 25°C through the difference between the initial reading and the reading conducted 30 seconds after the addition of H₂O₂ at 240 nm. Catalase values were expressed as unit of catalase/mg of skin/minute.

2.5.9 Lipid peroxidation (LPO)

LPO was measured by tert-butyl lipid hydroperoxides-initiated chemiluminescence (Gonzalez Flecha et al., 1991). Each skin sample was homogenized in 800 μL of phosphate buffer (pH 7.4), using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (700 g, 2 min, 4°C). A 250 μL aliquot of the supernatant was diluted in 1730 μL reaction medium (120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4) and mixed with 20 μL of 3 mM tert-butyl hydroperoxide. The reading was performed using a β -counter Beckman1LS 6000 SC (Fullerton, CA, USA) with a response range between 300 and 620 nm. The vials were kept in the dark until the moment of the test, and the determinations were also performed in the dark to avoid vial phosphorescence activated by light. The experiment was conducted at 30°C. The results were measured in counts per min (cpm) per mg of skin.

2.5.10 Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production

The measurement of $\text{O}_2^{\cdot-}$ production in the skin was performed using the NBT assay (Campanini et al., 2013). Each skin sample was homogenized in 500 μL of 0.02 M EDTA, using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (2,000 g, 20 seconds, 4°C). A 50 μL aliquot of the supernatant was incubated in 96-well plate for 1 h. The non-adherent/non-precipitated supernatant was carefully removed, followed by addition of 100 μL of NBT (1 mg/ml) to each well and incubated for 15 min. NBT reaction medium was then carefully removed followed by fixation in methanol 100%. Formazan particles were dissolved by adding 120 μL of KOH 2M and 140 μL of dimethylsulfoxide. Reduction of NBT to formazan was measured at 620 nm and the results were presented as optical density (OD) per 10 mg of skin.

2.5.11 GSH assay

GSH method is based on the detection of the yellow compound 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid formed by 5',5'-dithyobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) breakage of disulfide bond by glutathione sulfhydryl group. Each skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec). Whole homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid and were centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). The reaction mixture contained 50 μL of sample supernatant, 100 μL of 0.4 M Tris and 5 μL of a 1.9 mg/mL solution of DTNB in methanol. The absorbance was measured at 405 nm. Data was analyzed using a standard curve of GSH (5–150 μM) and the results were presented as μM GSH per mg of skin (Srinivasan et al., 2007).

2.5.12 Reverse transcriptase (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Each skin sample was homogenized in Trizol reagent and total mRNA was isolated according to manufacturer's directions. mRNA purity was confirmed by the 260/280 ratio. RT-PCR and quantitative PCR were performed using GoTaq12-Step RT-qPCR System

(Promega) on a Step One Plus TM Real-Time PCR System (Applied Biosystems¹). The relative mRNA expression was measured using the comparative 2⁻ ($\Delta\Delta C_q$) method. The expression of ACTB mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples (Martinez et al., 2016b). The primers used were:

ACTB, sense 5'- CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT-3',
antisense 5'- CGTCACACTTCATGATGGAATTGA-3';

Nrf2, sense: 5' TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA-3',
antisense: 5'- TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT-3';

HO-1, sense: 5'- CCCAAAAGTGGCCTGTAAAA-3';
antisense: 5'-CGTGGTCAGTCAACATGGAT 3';

Nqo-1, sense: 5'- TGGCCGAACACAAGAAGCTG-3',
antisense: 5'-GCTACGAGCACTCTCTCAAACC-3';

2.5.13 Skin histologic evaluation

Dorsal skin samples were collected in formaldehyde 10%, fixed in paraformaldehyde 4%, dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene, embedded in paraffin and sectioned to a thickness of 5 μ m. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Toluidine Blue and Masson's Trichrome stains.

The sections stained with HE were examined using light microscopy at 400 x magnification for determination of epidermal thickness (Deng et al., 2016) and a 1000 x magnification for counting the number of sunburn cells (Schwarz et al., 1995). For mast cell count, the sections were stained with Toluidine Blue and analyzed under light microscopy at 400 x magnification. Both analyses were done with the software Infinity Analyze (Lumenera R Software).

The sections stained with Masson's Trichrome were examined using light microscopy at a magnification of 100 x. Density of collagen fibers was analyzing by the intensity of the blue coloration in the dermal areas of the skin. UVB unexposed and exposed controls were compared to CVE treated group with the aid of Image J software (NIH) (Gilchrest, 2016).

2.6 Statistical analysis

CVE *in vitro* half maximal inhibitory concentrations (IC 50) were determined using hyperbolic curve equation from GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

In vivo statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test. Results were presented as mean \pm standard error (SEM) of measurements made with 5 animals in each group per experiment. The results were representative of 2 separate experiments and were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results:

3.1 Extract characterization

According to the results, CVE presents a total polyphenol content of 78.85 mgEq.GA/g extract, and total flavonoid content was 16.97 mgEq.Q/g extract. These results are related to the dry weight of the extract, which is equal to 633.6 mg/g. Rosmarinic acid was positively identified by HPLC-DAD compared to authentic standard at retention time (RT) 13,9 minutes (Figure 1A, B).

3.2 *In vitro* antioxidant activity of CVE

C. verbenacea ethanolic leaves extract *in vitro* antioxidant activity was evaluated by different methods and all the results showed concentration-response relationship. CVE showed FRAP results equal to 886,32 μM of equivalent of Trolox/g extract. For hydrogen donating capacity to DPPH \cdot assay, CVE presented IC_{50} of 19.128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2A). For electron donating ability to ABTS $^+$, IC_{50} of 12.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2B). Data from prior work showed quercetin IC_{50} of 1.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DPPH \cdot and ABTS $^+$ tests, respectively (Martinez et al., 2012).

Results from this work showed that CVE was able to inhibit the production of hydroperoxides from linoleic acid with IC_{50} of 10.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2C), demonstrated ability to inhibit thiobarbituric acid reactive substances with IC_{50} 8.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2D) and iron chelating ability, measured by bathophenanthroline assay with IC_{50} 47,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2E). Data from prior work show quercetin values as IC_{50} of 0.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for linoleic acid iron-independent lipid peroxidation, iron-dependent peroxidation, and iron chelation assays, respectively (Martinez et al., 2012).

Results from chemiluminescence showed that CVE was able to inhibit chemiluminescence triggered by free radicals with IC_{50} 0,286 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the H_2O_2 /luminol/HRP (Figure 3A) method and IC_{50} 0,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for xanthine/luminol/XOD method (Figure 3C). In this work quercetin presented IC_{50} of 0.043 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for H_2O_2 /luminol/HRP method and xanthine/xanthine oxidase/luminol method, respectively (Figures 3B, D).

3.3 *In vivo* studies

3.3.1 Edema and MPO

Edema was measured by the increase in weight of standard skin samples. Results showed that skin exposed to UVB radiation significantly increased weight when compared to non-radiated control group. Treatment with CVE 30 and 100 mg/kg was able to control edema, thus there was no significant difference between the groups treated with CVE 30 and 100 mg/kg and non UVB exposed control group. Treatment with 10 mg/Kg was unable to control edema (Figure 4A). UVB radiation led to elevated MPO activity. Treatment with CVE at 10, 30 and 100 mg/Kg promoted significant inhibition of MPO activity with no significant differences between the doses (Figure 4B). These results indicate that CVE was able to control UVB radiation-induced neutrophil infiltration.

3.3.2 Metalloproteinase 9 (MMP-9) and collagen intensity

UVB exposure significantly increased MMP-9 level but treatments with CVE 30 and 100 mg/kg were able to inhibit this effect with no significant difference between the doses. However, 10 mg/kg did not show significant inhibitory effect on UVB-induced MMP-9, what suggests that, among the tested doses, 30 mg/kg is the lower dose to offer protective and anti-inflammatory effect (Figure 5A, B). Because MMP-9 is a gelatinase related to collagen degradation, histological assessment of collagen density was also performed, and 30 mg/kg was the dose of choice to perform this test. Results from sections stained with Masson's Trichrome showed that UVB-exposure led to intense collagen fiber degradation, while treatment with CVE 30 mg/Kg demonstrated protective effect against collagen fibers damage (Figure 5C, D).

3.3.3 Cytokines

UVB radiation induced the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, however treatment with CVE 30 mg/Kg was able to control this effect (Figure 6).

3.3.4 Mast cells

Histological analysis of blue toluidine stained skin sections of UVB-exposed mice showed an increase in number of mast cells in the dermis. Samples from animals treated with CVE 30 mg/kg did not show this effect (Figure 7).

3.3.5 mRNA expression for Nrf-2, NQO-1 and HO-1

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) showed that the expression of Nrf2 after 4h of UVB radiation exposure was significantly lower when compared to non UVB exposed animals (Figure 8A). Consequently, the expression of NQO-1, a Nrf2 dependent antioxidant enzyme was also low (Figure 8B). Treatment with CVE 30 mg/kg was able to enhance Nrf-2 and NQO-1 expression (Figure. 8 A, B). As for HO-1, UVB significantly induced its mRNA expression and CVE increased it even further (Figure 8C).

3.3.6 Skin antioxidant capacity and lipoperoxidation

Samples from untreated UVB exposed control group in this work showed significant decrease of antioxidant capacity as measured by FRAP and ABTS assays, as well as low GSH levels and decreased catalase activity compared with not UVB exposed controls (Figure 9A, B, C, D). FRAP and ABTS assays demonstrated that treatments with CVE 30 mg/Kg was able to maintain the skin antioxidant capacity of UVB exposed animals (Figure 9A, B). Results showed that treatment with CVE was able restore GSH levels (Figure 9C)

and catalase activity (Figure 9D). Also, according to observed results, even though UVB exposure increased the production of $O_2^{\cdot-}$ radical and lipid peroxidation, treatment of UVB-exposed group with CVE 30 mg/kg was able to control both $O_2^{\cdot-}$ and lipid peroxides production (Figure 9E, D).

3.3.7 Epidermal thickness and *sunburn* cells

Epidermal thickness and the presence of sunburn cells are common histopathological features of UVB exposed skin. In this work, skin samples from UVB exposed animals were significantly thicker than samples from non UVB-exposed mice, but treatment with CVE 30 mg/kg was able to maintain epidermal thickness like unexposed controls (Figure 10A). In the same way, UVB increased the number of *sunburn* cells and skin from animals treated with CVE 30 mg/kg did not show this effect (Figure 10B).

4. Discussion

4.1 Extract characterization

Plants are a great source of molecules with a variety of biological activities, among which anti-inflammatory and antioxidant are frequently found (Bellik et al., 2013). UVB radiation induces several pathological responses of the skin, most of which are linked to its high energy and to its ability to promote inflammation and oxidative stress (Fuchs et al., 2001). Because of the synergism of the compounds present in extracts, these plant derivatives may be a useful tool to counteract the myriad of skin responses to UVB (Afaq et al., 2005). Data from this work show that CVE presents polyphenols, flavonoids, and rosmarinic acid (RA), substances regarded both as anti-inflammatory and antioxidant.

4.2 CVE demonstrates *in vitro* antioxidant activity

FRAP estimate a molecule antioxidant capacity by evaluating its reducing ability through electron transfer to Fe^{+3} -TPTZ (Wojdyło et al., 2007). The results are compared with Trolox reducing ability through a calibration curve. Fernandes et al (2016) analyzed the antioxidant potential of 13 herbs through FRAP assay and classified then in 5 groups: (a) very low FRAP (<10 μ M/g); (b) low FRAP (10 – 50 μ M/g); (c) good FRAP (50 – 100 μ M/g); (d) high FRAP (100 – 400 μ M/g); (e) very high FRAP (>400 μ M/g). Based on this criterion, CVE can be classified as very high FRAP extract. According to the same author *Rosmarinus*

officinalis, a plant with very high contents of RA showed $361,57 \pm 33,72 \mu\text{M/g}$, what once again can be explained by the synergic action of several electron donating species in CVE.

Results showed that CVE compounds presents reasonable hydrogen donating ability to radical DPPH (Casagrande et al., 2007) and also ability to donate an electron to ABTS, the last result is aligned with the results found earlier by Michielin et al. (2011) for a Soxhlet hydro-ethanolic extract. This was the higher ABTS value obtained by that author after testing several methods and solvents. In the view of this, CVE in this work presents a good antioxidant potential based on ABTS assay.

CVE ability to inhibit lipoperoxidation, corroborated by Roldão et al. (2008), also demonstrates the wide range its antioxidant capacity. An antioxidant molecule could control lipoperoxidation through scavenging of initiating free radicals, chelating metallic ions, suppressing Fenton reaction through iron complexing, and inhibiting enzymatic systems responsible for free radical production (Brewer, 2011; Ivan et al., 2014). It has been already established that CVE is rich in reducing chemical species, what contributes to inhibit free radicals responsible for initiating lipoperoxidation. Flavonoids have also metal chelating ability (Casagrande et al., 2006b; Heim et al., 2002), which could be involved in lowering the production of high energy hydroxyl radical by neutralizing Fe^{2+} involved in iron dependent lipoperoxidation.

Results from chemiluminescence also show CVE scavenging capacity. For the H_2O_2 /luminol/HRP, HRP reacts with luminol to form a half-reduced enzyme and radical luminol. The enzyme returns to the reduced form by reacting with another luminol molecule (Dodeigne et al., 2000). The presence of antioxidant compounds in CVE led to a reduction of light emission, what can be considered a measure of antioxidant activity. For the xanthine/luminol/XOD method, in the presence O_2 , the enzyme XOD reacts with its substrate producing $\text{O}^{\cdot-}$, which causes luminol to oxidase and rearrange its molecule by emitting light. The presence in CVE of molecules able to scavenge $\text{O}^{\cdot-}$ led to reduction of light emission (Correa, Vitorino, 2002).

CVE polyphenol and flavonoid composition makes it a very promising antioxidant against UVB-induced oxidative stress. In general, because of the multiple hydroxyl groups and a structural ability to accommodate unpaired electrons, by resonance or hyperconjugation, after electron or hydrogen donation, flavonoids have demonstrated very efficient antioxidant capacity (Machado, Domínguez-Perles, 2017; Zheng and Wang, 2001). RA is also known to have antioxidant properties, mainly due to its scavenging activity, which is reportedly three times higher than Trolox (Alamed et al., 2009; Cao et al., 2005). RA scavenging efficiency may be attributed to its molecular structure that contains four phenolic hydrogens. Furthermore, the presence of two catechol moieties in the molecule provides the adequate polarity for RA to penetrate lipid bilayers and protect them from peroxidation

without disrupting their structures (Petersen and Simmonds, 2003). Compared with some flavonoids, RA may have an equal or even greater antioxidant capacity, probably to its high hydrogen-donating ability from the two hydroxyls in two phenolic rings (Cao et al., 2005).

Cordia verbenacea is already well recognized by its anti-inflammatory activity, although, to our knowledge, there are just few works that relate anti-inflammatory and antioxidant activity of the plant *in vivo*. One of them shows that *C. verbenacea* presents potent anti-ulcer activity and suggests a correlation with the plant ability to inhibit lipid peroxidation reported in the same study (Roldão et al., 2008).

4.3 CVE inhibits inflammation and oxidative stress induced by UVB irradiation in hairless mice.

Sunburn is the first and the most characteristic acute response of the skin to high doses of UV irradiation from the sun. Erythema and perivascular edema, as well as leucocyte infiltration, are the central features of this acute inflammatory response (Guaratini et al., 2007; Martinez et al., 2015a; Pérez-Sánchez et al., 2018).

Edema is one of the hallmarks of skin response to UVB energy. UVB induces hydrolysis of polyunsaturated fatty acids, that are metabolized by cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs) and may produce eicosanoid mediators that modulates different stages of inflammation. Prostaglandin E₂ (PGE-2), one of these mediators, plays an important roles in vasodilation that generates edema (Rhodes et al., 2019, 2001). CVE anti-edema activity has been well reported in other models of inflammation, for instance in acute model of carrageenan-induced edema and vascular permeability in rats (Sertié et al., 1988); crude dichloromethane *C. verbenacea* extract (300 and 1000 mg/kg) reduced edema by 42, 57 and 45% and 46, 62 and 69%, 3, 4 and 5h after carrageenan administration, respectively (Bayeux et al., 2002); methanolic *C. verbenacea* extract inhibited footpad edema induced by *Bothrops jararacussu* venom, and RA isolated from this extract inhibited the edema and venom-induced myotoxicity (Ticli et al., 2005). Isolated compounds from the *Cordia* genus have also shown anti-edema activities: caffeic acid, rosmarinic acid and quercetin isolated from *Cordia sinensis* showed significant anti-inflammatory activity in the carrageenan-induced rat paw edema test (Al-Musayeib et al., 2011). According to the findings of Bayeux (2002), *C. verbenacea* crude ethanolic extract was 54 times more effective in the reduction of edema than arthemintin, the flavonoid isolated from the extract.

UVB-induced activation of receptors, production of ROS and damage to DNA and macromolecules induce keratinocytes and immune cells to produce cytokines, chemokines and other inflammation mediators (Ahmed et al., 2017; Reuter et al., 2011; Rhodes and Lim, 2007). These mediators recruit more inflammatory cells such as neutrophils and macrophages (Halliday, 2005). Neutrophils, by their turn, release potent proteolytic enzymes,

and more pro-inflammatory cytokines account for more ROS production (Rijken and Bruijnzeel-Koomen, 2011). The heme enzyme MPO, which is stored in azurophilic granules inside neutrophils, plays an important role in the antibacterial defense of the cells through production hypochlorous acid, and serve as a marker for the presence of neutrophils and inflammation (Bradley et al., 1982; Casagrande et al., 2006b; Pulli et al., 2013). Results indicate that CVE was able to control neutrophil infiltration and the cyclic production of inflammatory mediators that results from UVB exposure. Corroborating these results, lyophilized ethanolic *C. verbenacea* leaves extract demonstrated high anti-inflammatory activity and very low toxicity when administered orally to mice (Sertié et al, 1998). Rosmarinic acid, identified in CVE in this work and also by other authors in *C. americana* and in *C. verbenacea* ethanolic extracts (Geller et al., 2010; Matos et al., 2015; Ticli et al., 2005), is already known to inhibiting phospholipase A2 (PLA2) (Dos Santos et al., 2011; Ticli et al., 2005), cicloxygenase-2 (Kelm et al., 2000), 5-lipoxygenase (Nichols, Katyar, 2010; Geller, 2010), and the cytokines cascade induced by ROS (Gamaro et al., 2011; Lembo et al., 2014) resulting in less exudation and reduced neutrophil activation, corroborating the results presented in this work.

The mast cell is resident within the dermis where it plays an important role in UV-induced inflammation. UVB exposure increases not only the overall number of these cells, but also the number of hypogranulated and degranulated mast cells, what can be observed through histological examination (Clydesdale et al., 2001). Mast cells release histamine, TNF α , and IL-1 β to stimulate the expression of metalloproteinase in keratinocytes and fibroblasts, and also to attract other neutrophils, aggravating inflammation process (Cezar et al., 2019). CVE inhibition of mast cells is another mechanism through which the extract demonstrates its ability to control the inflammation and oxidative stress cycle generated by UVB.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) constitutes a group of inducible transcription factors that regulates a large array of genes involved in different aspects of the immune and inflammatory responses (Hayden and Ghosh, 2008; Karin and Greten, 2005; Liu et al., 2017). In the inflammatory reaction induced by UVB, NF- κ B is linked to the increased expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β , IL-6, and TNF- α , all of which play important roles in the inflammation and skin damage induced by UVB (Ahmed et al., 2017; Na and Ryu, 2018; Reuter et al., 2011; Vicentini et al., 2011). Considered as primary pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α are also involved in the induction of ROS, therefore perpetuating their own activation and activity (Fuchs et al., 2001). Furthermore, TNF- α is associated with cell invasion and angiogenesis, and both TNF- α and IL-6 are associated with cell proliferation and antiapoptotic response (Lin et al., 2007). Therefore, inhibition of cytokines can be considered a protective measure against UVB-

induced skin damage and cancer development. In this sense, it was observed that treatment with CVE 30 mg/Kg was able to significantly control UVB-induced TNF- α , IL-1 β , and IL-6, demonstrating even further, the therapeutic potential of CVE in UVB-induced inflammation.

Studies have shown that the exposure of several cell types (neutrophils, macrophages, mast cells, keratinocytes, and endothelial cells) to UVB promotes the activation of the transcription factor AP-1 (Afaq et al., 2005; Cooper and Bowden, 2007), leading to the increase of the expression of genes linked to metalloproteinases such as MMP-9 (Rabe et al., 2006; Svobodova et al., 2006). These gelatinases are associated with leukocytes infiltration, increase of inflammatory process, cell ageing, and the invasive and metastatic potential of cancer cells (John and Tuszynski, 2001; Martinez et al., 2015b; Rijken and Bruijnzeel-Koomen, 2011). Activation of AP-1 can occur as an effect of UVB direct stimulus, oxidative stress, and also as a consequence of cytokine increased receptor activation, especially for TNF- α and IL-1 β (Chen et al., 2012; Duan et al., 2019; Rabe et al., 2006; Xu and Fisher, 2005). As the whole inflammatory process itself, UVB-induced increase of MMP-9 involves an intricate network. Therefore, CVE ability to control MMP-9 activity may demonstrate the broad anti-inflammatory/antioxidant mechanism of the plant and its effectiveness.

Exposure to UV radiation is already established as a major leading factor to increased production of ROS, which is also known to promote oxidative damage to DNA, proteins and lipid peroxidation (Guaratini et al., 2007; Wei et al., 2002). Further increase of ROS leads to the depletion of the natural antioxidant system, a condition known as oxidative stress (Fonseca et al., 2010; Poprac et al., 2017; Svobodova et al., 2006; Xu and Fisher, 2005).

Cell integrity against oxidative damage is maintained by natural antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic, that are found in higher concentration in the epidermis than in the dermis (Lephart, 2016; Shindo et al., 1994). Among these antioxidant molecules, one of the most relevant is GSH, a hydrophilic tripeptide that features a sulfhydryl group, ready to react with free radicals (Meloni et al., 2003; Valko et al., 2007). GSH plays a key role in the cell antioxidant system, specifically in the neutralization of H₂O₂ avoiding the formation of the deleterious \cdot OH and in the inhibition of lipoperoxidation (Shah and Rawal Mahajan, 2013). It can also have a direct scavenging free radical activity through its hydrogen donating sulfhydryl groups (Carini et al., 2000; D'Orazio et al., 2013) or indirect antioxidant activity as a substrate for the enzyme GPx that catalyzes the reduction of ROS producing GSSH, which is reduced to regenerate GSH (Halliwell, 2009; Valko et al., 2007). Because GSH is considered an early and effective sensor of UVB-induced oxidative stress, its determination can be used as an effective tool to investigate cellular redox homeostasis (Casagrande et al., 2006b; Huber et al., 2008; Meloni et al., 2003). Corroborating with prior works, we found that there was a strong depletion of GSH 12 h after UVB exposure

(Campanini et al., 2014, 2013; Casagrande et al., 2006b). This depletion was minimized by treatment with CVE.

CVE was also able to restore skin antioxidant potential as measured by FRAP and ABTS assays. Results from *in vivo* FRAP and ABTS, in agreement with data already reported (Ivan et al., 2014; Martinez et al., 2015a; Martinez et al., 2015b), showed that radiation led to depletion of the natural antioxidant system of the skin, since radiated samples demonstrated significant lower antioxidant capacity than non-radiated samples by both methods. FRAP assay correlates with levels of ROS scavenger molecules such as ascorbic acid, uric acid and α -tocopherol while ABTS assay correlates well with levels of endogenous GSH (Benzie, Strain, 1996; Katalinic et al., 2005). Therefore, CVE shows ability to restore natural antioxidant capacity of the skin.

Organic antioxidant defense mechanisms depend on the stimulation of a signal transduction pathway that leads to the activation of antioxidant related transcription factors and gene expression. Known as antioxidant response element (ARE), this pathway has as final goal the modulation of the expression of oxidative stress related genes (Garmyn and Yarosh, 2007). Nuclear erythroid factor (Nrf2) is one of the transcription factors that activates ARE related genes. Nrf2 pathway is important not only for the regulation of the cell oxidation-reduction state of the cell, but also for modulation of its immune and anti-inflammatory response (Zhang et al., 2005). Target genes of this pathway encode a series of cytoprotective proteins such NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1), heme-oxygenase 1 (HO-1), and catalase (Kobayashi and Yamamoto, 2005; Nguyen et al., 2009). HO-1, for instance, catabolizes heme into carbon monoxide CO, biliverdin (which is rapidly converted to bilirubin) and free iron (which leads to the induction of ferritin, an iron-binding protein). The induction of ferritin and of an ATPase pump that actively removes intracellular iron from the cell was identified as the mechanism through which HO-1 provides protection to cells against oxidative stress (Choi et al., 2013; Otterbein et al., 2003). Bile pigments: bilirubin and biliverdin also are reported to have antioxidant properties (Stocker et al., 1990), and HO-1 functions as protective gene due to the anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-proliferative actions of one or more of its products (Otterbein et al., 2003). It was also found that expression of genes encoding the detoxifying enzymes catalase is reduced in Nrf2 knockout mice, suggesting that they are also targets of Nrf2 (Braun et al., 2002). Furthermore it was demonstrated that inhibition of Nrf2 enhances the expression transcription factors as NF- κ B (Mao et al., 2010), induction of inflammatory mediators such as IL-1 β and IL-6, raises the number of sunburn cells (Saw et al., 2011), and the expression of MMP-9 (Saw et al., 2014). Data from this work shows that UVB irradiation lowered the expression of Nrf2 and NQO-1, but raised the expression of HO-1 in the skin after the irradiation. HO-1 responds to several stress conditions, including the resolution of inflammation and natural killer NK cell-mediated

citotoxicity, what may help to understand the reason why, although it is an enzyme downstream from Nrf2 cascade, HO-1 increased while Nrf2 decrease and other enzymes related to it were inhibited (Martinez et al., 2016a, 2016b). Treatment with CVE 30 mg/Kg increased Nrf2 mRNA expression, with consequent increase of HO-1, NQO-1 expression and maintenance of catalase activity and GSH levels. RA has already demonstrated ability to enhance antioxidant effects and attenuate UVB-induced damage and oxidative stress in human HaCat cells by enhancing the expression of Nrf2 with consequent increasing of the expression and activity of SOD, catalase, and HO-1 (Fernando et al., 2016). Nrf2 natural inducers must have the ability to react with sulphhydryl groups by alkylation, oxidation or reduction; among the molecules with this ability are flavonoids, terpenoids, cinnamic acid and its derivatives (Kumar et al., 2014; Staurengo-Ferrari et al., 2019), all of which were already reported in *C. verbenacea* (Bayeux et al., 2002; Geller et al., 2010; Gilbert and Favoreto, 2013; Matias et al., 2015; Matos et al., 2015; Michielin et al., 2009; Ticli et al., 2005).

In agreement with the exposed, CVE also restored catalase activity preventing damage to DNA and other macromolecules. The reduction of catalase activity after exposure to UVB irradiation has been well documented (Martinez et al., 2017b, 2015b), and it represents a danger for DNA and macromolecules damage, since $\cdot\text{OH}$ generated by excessive H_2O_2 is a powerful oxidant of macromolecules also linked to lipid peroxidation (Halliwell, 2009). Excessive generation of superoxide anion has also been documented after UVB exposure (Martinez et al., 2015a; 2015b; Saito et al., 2018). CVE treatment significantly inhibited this effect. Once superoxide anion is a precursor of other free radicals, especially $\cdot\text{OH}$, inhibition of the production of these radical can contribute with lowering oxidative stress and lipid peroxidation, as well as protein and DNA damage (Propac et al., 2017). Corroborating these results, CVE treatment was able to inhibit lipid peroxidation, which was significantly enhanced after UVB exposure.

As already mentioned, the most evident harmful effect of intense UVB exposure is sunburn, which can be characterized by erythema, edema, but also epidermal hyperplasia and apoptosis of keratinocytes (Balupillai et al., 2015; Nichols and Katiyar, 2010). UVB acts primarily on keratinocytes of the basal epidermal layer (Fernando et al., 2016), but its effects can also reach the upper dermis, increasing infiltration of dermal inflammatory cells, which are potential mediators of UV-induced cytokines, which can promote epidermal proliferation of keratinocytes and hyperplastic lesion (Hassan et al., 2015). Oxidative stress is also involved in *sunburn cells* formation through mechanisms that lead to cytochrome C release, after mitochondrial injury and modulation of p53 gene activity (Murphy et al., 2001). By preventing oxidative stress, enhancing Nrf-2 and antioxidant defenses, and also by modulating anti-inflammatory responses, CVE prevents irreparable DNA damage that leads

cell to keratinocyte apoptosis, thus reducing the number of sunburn cells. (Laethem et al., 2005; Nishigori et al., 2004). This effect can be noted in this work by the fewer number of sunburn cells in skin of mice treated with CVE.

In conclusion CVE given orally to mice before and after exposure to UVB reduced inflammatory parameters such as edema, neutrophil infiltration, inflammatory cytokine production, epidermal thickness, number of sunburn cells, number of mast cells in the dermis and collagen degradation due to overproduction of MMP-9. Data also shows CVE protected the antioxidant response of the skin by enhancing the activity of antioxidant enzymes and GSH. CVE also provided skin with phenolics that act directly against free radicals both by scavenging and metal chelating mechanisms. Because inflammatory mediators and ROS are intricately linked in the pathological responses of the skin to UVB, it can be concluded that the synergistic effect of the phenolic compounds in CVE are of vital importance for its effectiveness against UVB-inflammation and oxidative stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Universidade Estadual de Londrina, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG), Escritório de Apoio ao Pesquisador; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil); Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil); Financiadora de Estudos e Projetos and Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (FINEP/SETI-PR, Brazil); Fundação Araucária (Brazil). Authors also want to thank the support of CMLP-UEL and CEPPOS-UEL. Authors declare no conflict of interests.

REFERENCES:

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 571, 153–173.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Al-Musayeb, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., Hussain, A., 2011. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules.* 16, 10214–10226. <https://doi.org/10.3390/molecules161210214>
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., Decker, E.A., 2009. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2969–2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Balupillai, A., Prasad, R.N., Ramasamy, K., Muthusamy, G., Shanmugham, M., Govindasamy, K., Gunaseelan, S., 2015. Caffeic acid inhibits UVB-induced inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- c in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 1458–1468.
<https://doi.org/10.1111/php.12522>
- Bayeux, M.C., Fernandes, A.T., Foglio, M.A., Carvalho, J.E., 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35, 1229–1232. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002001000017>
- Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H.A., Bakhotmah, B.A., Abdellah, F., Hammoudi, S.M., Iguer-Ouada, M., 2013. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules* 18, 322 – 353.
<https://doi.org/10.3390/molecules18010322>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power":FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70 – 76.
- Bhatia, N., Demmer, T.A., Sharma, A.K., Elcheva, I., Spiegelman, V.S., 2011. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.023>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200. [https://doi.org/BLOIS, M. S. \(1958\)](https://doi.org/BLOIS, M. S. (1958)).
- Bolann, J.B., Ulvik, R., 1987. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem.J.* 243, 55–59.
- Bolfa, P., Vidrighinescu, R., Petruta, A., Dezmirean, D., Stan, L., Vlase, L., Damian, G.,

- Catoi, C., Filip, A., Clichici, S., 2013. Photoprotective effects of romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food Chem. Toxicol.* 62, 329–342.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.078>
- Bradley, P.P.B., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Brasil, 2010. *Farmacopeia Brasileira*, 5th ed. ANVISA
- Braun, S., Hanselmann, C., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Kan, Y.W., Werner, S., Chan, K., Gassmann, M.G., 2002. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5492–5505.
<https://doi.org/10.1128/mcb.22.15.5492-5505.2002>
- Brewer, M.S., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of Action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 221–247.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Biomembr. - Part C Biol. oxidations* 129, 302–310. [https://doi:10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi:10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Campanini, M.Z., Custodio, D.L., Ivan, A.L., Martins, S.M., Paranzini, M.J., Martinez, R.M., Verri Jr., W.A., Vicentini, F.T., Arakawa, N.S., Baracat, M.M., Casagrande, R., Georgetti, S.R., 2014. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech* 15, 86–95. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0049-8>
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L.M., Ferreira, V.S., Vilela, F.M.P., Vicentini, F. M.C., Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>
- Cao, H., Cheng, W.X., Li, C., Pan, X.L., Xie, X.G., Li, T.H., 2005. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 719, 177–183.
<https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.01.029>
- Carini, M., Aldini, G., Piccone, M., Facino, R.M., 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmaco* 55, 526–534. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(00\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(00)00037-9)
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W. a, Jabor, J.R., Santos, A.C., Fonseca, M.J. V, 2006a. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech* 7, E10.

- <https://doi.org/10.1208/pt070110>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Borin, M.F., Lopez, R.F. V, Fonseca, M.J. V, 2007. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *Int. J. Pharm.* 328, 183–190.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.006>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Dorta, D.J., dos Santos, A.C., Fonseca, M.J.V., 2006b. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 21–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>
- Cezar, T.L.C., Martinez, R.M., Rocha, C., Melo, C.P.B., Vale, D.L., Borghi, S.M., Fattori, V., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr, W.A., Casagrande, R., 2019. Treatment with maresin 1, a resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. *Sci. Rep.* 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>
- Chen, L., Hu, J.Y., Wang, S.Q., 2012. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Dermatology* 67, 1013–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.009>
- Choi, J.Y., Choi, D.I., Lee, J.B., Yun, S.J., Lee, D.H., Eun, J.B., Lee, S.C., 2013. Ethanol extract of peanut sprout induces Nrf2 activation and expression of antioxidant and detoxifying enzymes in human dermal fibroblasts: implication for its protection against UVB-irradiated oxidative stress. *Photochem. Photobiol.* 89, 453–460.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01244.x>
- Clydesdale, G.J., Dandie, G.W., Muller, H.K., 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79, 547–568.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x>
- Cooper, S., Bowden, G., 2007. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 325–334.
<https://doi.org/10.2174/156800907780809714>
- Correa, E.C., Vitorino, A.V., 2002. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações do luminol em métodos cinéticos de análise. *Quim.Nova* 25, 1003–1011.
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Deng, Y., Ediriwickrema, A., Yang, F., Lewis, J., Girardi, M., Satzman, M., 2016. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. *Nat Mater.* 14, 1278–1285.
<https://doi.org/10.1038/nmat4422>
- Dodeigne, C., Thunus, L., Lejeune, R., 2000. Chemiluminescence as diagnostic tool : a

- review. *Talanta*. 6; 51(3):415-39.
- Dos Santos, J.I., Cardoso, F.F., Soares, A.M., Silva, M.P.S., Gallacci, M., Fontes, M.R.M., 2011. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid : new insights into Lys49-PLA 2 inhibition. *PLoS One* 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>
- Duan, X., Wu, T., Liu, T., Yang, C., Ding, X., Mu, Y., Chen, Y., 2019. Vicenin-2 ameliorates oxidative damage and photoaging via modulation of MAPKs and MMPs signaling in UVB radiation exposed human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 190, 76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.018>
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.*
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Fernando, P., Piao, M.J., Kang, K.A., Ryu, Y.S., Ruwan, S., Madduma, K., Chae, S.W., Hyun, J.W., 2016. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells *Biomol Ther (Seoul)*. 24 (1): 75–84.
- Filip, A.; Clichici, S.; Daicoviciu, D.; Adriana, M.; Postescu, I.D.; Perde-Schrepler, M.; Olteanu, D.; 2009. Photochemoprevention of cutaneous neoplasia through natural products. *Exp Oncol*. 31 (1): 9-15.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T.M.C., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J.V., 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J. Ethnopharmacol.* 127, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Fuchs, J., Zollner, T.M., Kaufmann, R., Podda, M., 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 337–353.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00482-2)
- Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., 2011. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol.* 2011.
<https://doi.org/10.5402/2011/451682>
- Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M., Fronza, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E.M.M., Merfort, I., Laufer, S., 2010. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 561–566.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.062>
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Moura-de-Carvalho Vicentini, F.T., Verri, W.A., Fonseca, M.J.V., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.04.003>

- Georgetti, S.R., Verri, W.A., Borin, M.D.F., 2007. Assessment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different in vitro methods. *Lat. Am. J. Pharm.* 26, 252–7.
- Gilbert, B., Favoreto, R., 2013. *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Rev. Fitos* 7, 17–25.
- Gilchrest, B.A., 2016. A review of skin ageing and its medical therapy. *British J. dermatology* 135, 867–875.
- Gonzalez Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93–100.
- Guaratini, T., Medeiros, M.H.G., Colepicolo, P., 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quim. Nova* 30, 206–213. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100033>
- Halliday, G.M., 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>
- Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>
- Hassan, S.M.A., Hussein, A.J., Saeed, A.K., 2015. Role of green tea in reducing epidermal thickness upon ultraviolet light-B injury in BALB/c mice. *Adv. Biol.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/890632> Research
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132, 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Holick, M.F., 2016. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared radiation and vitamin D for health. *Anticancer Res.* 36, 1345–1356.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., De Fátima, Â., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova* 31, 1170–1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>
- Ivan, A.L.M., Campanini, M.Z., Martinez, R.M., Ferreira, V.S., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vilela, F.M.P., Martins, F.S., Zarpelon, A.C., Cunha, T.M., Fonseca, M.J.V., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2014. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 138, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>

- John, A., Tuszynski, G., 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 7, 14–23.
<https://doi.org/10.1007/BF03032599>
- Karin, M., Greten, F.R., 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.
<https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Katalinic, V., Modun, D., Music, I., Boban, M., 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 140, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>
- Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Dewitt, D.L., 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7, 7–13.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80015-X)
- Kobayashi, M., Yamamoto, M., 2005. Pathway of antioxidant gene regulation. *Antiox Redox Signal* 7, 385–394. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.385>
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Albuhaydar, A.R., Mayer, W., Luca, D., Korkina, L., 2017. Natural substances for prevention of skin photo-ageing: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Res.* 1–34.
- Kumar, H., Kim, I., More, S.V., Kim, B., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2 / ARE pathway for chronic diseases. *R. Soc. Chem. - NPR* 2.
<https://doi.org/10.1039/c3np70065h>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Laethem, A. Van; Claerhout, S.; Garmyn, M.; Agostinis, P. 2005. The sunburn cell : regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1547–1553. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.015>
- Lembo, S.; Balato, A.; Caprio, R.; Di Cirillo, T.; Giannini, V.; Gasparri, F.; Monfrecola, G. 2014. The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine / chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) Cells. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/346793>
- Lephart, E.D. 2016. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 31, 36–54.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>
- Lin, W., Karin, M., Lin, W., Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. Review series: a cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer 117, 1175–1183.
<https://doi.org/10.1172/JCI31537.data>

- Lingnert, H., Vallentin, K., Eriksson, C.E. 1979. Measurement of antioxidant effect in model system. *J. food Process. Preserv.* 3, 87–103. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Machado, N.F.L., Domínguez-Perles, R., 2017. Addressing facts and gaps in the phenolics chemistry of winery By-Products 1–48. <https://doi.org/10.3390/molecules22020286>
- Mantena, S.K., Katiyar, S.K., 2006. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1603–1614. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.032>
- Mao, L., Wang, H., Qiao, L., Wang, X., 2010. Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/238321>
- Martinez, R.M., Pinho-ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Carla, V., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2015a. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 148, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C.V., Pala, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016a. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 15, 554–63. <https://doi.org/10.1039/c5pp00467e>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C. V., Vignoli, J.A., Barbosa, D.S., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2015b. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. *J. Nat. Prod.* 78, 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Silva, T.C.C., Caviglione, C.V., Bottura, C., Fonseca, M.J.V., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016b. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146296>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Vale, D.L., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2017b. Trans-

- chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 171. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.002>
- Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Zimermann, V.V.M., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Fonseca, M.J. V, Vicentini, F.T.M.C., Moreira, I.C., Andrei, C.C., Verri-JR, W.A., Casagrande, R., Vanessa, V.M., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., 2012. *Tephrosia sinapou* extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 587–597. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000006>
- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Santos, B.S., Sobral De Souza, C.E., Alencar Ferreira, J.V. De, Santos De Lavor, A.K.L., Figueredo, F.G., Ferreira De Lima, L., Vieira Dos Santos, F.A., Neves Peixoto, F.S., Viana Colares, A., Augusti Boligon, A., Saraiva, R.D.A., Athayde, M.L., Da Rocha, J.B.T., Alencar Menezes, I.R., Douglas Melo Coutinho, H., Da Costa, J.G.M., 2013. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. Evidence-based Complement. *Altern. Med.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/164215>
- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Silva, M.K. do N., Carvalho, V.R. de A., Coutinh, H.D.M., da Costa, J.G.M., 2015. The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J. Pharmacogn.* 25, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.012>
- Matos, D.O., Tironi, F.L., Martins, D.H.N., Fagg, C.W., Netto Júnior, N.L., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y.M., 2015. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. *Rev. Bras. Pl. Med.* 7, 857–864.
- Medina, I., Gallardo, J.M., González, M.J., Lois, S., Hedges, N., 2007. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3889–3895. <https://doi.org/10.1021/jf063498i>
- Melo, F.H.M., Molognoni, F., Jasiulionis, M.G., 2013. The role of oxidative stress in melanoma development progression and treatment, in: recent advances in biology, therapy and management of melanoma. <https://doi.org/10.5772/54937>
- Meloni, M., Nicolay, J.F., Franc, J., 2003. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. *Toxicol. Vitr.* 17, 609–613. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00114-0)
- Michielin, E.M.Z., De Lemos Wiese, L.P., Ferreira, E.A., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S., 2011. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by

- different methods. *J. Supercrit. Fluids* 56, 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.11.006>
- Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S., Smânia, A., Smânia, E.F.A., Ferreira, S.R.S., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. *Bioresour. Technol.* 100, 6615–6623.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061>
- Murphy, G., Ar, Y., Hc, W., Kulms, D., The, S.T., Wulf, H.C., Kulms, D., 2001. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp. Dermatol.* 10, 155–160.
- Na, E.J., Ryu, J.Y., 2018. Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomed. Dermatology* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41702-018-0024-9>
- Natarajan, V.T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R., Gokhale, R.S., 2014. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat. Chem. Biol.* 10, 542–551.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1548>
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. 284, 13291–13295.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Nichols, J.A., Katiyar, S.K., 2010. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Arch Dermatol Res.* 302, 71. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Nishigori, C., Hattori, Y., Toyokuni, S., 2004. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 6.
- Onoue, S., Kobayashi, T., Takemoto, Y., Sasaki, I., 2003. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 33, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.08.002>
- Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., Bach, F.H., 2003. Heme oxygenase-1 : unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24, 449–455.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00181-9)
- Pérez-Sánchez, A., Barrajon-Catalán, E., Herranz-López, M., Micol, V., 2018. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients* 10, 1–22.
<https://doi.org/10.3390/nu10040403>
- Petersen, M., Simmonds, M.S., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Pulli, B., Ali, M., Wojtkiewicz, G., Chen, J.W., Hsieh, K.L.C., Forghani, R., Schob, S., Innoila, J.J., 2013. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS One* 8,

- e67976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067976>
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., Sauder, D.N., 2006. Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.05.010>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Aggarwal, B., 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rhodes, L., Lim, H.W., 2007. The acute effects of ultraviolet radiation, in: *Photodermatology*. Informa Healthcare USA, Inc, New York, pp. 75–89.
- Rhodes, L.E., Belgi, G., Parslew, R., Mcloughlin, L., Clough, G.F., Friedmann, P.S., 2001. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *J. Invest. Dermatol.* 117, 880–885. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01514.x>
- Rhodes, L.E., Gledhill, K., Masoodi, M., Haylett, A.K., Brownrigg, M., Thody, A.J., 2019. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J.* 23, 3947–3956. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136077>
- Ribeiro, V.P., Arruda, C., El-Salam, M. A., Bastos, J.K. Brazilian medicinal plantas with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharm. Biol.* 56 (1), 253-268. <https://10.1080/13880209.2018.1454480>.
- Rijken, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., 2011. Photoaged Skin: the role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 120–124. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.221>
- Roldão, E. de F., Witaicenis, A., Seito, L.N., Hiruma-Lima, C.A., Di Stasi, L.C., 2008. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). *J. Ethnopharmacol.* 119, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.001>
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem.* 90, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.037>
- Saw, C.L., Huang, M., Liu, Y., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A., 2011. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation / photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol. Carcinog.* 486, 479–486. <https://doi.org/10.1002/mc.20725>
- Saw, C.L.L., Yang, A.Y., Huang, M., Liu, Y., Lee, J.H., Khor, T.O., Su, Z., Shu, L., Lu, Y., Conney, A.H., Kong, A.T., 2014. Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell Biosci.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-39>

- Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T.A., Schwarz, T., 1995. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104, 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of Artemetin 56, 36–40.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1988. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. *Planta Med.* 7–10.
- Shah, H., Rawal Mahajan, S., 2013. Photoaging: new insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomed. Aging Pathol.* 3, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.05.003>
- Sharma, P., de Oca, M.K.M., Alkeswani, A.R., McClees, S.F., Das, T., Elmets, C.A., Afag, F., 2018. Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 34, 50–59. <https://doi.org/10.1111/phpp.12356>
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L., 1994. Enzymic and non enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 122–124.
- Srinivasan, P., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S., 2007. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci.* 80, 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>
- Staurengo-Ferrari, L., S., B.-G., Hohmann, M.S.N., Manchope, M.F., Zaninelli, T.H., Casagrande, R., Verri Jr., W.A., 2019. Contribution of Nrf2 modulation to the mechanism of action of analgesic and anti-inflammatory drugs in pre-clinical and clinical Stages. *Front. Pharmacol.* 9, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01536>
- Stocker, R., Mcdonagh, A.F., Glazer, N., Ames, B.N., 1990. Antioxidant activities of Bile Pigments: biliverdin and Bilirubin. *Methods Enzymol.* 6, 301–309.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 150, 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, Â.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

- Verri, W.A., Guerrero, A.T.G., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2008. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *PNAS* 105, 2723–2728.
- Vicentini, F.T.M.C., He, T., Shao, Y., Fonseca, M.J. V, Verri, W.A., Fisher, G.J., Xu, Y., 2011. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J. Dermatol. Sci.* 61, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.002>
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M., 2002. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* 185, 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00240-9)
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Xu, Y., Fisher, G.J., 2005. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermatological Sci. Suppl.* 2 SUPPL., 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.descs.2006.08.001>
- Zhang, D., Lu, C., Yu, Z., Wang, X., Yan, L., Zhang, J., Li, H., Wang, J., Wen, A., 2017. Echinacoside alleviates UVB irradiation-mediated skin damage via inhibition of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6851464>
- Zhang, X., Dodd, G., Rovin, B.H., Kunsch, C., Chen, X.-L., Thomas, S., Wasserman, M.A., 2005. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 290, H1862–H1870. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2005>
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. <https://doi.org/10.1021/JF010697N>

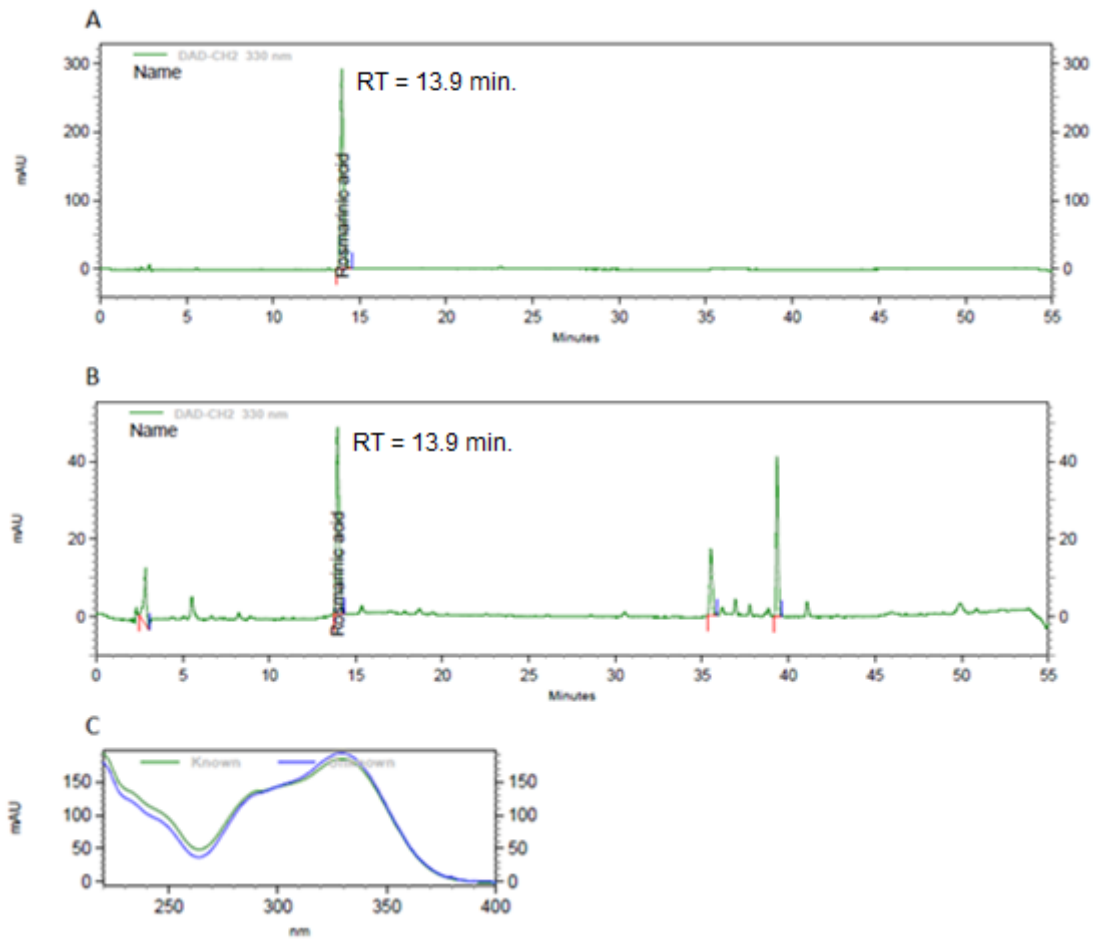


Figure 1 – HPLC identification of rosmarinic acid. Rosmarinic acid standard HPLC-DAD chromatogram showing peak at RT 13.9 minutes (**A**); CVE HPLC-DAD chromatogram showing rosmarinic acid peak at RT 13.9 minutes. (**B**); Rosmarinic acid standard (green line) and CVE (blue line) UV spectrum similarity (**C**).

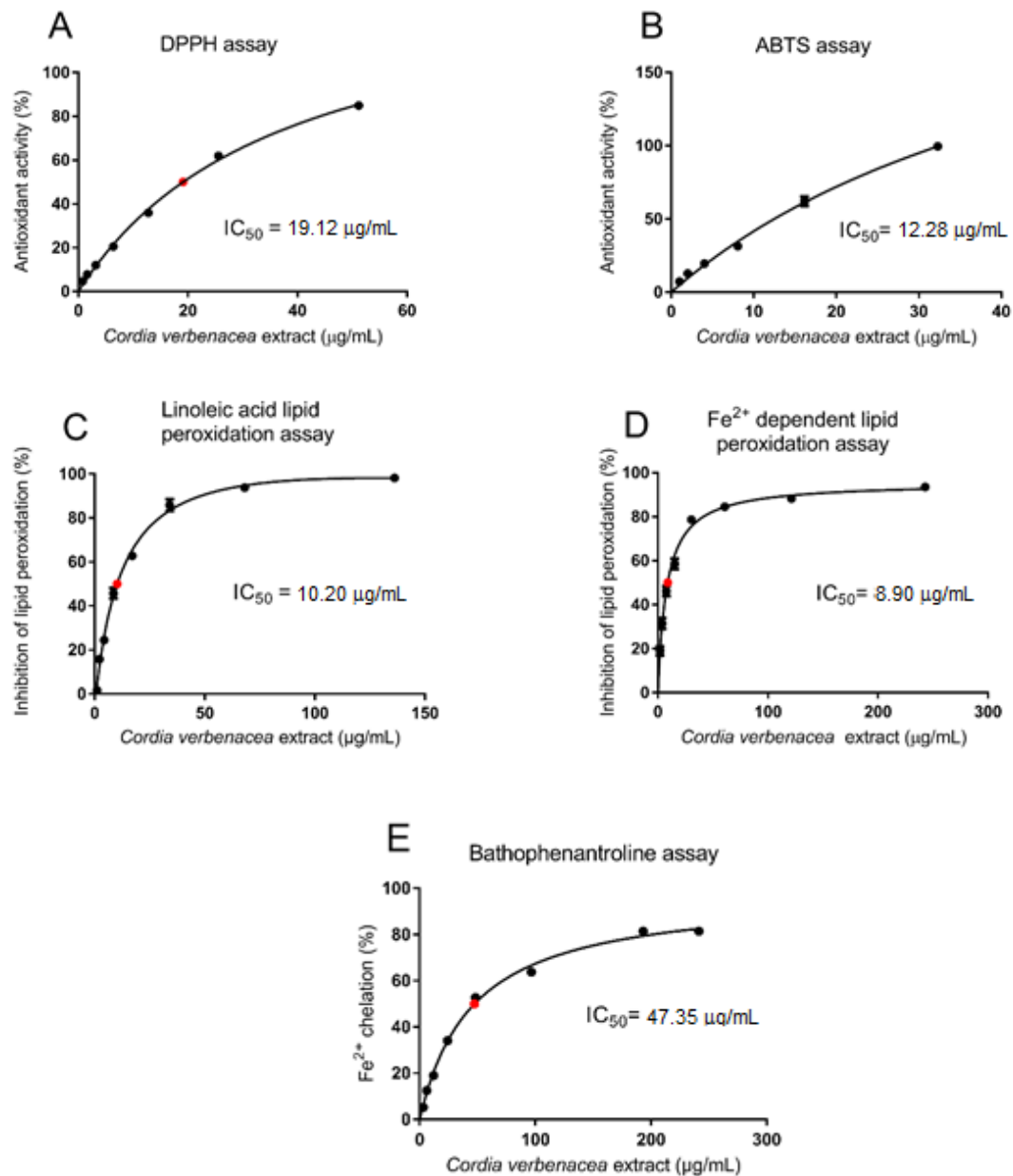


Figure 2 - Evaluation of *in vitro* antioxidant efficacy - CVE hydrogen donating ability to DPPH (**A**); CVE electron donating ability to ABTS (**B**); CVE inhibits lipid peroxidation (**C**); CVE inhibits thiobarbituric acid reactive substances from iron dependent lipoperoxidation (**D**); CVE iron chelating ability (**E**). Data is presented as percentage of inhibition relative to control. Results represent means \pm SEM of triplicate values.

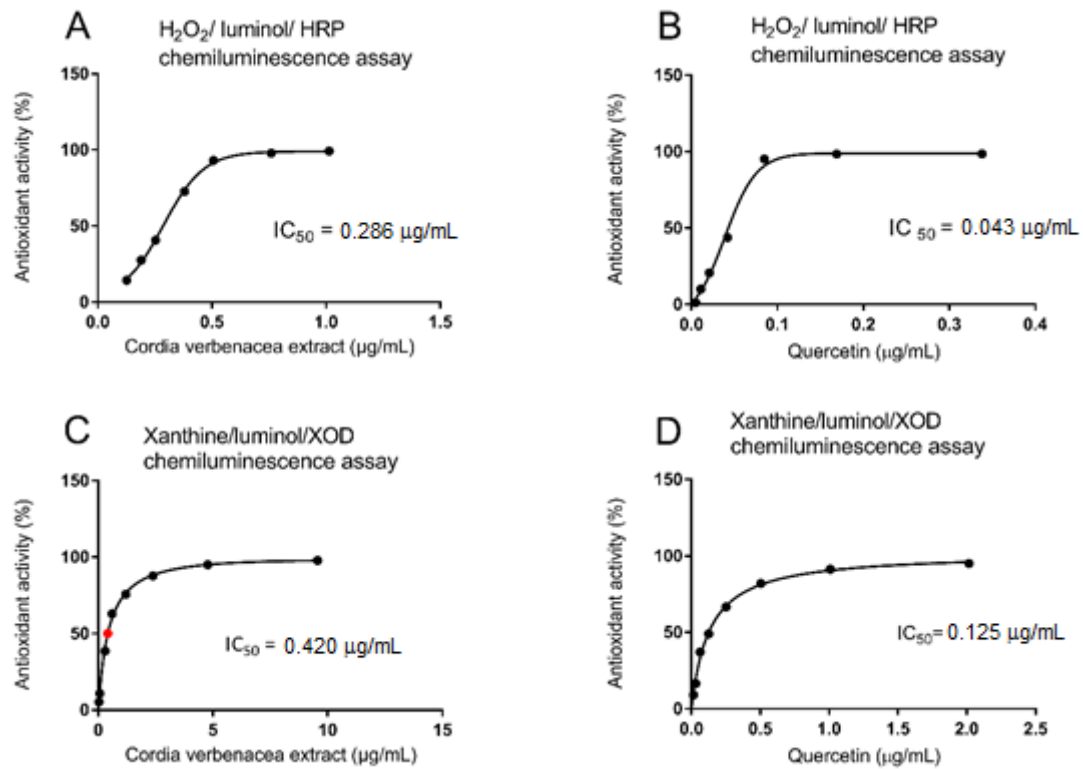


Figure 3 – CVE and quercetin inhibit chemiluminescence. Inhibition of chemiluminescence triggered by free radicals for the H₂O₂/luminol/HRP method: CVE (**A**) and quercetin (**B**). Inhibition of chemiluminescence triggered by free radicals for xanthine/luminol/XOD method: CVE (**C**) and quercetin (**D**). Data is presented as percentage of inhibition relative to control. Results represent means ± SEM of triplicate values.

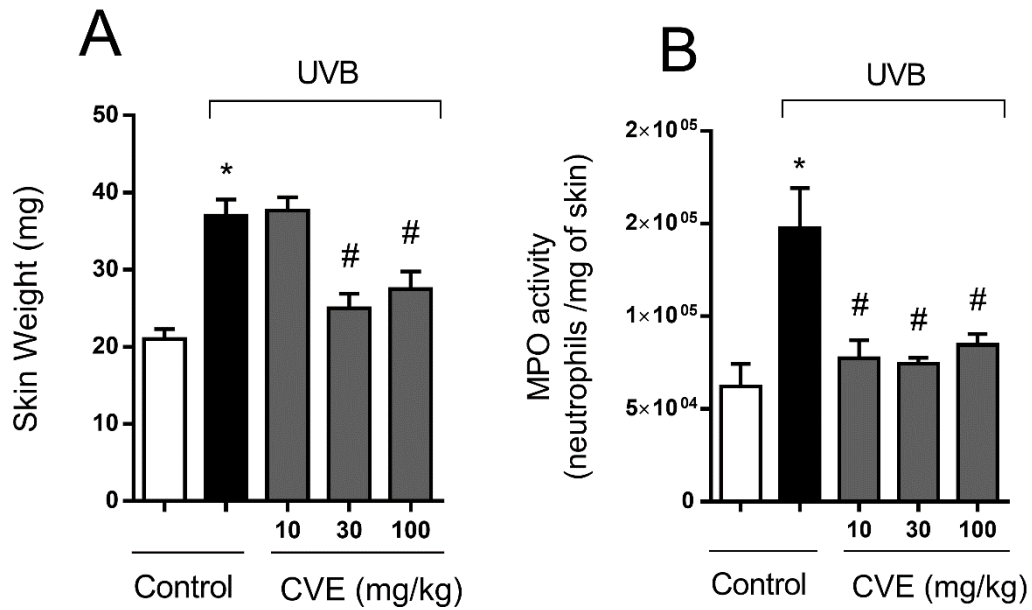


Figure 4 - CVE inhibits UVB radiation-induced edema **(A)** and MPO activity **(B)**. Edema and MPO activity were determined in samples collected 12h after irradiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control group (white bars); # $p < 0.05$ compared to irradiated control group (black bars).

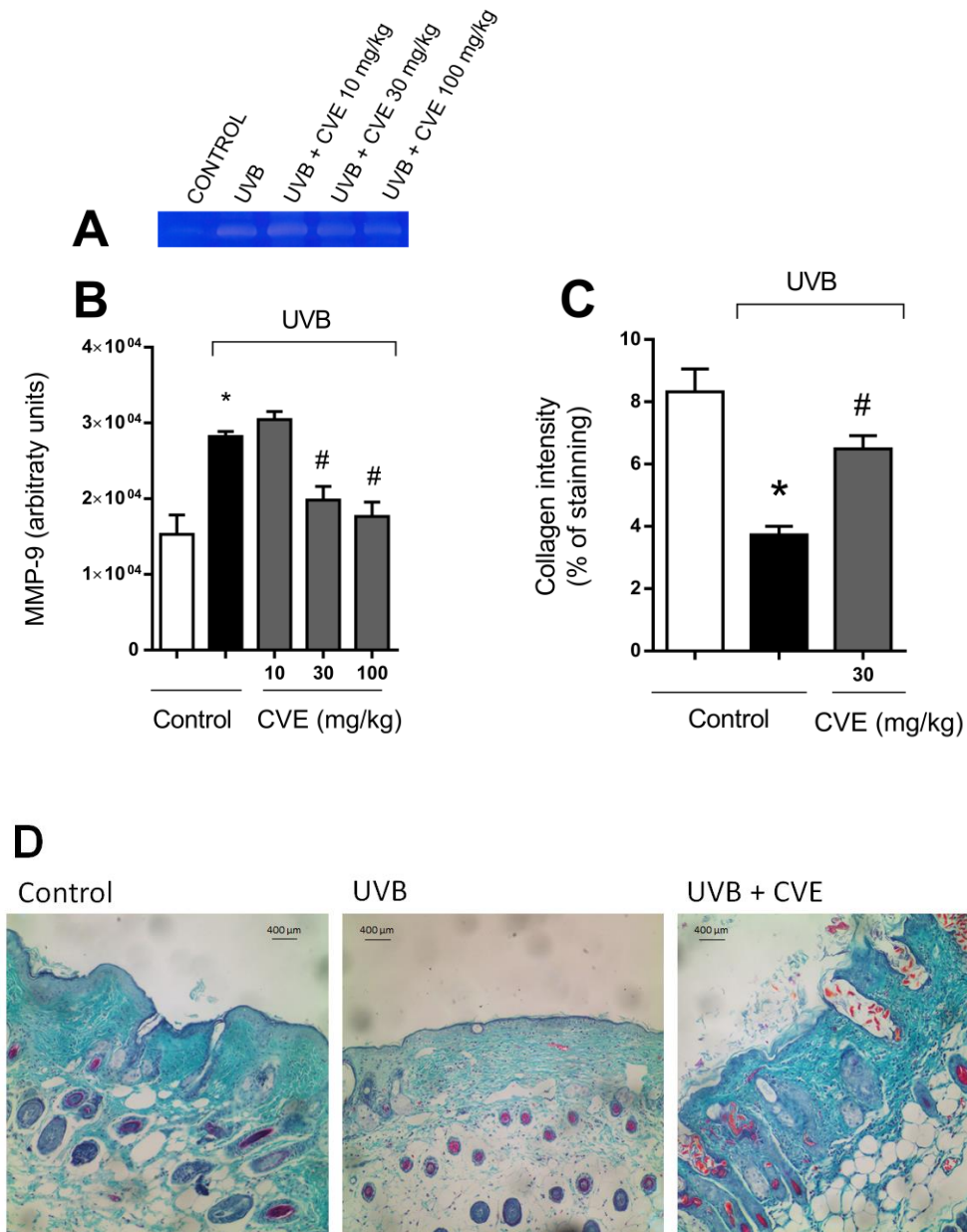


Figure 5. CVE inhibits UVB radiation-induced increase of MMP-9 activity and collagen fiber damage. MMP-9 activity and collagen intensity were determined in samples collected 12 h after the end of irradiation. Representative image of gelatin zymography (**A**) and MMP-9 activity (**B**). Collagen fiber formation was evaluated using Masson's Trichrome staining and 100 x magnification. Collagen fiber intensity and bundles shown in blue were analyzed by Image J Program (10x magnification) (**C**). Collagen intensity (**D**). Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control group (white bars); # $p < 0.05$ compared to the irradiated control group (black bars).

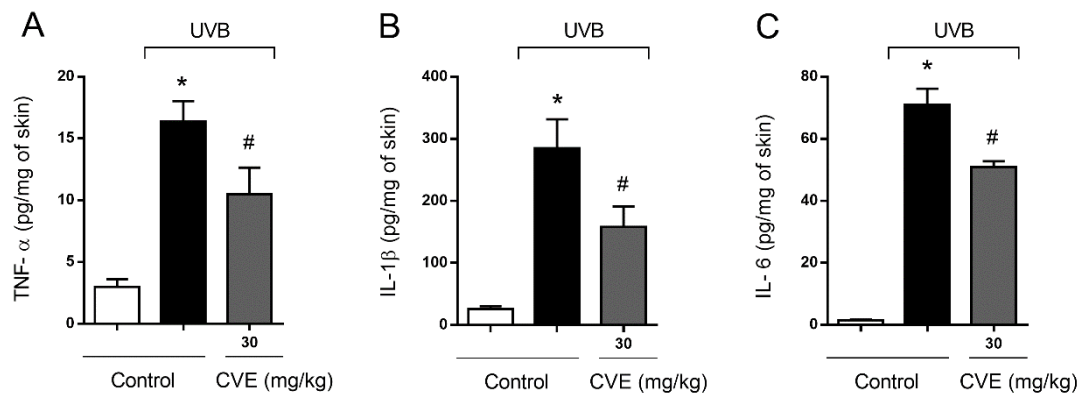


Figure 6 - CVE inhibits UVB radiation-induced cytokine production. Levels of TNF- α (**A**) and IL-1 β (**B**), and IL-6 inflammatory cytokines (**C**). Cytokines level was determined 4 h after the end of the irradiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control groups (white bars); # $p < 0.05$ compared to irradiated control groups (black bars).

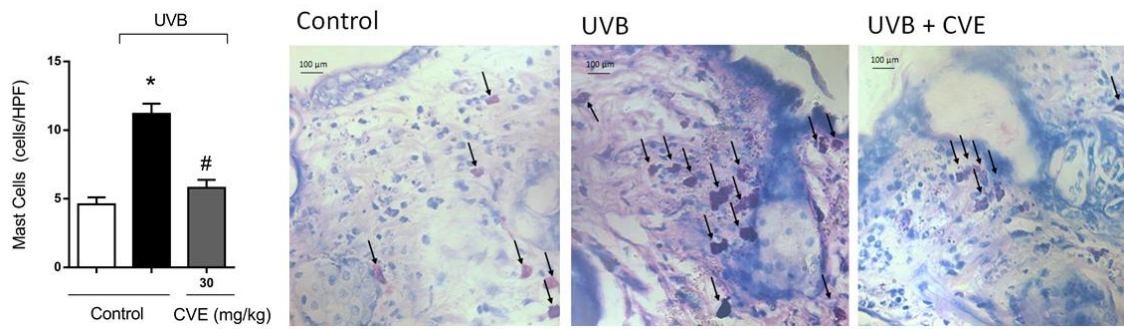


Figure 7. CVE reduces UVB radiation-induced mast cells number in the skin. Mast cells were evaluated using Blue Toluidine stained skin samples collected 12 h after the end of irradiation. Number of mast cells and the sections stained with blue toluidine were examined under light microscopy at 400 x magnification. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to irradiated control group (black bar).

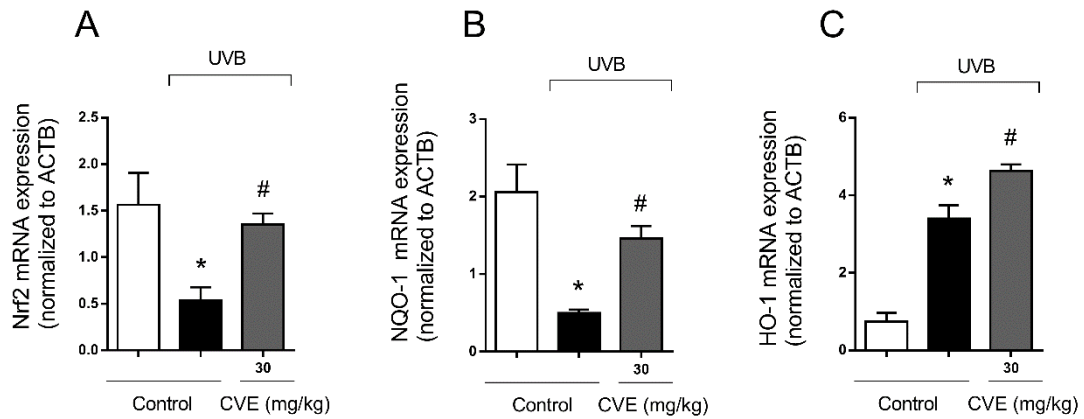


Figure 8. CVE enhances UVB radiation-induced mRNA expression of Nrf-2 (A), NQO-1 (B), and HO-1 (C). mRNA expression was determined in samples collected 4 hours after the end of the irradiation by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control groups (white bars); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bars).

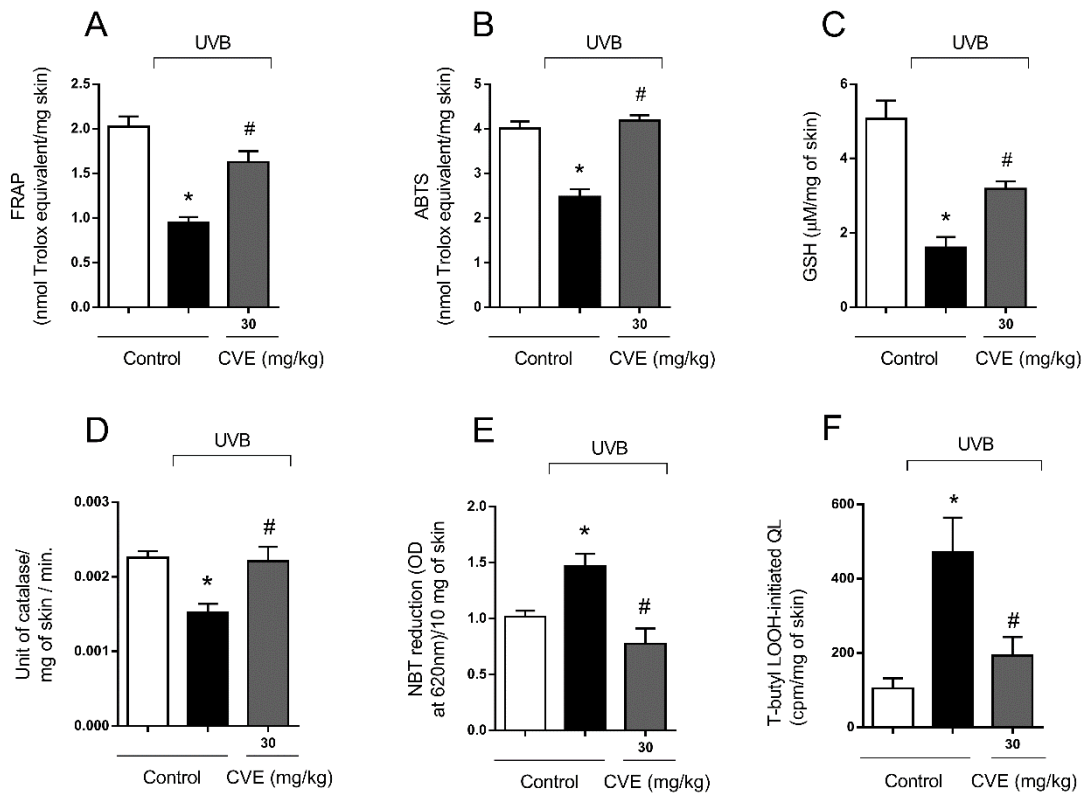


Figure 9. CVE inhibits UVB radiation-induced antioxidant depletion and oxidative stress. Total antioxidant capacity (FRAP [A], ABTS [B]) and GSH levels (C) were determined in samples collected 12 h after the irradiation. For the catalase activity (D) and superoxide anion production (E), samples were collected 2 h after the irradiation. For the lipid peroxidation production (F), samples were collected 4h after the irradiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control groups (white bars); # $p < 0.05$ compared to irradiated control groups (black bars).

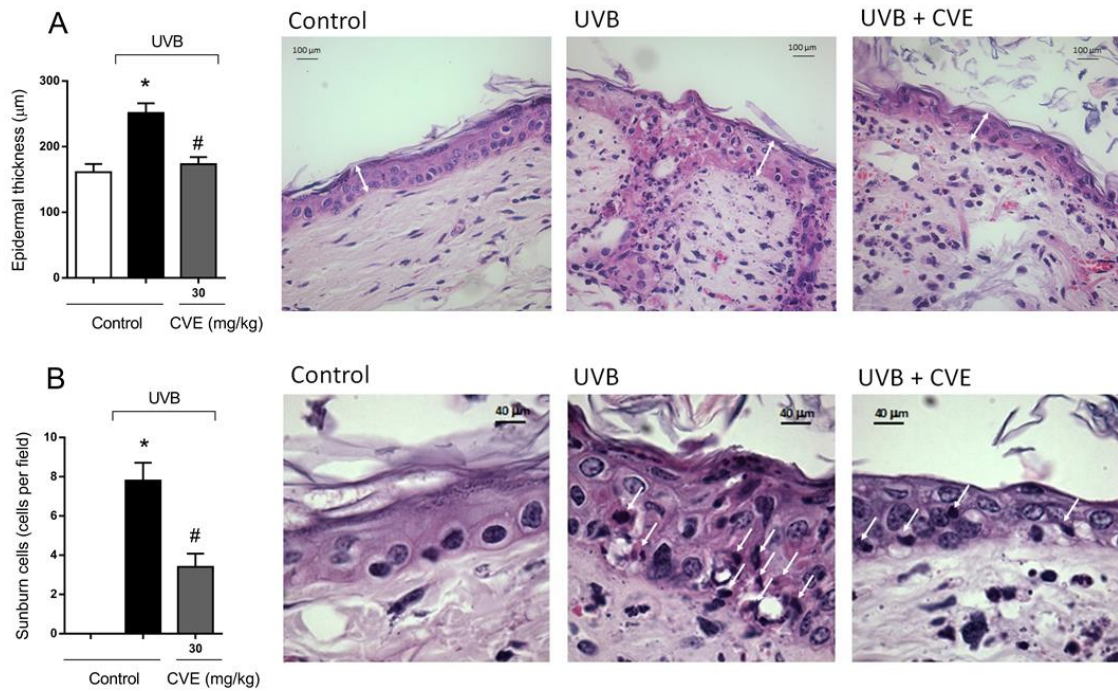


Figure 10. CVE reduces UVB radiation-induced epidermal thickness and sunburn cell counts. Epidermal thickness (μm) (**A**) and sunburn cell counts (**B**) were evaluated using Hematoxylin and Eosin staining (HE) in skin samples collected 12h after the end of irradiation. The sections stained with HE were examined using light microscopy at 400 x (A) magnification and 1000 x (B). Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control group (white bars); # $p < 0.05$ compared to irradiated control group (black bars).

4.2 Efficacy of topical formulation containing *Cordia verbenacea* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice

Cristina de Paula Barros de Melo^a, Priscila Saito^a, David Laios da Vale^a, Camilla Arriero^a, Ingrid Caroline Pinto^a, Renata Michelli Martinez^a, Julia Rojo Bezerra^a, Marcela Maria Baracat^a, Waldiceu Aparecido Verri Jr.^b, Sandra Regina Georgetti^a, Rubia Casagrande^{a*}.

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil

^bDepartamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, PR445, Cx. Postal 10.011, 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

* Corresponding author address: Avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86039-440 Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 33712475.
E-mail address: rubiacasa@yahoo.com.br (R. Casagrande).

E-mail of each author:

Cristina de Paula Barros de Melo: cristinademelo@hotmail.com

Priscila Saito: prsaito@gmail.com

David Laios do Vale: dlvale31@msn.com

Renata M. Martinez: renatamimartinez@gmail.com

Camilla Arriero: camilla_arriero@hotmail.com

Ingrid Caroline Pinto: carol.ingrid2@gmail.com

Julia Bezerra: julia.bz@hotmail.com

Marcela M. Baracat: baracat1903@yahoo.com.br

Sandra R. Georgetti: sangeorgetti@gmail.com

Waldiceu A. Verri Jr: waldiceujr@yahoo.com.br

Rubia Casagrande: rubiacasa@yahoo.com.br

Abbreviations

ABTS	2,2 -azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CAT	catalase
COX	cicloxygenase
CVE	<i>Cordia verbenacea</i> ethanolic leaves extract
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GSH	reduced glutathione
HaCaT	aneuploid immortal keratinocyte cell
HTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
HT-29	human colon cancer cell line
IL	interleukin
LT	leukotriene
MCF-7	breast cancer <i>cell</i> line
MMP	matrix metalloproteinase
MPO	myeloperoxidase
NBT	nitroblue tetrazolium
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMSC	non melanoma skin cancer
NO	nitric oxide
Nrf 2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
\cdot -OH	hydroxyl free radical
$O_2^{\cdot-}$	superoxide anion
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
ROS	reactive oxygen species
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error mean
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UV	ultraviolet

ABSTRACT

UVB radiation causes skin inflammation and excessive generation of reactive oxygen species (ROS), with depletion of the skin natural antioxidant defenses, which results in a condition known as oxidative stress. Photochemoprevention is an approach aimed at counteracting UVB-induced inflammation and ROS production. Among photochemopreventive agents, plant extracts containing antioxidant and anti-inflammatory molecules are very promising. *Cordia verbenacea* DC (*Boraginaceae*) is a flowered shrub, widespread through the Brazilian coastline and widely recognized by its anti-inflammatory activity. The present study evaluates the efficacy of *C. verbenacea* ethanolic leaves extract (CVE) 5% in emulsion for topical administration against UVB-induced damage to the skin. Hairless mice were treated topically with 0,5 g of CVE 5% in Polawax® emulsion, 4 times, every 6 hours. The first treatment was 12 h before the beginning of UVB radiation exposure and the last right after the end. A control group receiving only the emulsion with no extract was established. CVE formulation showed *in vivo* antioxidant capacity by scavenging ABTS free radical and iron reducing antioxidant potential evaluated by FRAP. CVE formulation was able to inhibit UVB-induced depletion of reduced glutathione (GSH), recover UVB-induced decrease of catalase activity, and prevent the formation of superoxide anion. Topical treatment with CVE formulation was also effective to control inflammation parameters such as cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, edema, neutrophil infiltration (evaluated by myeloperoxidase enzyme activity), excessive inflammatory cytokine production (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), epidermal thickening, the appearance of apoptotic keratinocytes (*sunburn cells*) in the epidermis, the increase of mast cells in the dermis, and collagen degradation by overproduction of metalloproteinase-9. The present data demonstrates the effectiveness of the topical administration of *C. verbenacea* extract on UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice and suggests the possible use of topical CVE as strategy for photochemoprevention.

Keywords: antioxidant, sunburn cells, ROS, COX-2

1. Introduction

The skin's most important function is to form an effective physical, chemical, and biochemical barrier between inside the organism and the external environment. As such, skin is highly exposed to environmental insults like UV radiation, which can have an impact on its condition and impair its natural defense (Proksch et al., 2008).

UVB radiation is a short (290 to 320 nm), high energy wave, component of UV spectrum that reach earth's surface. It is absorbed in the epidermis causing direct DNA damage, inflammation, deregulation of cellular signaling pathways and potentially photo-carcinogenesis (Sharma et al., 2018). Considerable evidences suggest that non-melanoma skin cancer (NMSC) is the most frequently diagnosed cutaneous malignancy, and that UVB radiation is responsible for its initiation and promotion (Bowden, 2004).

UVB radiation is also known to cause excessive generation of reactive oxygen species (ROS) with depletion of the skin natural antioxidant defenses, which results in a condition known as oxidative stress (Afaq and Mukhtar, 2006). ROS are recognized as triggers for many skin disorders such as cutaneous autoimmune diseases, phototoxicity, photosensitivity, skin aging, and skin cancer (Georgetti et al., 2006). Approaches aimed at counteracting UVB-induced inflammation and ROS production may be useful for the prevention of skin cancer. Among many photochemopreventive agents, plant extracts containing antioxidant and anti-inflammatory molecules are very promising (Afaq and Mukhtar, 2006).

Cordia verbenacea (Boraginaceae) is a flowered shrub popularly known in Brazil as "erva baleeira" (Lorenzi, Matos, 2002) and widespread through the Brazilian coastline (Bayeux et al., 2002; Gilbert, Favoreto, 2013). Boraginaceae family encompasses 100 genera and 2,000 species found in tropical regions around the globe (Akisue et al, 1983). Polyphenols, flavonoids and terpenes are the most common phytochemicals of this plants, some of which are already recognized by their anti-tumoral, anti-viral, antioxidant and anti-inflammatory properties (Dresler et al., 2017)

C. verbenacea has been used in popular medicine as infuse, decoct or crude aqueous and ethanolic extract for its anti-inflammatory, anti-ulcerogenic and analgesic properties (Lorenzi, Matos, 2002; Souza et al, 2004, Silva Jr et al, 1995).

Although several studies have been performed to evaluate *C. verbenacea* anti-inflammatory effect, there is no reports of studies related to the evaluation of a topical formulation containing the *C. verbenacea* extract regarding UVB-induced oxidative stress and inflammation. Therefore, the aim of this study is to assess the potential of *C. verbenacea* ethanolic leaves extract (CVE) in topical formulation as a photochemopreventive agent against UVB damage to the skin.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals

2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+); 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bisacrylamide, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB), brilliant blue stain, phenanthroline, phenyl methyl sulfonyl fluoride, reduced glutathione (GSH), nitroblue tetrazolium (NBT), o-dianisidine dihydrochloride, and Trolox were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tris from Amresco (Solon, OH, USA). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits from eBioscience (San Diego, CA, USA). Acrylamide sodium dodecyl sulfate (SDS), Superscript1III, Oligo(dT)12-18 primers, Platinum SYBRGreen 1 and primers from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Excipients used to prepare the topical formulation were acquired from Galena (Campinas, SP, Brazil). All other reagents used were of pharmaceutical grade.

2.2 Plant material and extract

The leaves of *Cordia verbenacea* were donated by the company Santosflora®, lot number 1507080477. The leaves were dried at room temperature (25°C) (RT) and pulverized using a knife mill. The ethanolic extract of leaves of *C.verbenacea* (CVE) was obtained by 2 h maceration at RT, followed by percolation at a flow rate of 3 to 5 mL per minute. The solvent used was ethanol 70°GL, and the ratio dry leaves:solvent was 1:2 (w/v). After the extraction, the solvent was partially dried under vacuum using a rotary evaporator with the temperature maintained at less than 40°C. The extract was kept at – 20°C until use (Matos et al., 2015). The dry weight of the extract was determined by gravimetry according to Brazilian Pharmacopeia 5th edition (Brasil, 2010).

2.3 Evaluation of *in vivo* anti-inflammatory and antioxidant efficacy of CVE added formulation

2.3.1 Animals and experimental protocol

In vivo experiments were performed using sex matched hairless mice (HRS/J), weighing 20–30 g, obtained from the University Hospital of Londrina State University. Mice were maintained at a temperature of 23°C ± 2 and a 12 h light and 12 h dark cycles, with free access to water and food. The experimental protocol for this study was approved by The Animal Ethics Committee of the Londrina State University (CEUA) n° 030/2015, process n° 1818.2015.2400. Hairless mice were randomly assigned to groups of 5 mice each as follows: non-radiated control, radiated control, radiated and treated with emulsion without CVE, radiated and treated with CVE 5% enriched emulsion. Treated groups received topically 0,5 g Polawax® emulsion (with or without CVE 5%), applied with a brush, every 6 hours, starting 12 h before the beginning of the irradiation and ending right after, hence, a total of 4

treatments, three of which before UVB radiation and one after. The UVB source used was a Philips TL/12 RS 40W (Medical-Holland) emitting a continuous spectrum between 270 and 400 nm with a peak emission at 313 nm cm^2 (Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014). There was 20 cm distance between the lamp and mice position with a radiation of 0.209 mW/cm^2 . An IL 1700 radiometer (Newburyport, MA, USA) equipped with the sensor for UV (SED005) and UVB (SED240) was used to determine the radiation intensity. UVB dose used to induce skin inflammation was 4.14 J/cm^2 (Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014; Shindo et al., 1994). Groups were radiated simultaneously. Mice were terminally anesthetized with 5% isoflurane (Abbott [Abbott Park, IL, USA]) 12 h after radiation exposure for edema, GSH, FRAP, ABTS, myeloperoxidase (MOP), metalloproteinase-9 (MMP-9) tests and histology analysis; anesthetized and decapitated 4 h after the exposure for cytokine levels and qPCR tests, and 2 h after the exposure for catalase activity and NBT tests. Afterwards the full thickness of the dorsal skin was removed. Samples collected for edema determination were weighed immediately after the dissection, samples for histology were kept in formol 10% at RT until analysis, and samples for the remaining tests were stored at -70°C until analysis.

2.3.2 Topical formulation

The ingredients used to prepare the emulsion can be found in Table 1. To prepare the emulsion the ingredients of phase A (oil phase) and phase B (water phase) were heated separately at 70°C . After the fusion of the solids, phase B was poured over phase A and the two phases were mixed under constant agitation until the temperature reached 45°C . Phase C (preservative) and D (humectant) were then added and mixed. After 24h CVE was added to the formulation, at room temperature (RT), to reach the final concentration of 5% (w/w).

Table 1 – Ingredients of the formulation containing *C. verbenacea*.

<i>Raw material</i>	%
(A) Polawax ^{®1} (self-emulsifying wax)	10
Caprylic/capric triglyceride (emolient)	5
(B) Purified water to complete	100
(C) Phenonip (preservative)	0,4
(D) Propylene glycol (humectant and solubilizant)	6

¹Polawax[®]: nonionic self-emulsifying wax (cetoestearyl alcohol + sorbitan monoestearate – 20 OE);

2.3.3 Skin edema.

Skin edema was determined by the increase of weight in the dorsal skin (expressed in mg) exposed to UVB radiation. Samples with the same area were cut with the aid of a mold and weighed. The results from non-exposed and exposed controls were compared with the results from CVE treated mice (Afaq et al., 2005; Bhatia et al., 2011; Campanini et al., 2013; Ivan et al., 2014).

2.3.4 Myeloperoxidase (MPO) and neutrophil infiltration

Neutrophil infiltration was indirectly determined by MPO activity. MPO catalyzes the oxidation of *o*-dianisidine to a colored compound (Bradley et al., 1982; Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Ivan et al., 2014). Each sample of skin (weighing around 30 mg) was homogenized with 400 μ L of 0.05 M (pH 6.0) phosphate buffer added of 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB) with the aid a Tissue-Tearor (Biospec[®]). The resulting homogenate was centrifuged at 16.100 g for 2 minutes at 4°C. The reaction was performed adding 200 μ L of 0.0167mg/mL *o*-dianisidine in 0,05 M phosphate buffer (pH 6,0) and 0.015% hydrogen peroxide to a 30 μ L aliquot of the sample supernatant. Absorbance was measured at 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) and compared to a neutrophil standard curve. Results were expressed as number of neutrophils/mg of skin.

2.3.5 Cytokine measurement.

Each sample of skin was homogenized in 500 μ L of saline solution with the aid of a Tissue-Tearor (Biospec). The homogenates were centrifuged (2,000 g, 15 min, 4°C) and supernatants were used to measure the cytokine levels by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (eBioscience) (Verri et al., 2008). Absorbance was determined at 450 nm and the results were expressed as picograms (pg) of each cytokine/mg of skin.

2.3.6 Metalloproteinase-9 (MMP-9)

MMP-9 was determined by zymography in polyacrylamide sodium dodecyl sulphate (SDS) added of gelatin (Fonseca et al., 2010; Vicentini et al., 2011). The quantification was based on the degree of gelatin degradation by MMP-9 (Kim et al., 2007). Each skin sample was homogenized in 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) phosphate buffer added of 10 mM CaCl₂ and 1% proteinase inhibitors (phenanthroline, phenyl methyl sulfonyl fluoride, and *n*-ethylmaleimide). The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 4°C and 50 µL of the supernatant were diluted in 10 µL Tris/HCl (pH 6.8) buffer added of 20% glycerol, 4% SDS and 0.001% bromophenol blue. The samples were placed at 37 °C for 8 minutes before applied to the electrophoresis gel (13.5% acrylamide and 0.025% gelatin). The running buffer was 190 mM Tris/glycine (pH 8.3) added of 0.1% SDS, and the run was performed at a current of 13 mA. After the procedure, the gel was washed with 2.5% Triton-X solution, under agitation, for 1 h and then incubated for 12 h at 37°C in 50mM Tris-HCl (pH 7.4) added of 5 mM CaCl₂. The gel was stained with Coomassie Blue and washed with a 20% acetic acid solution. Enzymatic activity was detected by discolored zones against dark background. Proteolytic activity was quantitatively analyzed by comparing data from treated and untreated animals using ImageJ® software (NIH, Bethesda, MD, USA). (Casagrande et al., 2006a; Fonseca et al., 2010; Martinez et al., 2015a; Onoue et al., 2003).

2.3.7 FRAP assay.

Each skin sample was homogenized with 400 µL of KCl (1.15%), using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C). A 30 µL aliquot of the supernatant was mixed with the FRAP reagent (0.3 mM acetate buffer pH 3.6; 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine in 40 mM hydrochloride acid; and 20 mM ferric chloride). The absorbance was determined at 595 nm. The results were compared to a Trolox curve (0.01 – 20 nmol) and presented as nmol Trolox equivalent per mg of skin (Katalinic et al., 2005).

2.3.8 ABTS assay

The ABTS radical scavenging ability of skin was measured by the decrease in absorbance at 730 nm. Each skin sample was homogenized with 400 µL of KCl (1.15%), using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C). A 7 µL aliquot of the supernatant was mixed with ABTS reagent (7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate) diluted with phosphate buffer pH 7.4 to obtain absorbance of 0.7 at 730 nm. Samples absorbance were determined after 6 min at 730 nm. The results were compared to a Trolox curve (0.01–20 nmol) and presented as nmol Trolox equivalent per mg of skin.

2.3.9 Catalase assay

Catalase activity was evaluated by the decay of H₂O₂ concentration with generation of oxygen (Aebi, 1984). Each skin sample was homogenized in 500 µL of 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). The reaction mixture contained 10 µL of sample, 160 µL 1M Tris-HCl buffer with 5 mM EDTA (pH 8.0), 20 µL of deionized water and 20 µL 200 mM of H₂O₂. Catalase activity was determined at 25°C through the difference between the initial reading and the reading conducted 30 seconds after the addition of H₂O₂ at 240 nm. Catalase values were expressed as unit of catalase/mg of skin/minute.

2.3.10 GSH assay

GSH method is based on the detection of the yellow compound 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid formed by 5',5'-dithyobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) breakage of disulfide bond by glutathione sulfhydryl group. Each skin sample was homogenized in 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec). Whole homogenates were treated with 50% trichloroacetic acid and were centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). The reaction mixture contained 50 µL of sample supernatant, 100 µL of 0.4 M Tris and 5 µL of a 1.9 mg/mL solution of DTNB in methanol. The absorbance was measured at 405 nm. Data was analyzed using a standard curve of GSH (5–150 µM) and the results were presented as µM GSH per mg of skin (Srinivasan et al., 2007).

2.3.11 Superoxide anion (O₂^{•-}) production

The measurement of O₂^{•-} production in the skin was performed using the NBT assay (Campanini et al., 2013). Each skin sample was homogenized in 500 µL of 0.02 M EDTA, using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged (2,000 g, 20 seconds, 4°C). A 50 µL aliquot of the supernatant was incubated in 96-well plate for 1 h. The non-adherent/non-precipitated supernatant was carefully removed, followed by addition of 100 µL of NBT (1 mg/ml) to each well and incubated for 15 min. NBT reaction medium was then carefully removed followed by fixation in methanol 100%. Formazan particles were dissolved by adding 120 µL of KOH 2M and 140 µL of dimethylsulfoxide. Reduction of NBT to formazan was measured at 620 nm and the results were presented as optical density (OD) per 10 mg of skin.

2.3.12 Reverse transcriptase (RT) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Each skin sample was homogenized in Trizol reagent and total mRNA was isolated according to manufacturer's directions. mRNA purity was confirmed by the 260/280 ratio. RT-PCR and quantitative PCR were performed using GoTaq12-Step RT-qPCR System (Promega) on a Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems1). The relative mRNA expression was measured using the comparative 2- (ΔΔCq) method. The

expression of ACTB mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples (Martinez et al., 2016b). The primers used were:

ACTB, sense 5'- CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT-3',
antisense 5'- CGTCACACTTCATGATGGAATTGA-3';
COX-2, sense: 5' AACCGCATTGCCTCTGAAT 3',
antisense: 5' CATGTTCCAGGAGGATGGAG 3'

2.3.13 Skin histologic evaluation

Dorsal skin samples were collected in formaldehyde 10%, fixed in paraformaldehyde 4%, dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene, embedded in paraffin and sectioned to a thickness of 5 μ m. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Toluidine Blue and Masson's Trichrome stains.

The sections stained with HE were examined using light microscopy at 400 x magnification for determination of epidermal thickness (Deng et al., 2016) and a 1000 x magnification for counting the number of sunburn cells (Schwarz et al., 1995). For mast cell count, the sections were stained with Toluidine Blue and analyzed under light microscopy at 400 x magnification. Both analyses were done with the software Infinity Analyze (Lumenera R Software).

The sections stained with Masson's Trichrome were examined using light microscopy at a magnification of 100 x. Density of collagen fibers was analyzing by the intensity of the blue coloration in the dermal areas of the skin. UVB unexposed and exposed controls were compared to CVE treated group with the aid of Image J software (NIH) (Gilchrest, 2016).

2.3.14 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test. Results were presented as mean \pm standard error (SEM) of measurements made with 5 animals in each group per experiment. The results were representative of 2 separate experiments and were considered significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Free radicals can be defined as chemical species that contain unpaired electrons in an atomic orbital, what makes them unstable and highly reactive (Halliwell, Gutteridge,

1999). Free radicals reactive oxygen species (ROS) are physiologically produced by immune mediators as activators of cell response to aggressions (Valko et al., 2007). UVB radiation intensifies the formation of ROS, which promote damage to DNA, proteins and lipid peroxidation (Guaratini et al., 2007; Wei et al., 2002). During oxidative stress, excessive production of ROS leads to depletion of skin natural antioxidants, limiting the self-protecting capacity of the cells (Fonseca et al., 2010; Poprac et al., 2017; Svobodova et al., 2006; Xu and Fisher, 2005). Under normal conditions, cells present a robust system for dealing with oxidative damage. The cell redox balance is maintained by an enzymatic and a non-enzymatic antioxidant system. Among the antioxidant enzymes are catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRx), and superoxide dismutase (SOD). Ascorbic acid, uric acid, reduced glutathione (GSH), glutathione, ubiquinol-10 and α -tocopherol are non-enzymatic antioxidants (Shindo et al., 1994).

The antioxidant potential of CVE added formulation against the UVB-induced oxidative damage to the skin was evaluated by a comprehensive set of assays (Figure 1): FRAP (Figure 1A) and ABTS (Figure 1B) scavenging tests were used to determine the effects of CVE added formulation in the antioxidant capacity of the skin after UVB exposure. In both assays CVE added formulation was able to maintain the antioxidant capacity near basal levels (Figure. 1A, B). Since FRAP and ABTS correlate to the activity of scavenging species (Benzie and Strain, 1996; Katalinic et al., 2005) the results may indicate that CVE added formulation presents good scavenging capacity.

Among the non-enzymatic antioxidants found in the epidermis, GSH is one of the most important (Meloni et al., 2003); not only because of its scavenging properties, but also because its redox state serves as an early and sensitive indicator of oxidative stress (Casagrande et al., 2006b; Huber et al., 2008; Meloni et al., 2003). Studies show that UVB exposure causes depletion of GSH levels in the skin (Campanini et al., 2013; Casagrande et al., 2006b; Ivan et al., 2014). In this work, samples from animals exposed to UVB presented a sharp decrease of GSH level, but treatment with CVE added formulation was able to significantly restore it (Figure 1C).

Catalase is an enzymatic antioxidant present in the epidermis that catalyzes the conversion of H_2O_2 to oxygen and water preventing the formation of the hydroxyl free radical ($\cdot OH$), a powerful oxidant generated when there is excess of H_2O_2 (Halliwell, 2009). Several studies show that catalase activity is reduced when skin is exposed to acute UVB doses (Georgetti et al., 2013; Mantena, Katiyar, 2006; Martinez et al., 2015b, 2017b), what presents a high risk for generation of DNA and macromolecules damage by radical hydroxyl (Halliday, 2005). The dose of UVB used in this experiment reduced catalase activity, but treatment with CVE added formulation was able to maintain the activity of the enzyme to basal levels, what

demonstrates the protective effect of *C. verbenacea* on the natural antioxidant defenses (Figure 1 D).

Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which is constantly generated by endogenous processes and exogenous sources, causes the formation of several other reactive species. Superoxide anion can directly and indirectly produce hydroxy radicals, which is implicated in the formation of lipid peroxy radicals (Ighodaro, Akinloye, 2018). It has been observed that superoxide anion induces the production of cytokines such IL-1 β and TNF- α , triggering inflammation and amplifying tissue damage. By their turn, cytokines activate phagocytes, that will produce more superoxide anion. This mechanism contributes to maintain a feedback cycle of oxidative stress inductors and inflammation mediators and to further increase UVB-induced damage (Saito et al., 2018; Witko-Sarsat et al., 2000). Results from NBT test show that superoxide anion production was increased by UVB exposure but that it was controlled to basal levels in mice treated with CVE added formulation (Figure 1E).

UVB stimulates keratinocytes to produce prostaglandin E2 (PGE2) by promoting lipid peroxidation and the expression of phospholipase A2 (PLA2), what leads to an increment in arachidonic acid production and to induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) (Afaq et al., 2005; Wilgus et al., 2003). Because COX-2 is a determinant enzyme for production of prostaglandins, it is a key in the modulation of inflammation. Vasodilation, increase of venules permeability and neutrophil chemotaxis are consequences of the rise of COX-2 derived prostaglandins and leukotrienes in the inflammation site (Funk, 2001). Results from qPCR show that UVB exposure considerably increased the expression of COX-2, while treatment with CVE added formulation was able to maintain COX-2 near to basal level (Figure 2). Corroborating with results observed in this work, studies show that UVB radiation induces COX-2 expression in murine and human keratinocytes (Athar et al., 2001; Buckman et al., 1998). COX-2 produced by macrophages, monocytes and endothelial cells can increase up to 20 fold during inflammatory process (Tang et al., 2017). The consequent increase in prostaglandins is involved in the promotion and progression phases of UV-induced non melanoma skin cancers (NMSCs) (Elmets et al., 2015). The observed results are in agreement with earlier pharmacological studies in which *C. verbenacea* essential oil and its isolated compounds α -humulene and trans-caryophyllene inhibited the expression of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) (Medeiros et al., 2007; Passos et al., 2007). Another study demonstrated that *C. verbenacea* extract obtained by supercritical fluid extraction was able to reduce the expression of COX-2 in human breast cell lines MCF-7 (Parisotto et al., 2012)

Regarding cytokines, TNF- α is a pro-inflammatory cytokine that induces the production of other inflammation mediators, including IL-1 β , IL-6, chemokines, and adhesion molecules. These mediators recruit and activate neutrophils during acute inflammatory

response, increasing tissue inflammation and contributing to aggravate skin damage (Martinez et al., 2015a). Results from this work demonstrate that UVB exposure induces a significant increase in the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6. Topical treatment with CVE added formulation inhibited the overproduction of these cytokines (Figure 3).

Edema and MPO levels were also evaluated as means to assess CVE added formulation anti-inflammatory efficiency against the severity of UVB-induced inflammation. Skin molds from mice exposed to UVB, but not treated with CVE added formulation, showed significant increase in weight, whereas in animals treated with CVE emulsion, edema remained at basal levels (Figure 4A). In a prior study *C. verbenacea* leaves 70% ethanolic extract was administered orally to rats in a model of paw edema induced by nystatin. The results were comparable to naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), with the advantage that the extract presented a protective effect against gastric mucous lesions (Sertié et al., 1991).

Results also show that myeloperoxidase (MPO) levels in animals treated with CVE added formulation were significantly lower than those found in animals exposed to UVB radiation but not treated (Figure 4 B). Because MPO occurs naturally inside neutrophils azurophilic granules, the activity of the enzyme is determined as a marker for epidermal neutrophil infiltration and a measure of the severity of the inflammation. MPO is also responsible for the reduction of H₂O₂ to HClO, a powerful cytotoxic agent (Aratani, 2018; Wang et al., 2015). In this sense, neutrophils and MPO represent additional sources of ROS, that can aggravate inflammation and damage to the tissue (Clydesdale et al., 2001).

Epidermis is the outer layer of the skin. It functions as a barrier that provides self-protection against environmental insults. Keratinocytes are the main epidermal cell types. They operate under a tightly regulated program of proliferation that can, however, be altered by external stimulus such as UVB radiation (Hassan et al., 2015). Epidermal thickening is frequently observed in experiments with hairless mice exposed to acute doses of UVB (Cezar et al., 2019; Martinez et al., 2017b; Saito et al., 2018) and can be also used as a parameter to evaluate the intensity of UVB exposure (Martinez et al., 2015b). Measurement of epidermis in Hematoxylin and Eosin stained (HE) tissue sections indicated that epidermal thickness was significantly increased following UVB radiation. In contrast, treatment with CVE added formulation reduced epidermal hyperplasia (Figure 5A, C), keeping it at basal levels (Figure 5C).

Apoptotic keratinocytes or *sunburn cells* are a common feature in epidermis exposed to UVB. They appear in HE stained skin sections as shrunken cells with condensed nucleus and eosinophilic cytoplasm, located in the epidermis, mainly near basal layer (Bolfá et al., 2013; Murphy et al., 2001). In this work UVB radiation exposure induced the appearance of sunburn cells, which was not observed in samples from non UVB-exposed control group and

was reduced in samples from the group treated with CVE added formulation (Figure 5B, D). The presence of *sunburn cells* is related with UVB irreparable damage introduced by overwhelming mutations to DNA. These mutations can be either promoted directly by UVB radiation or by UVB-induced ROS. (Afaq et al., 2005; Hassan et al. 2015). Apoptosis occurs through caspases pathway, in order to limit the rate of survival of irreparably mutated or damaged cells, which have the potential to develop into carcinogenic cells (Laethem et al., 2005; Van Laethem and Agostinis, 2009). CVE added formulation ability to control the epidermal hyperplasia and the number of sunburn cells is a good indicator of the photochemoprevention of the extract.

Mast cells are known to release several inflammatory mediators upon degranulation, among which are histamine, leukotrienes and PGE2. The increase in the production of these mediators contribute to install inflammation at an early stage during UVB exposure (Harvima, Nilsson, 2011; Krystel-Whittemore et al., 2016). Toluidine stained skin sections show that UVB increased the number of mast cells in the dermis of untreated mice, and that topical treatment with CVE added formulation was able to maintain mast cells near basal levels (Figure 6A, B).

Neutrophils, keratinocytes, mast cells, and endothelial cells can produce metalloproteinases (MMPs) (Ahmed et al., 2017; Svobodova et al., 2006). By stimulating the production of ROS and inflammatory mediators, UV radiation increases the expression of MMPs, specifically MMP-1, MMP-3 and MMP-9 (Svobodova et al., 2006), that are associated with skin ageing, intensification of inflammation, and cancer development (John, Tuszynski, 2001; Rijken, Bruijnzeel-Koomen, 2011). MMP-9 is responsible for collagen IV and elastin fibers degradation (Jenkins, 2002). Treatment with CVE added formulation reduced UVB-induced activity of MMP-9 (Figure 7A, B). Masson's Trichrome stained tissue sections showed very low collagen density, along with high expression of MMP-9, in samples from mice exposed to UVB. Skin sections from non-exposed mice and from mice treated with CVE added formulation show higher collagen density (Figure 7D). Treatment with CVE emulsion reduced the effects of overexpression of MMP-9 and collagen degradation back to basal levels (Figure 7C, D).

UV-induced ROS are associated with initiation, promotion and progression of skin cancer (Nishigori et al., 2004). EROs promote damage to DNA, modifications of the proto-oncogene *ras* and of the tumor suppressor gene *p53*. Furthermore, the inflammatory and immunological responses generated by ROS have important roles in carcinogenesis. For instance, ROS increase COX-2 expression, which will result in higher production of PGE2. This pro-inflammatory pathway has been demonstrated to play significant role in the genesis of many cancer types. COX-2 inhibition has strong potential for cancer intervention and chemoprevention. In fact, COX-2 selective inhibitors were initially developed as anti-cancer

drugs (Harris, Beebe, 2012). COX-2 activity is also implicated in the amplification of oxidative stress, as it increases ROS production, especially superoxide anion, an important generator of other ROS, including OH^- and lipid peroxides (Kukreja et al., 1986).

The results also show that, in all the tests performed, skin samples from mice treated only with the formulation with no added CVE and exposed to UVB did not present significant difference from samples from untreated UVB-exposed controls, which demonstrates that the control formulation with no added CVE did not present any protective effect.

In conclusion, the present data shows the effectiveness of the topical administration of CVE added formulation on UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. Results also suggest the possible use of CVE as a topical strategy for photochemoprevention and point to the importance of further pre-clinical and clinical studies elucidating a possible role of *C. verbenacea* in UVB-induced skin cancer prevention.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Universidade Estadual de Londrina, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG), Escritório de Apoio ao Pesquisador; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil); Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil); Financiadora de Estudos e Projetos and Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (FINEP/SETI-PR, Brazil); Fundação Araucária (Brazil). The authors also thank the support of CMLP-UEL and CEPPOS-UEL. Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 571, 153–173.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>
- Afaq, F., Mukhtar, H., 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* 15 (9) :678-84 .<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x>
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Aratani, Y., 2018. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 640, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Athar, M., An, K., Morel, K.D., Kim, A., Aszterbaum, M., Longley, J., Epstein, E.H., Bickers, D.R., 2001. Ultraviolet B (UVB) - Induced COX-2 expression in murine skin : an immunohistochemical study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1047, 1042–1047.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4201>
- Bayeux, M.C., Fernandes, A.T., Foglio, M.A., Carvalho, J.E., 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35, 1229–1232. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002001000017>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power":FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70 – 76.
- Bhatia, N., Demmer, T.A., Sharma, A.K., Elcheva, I., Spiegelman, V.S., 2011. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.023>
- Bolfa, P., Vidrighinescu, R., Petruta, A., Dezmirean, D., Stan, L., Vlase, L., Damian, G., Catoi, C., Filip, A., Clichici, S., 2013. Photoprotective effects of romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food Chem. Toxicol.* 62, 329–342.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.078>
- Bowden, G.T., 2004. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B light signalling. *Nat. Rev. Cancer* 4, 23–35. <https://doi.org/10.1038/nrc1253>
- Bradley, P.P.B., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Brasil, 2010. Farmacopeia Brasileira, 5th ed. ANVISA.
- Buckman, Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., Pentland, A.P., 1998. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin : Implications for

- the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. 19 (5): 723–729.
- Campanini, M.Z., Custodio, D.L., Ivan, A.L., Martins, S.M., Paranzini, M.J., Martinez, R.M., Verri Jr., W.A., Vicentini, F.T., Arakawa, N.S., Baracat, M.M., Casagrande, R., Georgetti, S.R., 2014. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech* 15, 86–95. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0049-8>
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L.M., Ferreira, V.S., Vilela, F.M.P., Vicentini, F. M.C., Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W. a, Jabor, J.R., Santos, A.C., Fonseca, M.J. V, 2006a. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech* 7, E10. <https://doi.org/10.1208/pt070110>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Dorta, D.J., dos Santos, A.C., Fonseca, M.J.V., 2006b. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>
- Cezar, T.L.C., Martinez, R.M., Rocha, C., Melo, C.P.B., Vale, D.L., Borghi, S.M., Fattori, V., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr, W.A., Casagrande, R., 2019. Treatment with maresin 1, a resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. *Sci. Rep.* 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>
- Clydesdale, G.J., Dandie, G.W., Muller, H.K., 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79, 547–568. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x>
- Cooper, S., Bowden, G., 2007. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 325–334. <https://doi.org/10.2174/156800907780809714>
- Deng, Y., Ediriwickrema, A., Yang, F., Lewis, J., Girardi, M., Satzman, M., 2016. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. *Nat Mater.* 14, 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nmat4422>
- Dos Santos, J.I., Cardoso, F.F., Soares, A.M., Silva, M.P.S., Gallacci, M., Fontes, M.R.M., 2011. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic

- acid : new insights into Lys49-PLA 2 inhibition. PLoS One 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>
- Dresler, S., Szymczak, G., Wójcik, M., 2017. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. Pharm. Biol. 0, 000.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265986>
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacol. Res.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Elmets, C.A., Ledet, J., Athar, M., Diseases, S., 2015. Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. J Invest Dermatol. 134, 2497–2502. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.192>.Cyclooxygenases
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T.M.C., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J.V., 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. J. Ethnopharmacol. 127, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and Leukotrienes : advances in eicosanoid biology. Science. 30 ;294 (5548): 1871–1876.
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Moura-de-Carvalho Vicentini, F.T., Verri, W.A., Fonseca, M.J.V., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 64, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.04.003>
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Verri, W.A., Fonseca, M.J. V, 2013. Protective effect of fermented soybean dried extracts against tpa-induced oxidative stress in hairless mice skin. Biomed Res. Int. 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/340626>
- Gilchrest, B.A., 2016. A review of skin ageing and its medical therapy. British J. dermatology 135, 867–875.
- Gonzalez Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. Free Radic. Biol. Med. 10, 93–100.
- Granado-serrano, A.B., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2012. Chemico-Biological Interactions Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells : Involvement of p38. Chem. Biol. Interact. 195, 154–164.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.005>
- Guaratini, T., Medeiros, M.H.G., Colepicolo, P., 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. Quim. Nova 30, 206–213.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100033>

- Hahn, H.J.I.N., Kim, K.I.B., An, I.N.S., Ahn, K.Y.U.J., Han, H.J.O.O., 2017. Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide - induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Mol. Med. Rep.* 16, 9763–9769. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7804>
- Halliday, G.M., 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>
- Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>
- Harris, R.E., Beebe, J., 2012. Reduction in cancer risk by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *J. Exp. Pharmacol.* 91–96.
- Harvima, I.T., Nilsson, G., 2011. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Derm Venerol* 91, 2–10. <https://doi.org/10.2340/00015555-1197>
- Hassan, S.M.A., Hussein, A.J., Saeed, A.K., 2015. Role of green tea in reducing epidermal thickness upon ultraviolet light-B injury in BALB/c mice. *Adv. Biol.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/890632> Research
- Huber, P.C., Almeida, W.P., De Fátima, Â., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importancia em processos patológicos. *Quim. Nova* 31, 1170–1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ivan, A.L.M., Campanini, M.Z., Martinez, R.M., Ferreira, V.S., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vilela, F.M.P., Martins, F.S., Zarpelon, A.C., Cunha, T.M., Fonseca, M.J.V., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2014. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 138, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>
- Jenkins, G., 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123, 801–810. <https://doi.org/10.4161/derm.19858>
- John, A., Tuszynski, G., 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 7, 14–23. <https://doi.org/10.1007/BF03032599>
- Katalinic, V., Modun, D., Music, I., Boban, M., 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays.

- Comp. Biochem. Physiol. Part C 140, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>
- Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Dewitt, D.L., 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7, 7–13. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80015-X)
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Albuhaydar, A.R., Mayer, W., Luca, D., Korkina, L., 2017. Natural substances for prevention of skin photo-ageing: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Res.* 1–34.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K.N., Wood, J.G., 2016. Mast cell: a multi-functional master cell. *Front. Pharmacol.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH RC Kukreja, HA Kontos, ML Hess and EF Ellis *Circ. Res.* 1986;59;612-619. *Circ. Res.* 59, 612–620.
- Laethem, A. Van; Claerhout, S.; Garmyn, M.; Agostinis, P. 2005. The sunburn cell : regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1547–1553. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.015>
- Lembo, S.; Balato, A.; Caprio, R.; Di Cirillo, T.; Giannini, V.; Gasparri, F.; Monfrecola, G. 2014. The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine / chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) Cells. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/346793>
- Mantena, S.K., Katiyar, S.K., 2006. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1603–1614. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.032>
- Mao, L., Wang, H., Qiao, L., Wang, X., 2010. Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/238321>
- Martinez, R.M., Pinho-ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Carla, V., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2015a. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 148, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C. V., Vignoli, J.A., Barbosa, D.S., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2015b. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. *J. Nat. Prod.* 78, 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>

- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Silva, T.C.C., Caviglione, C.V., Bottura, C., Fonseca, M.J.V., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016b. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146296>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Vale, D.L., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2017b. Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 171. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.002>
- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Santos, B.S., Sobral De Souza, C.E., Alencar Ferreira, J.V. De, Santos De Lavor, A.K.L., Figueredo, F.G., Ferreira De Lima, L., Vieira Dos Santos, F.A., Neves Peixoto, F.S., Viana Colares, A., Augusti Boligon, A., Saraiva, R.D.A., Athayde, M.L., Da Rocha, J.B.T., Alencar Menezes, I.R., Douglas Melo Coutinho, H., Da Costa, J.G.M., 2013. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. Evidence-based Complement. *Altern. Med.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/164215>
- Matos, D.O., Tironi, F.L., Martins, D.H.N., Fagg, C.W., Netto Júnior, N.L., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y.M., 2015. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. *Rev. Bras. Pl. Med.* 7, 857–864.
- Medeiros, R., Passos, G.F., Vitor, C.E., Koepf, J., Mazzuco, T.L., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* 151, 618–627. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707270>
- Meloni, M., Nicolay, J.F., Franc, J., 2003. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. *Toxicol. Vitro.* 17, 609–613. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00114-0)
- Murphy, G., Ar, Y., Hc, W., Kulms, D., The, S.T., Wulf, H.C., Kulms, D., 2001. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp. Dermatol.* 10, 155–160.
- Nishigori, C., Hattori, Y., Toyokuni, S., 2004. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 6.
- Onoue, S., Kobayashi, T., Takemoto, Y., Sasaki, I., 2003. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 33, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.08.002>
- Parisotto, E.B., Michielin, E.M.Z., Biscaro, F., Ferreira, S.R.S., Filho, D.W., Pedrosa, R.C.,

2012. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* 61, 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.016>
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.* 110, 323–333.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Rhodes, L.E., Belgi, G., Parslew, R., Mcloughlin, L., Clough, G.F., Friedmann, P.S., 2001. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *J. Invest. Dermatol.* 117, 880–885. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01514.x>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S.M., Silva, A.M.S., Laufer, S., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2014. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine / chemokine production in human whole blood. *Inflammation.* <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9995-x>
- R Rijken, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., 2011. Photoaged Skin: the role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 120–124. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.221>
- Saito, P., Melo, C.P.B., Martinez, R.M., Fattori, V., Cezar, T.L.C., Pinto, I.C., Busmann, A.J.C., Vignoli, J.A., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2018. The lipid mediator resolvin D1 reduces the skin inflammation and oxidative stress induced by UV irradiation in hairless mice. *Front. Pharmacol.* 9, 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>
- Saw, C.L., Huang, M., Liu, Y., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A., 2011. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation / photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol. Carcinog.* 486, 479–486. <https://doi.org/10.1002/mc.20725>
- Saw, C.L.L., Yang, A.Y., Huang, M., Liu, Y., Lee, J.H., Khor, T.O., Su, Z., Shu, L., Lu, Y., Conney, A.H., Kong, A.T., 2014. Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell Biosci.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-39>

- Scheckel, K.A., Degner, S.C., Romagnolo, D.F., 2008. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1 – dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer. *J. Nutr.* 2–9. <https://doi.org/10.3945/jn.108.090431>.)
- Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T.A., Schwarz, T., 1995. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104, 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, T.T., Azzolini, C.P., Penna, S.C., 1991. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of crude leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* 31, 239–247.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of Artemetin 56, 36–40.
- Sharma, P., de Oca, M.K.M., Alkeswani, A.R., McClees, S.F., Das, T., Elmets, C.A., Afag, F., 2018. Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 34, 50–59. <https://doi.org/10.1111/phpp.12356>.Tea
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L., 1994. Enzymic and non enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 122–124.
- Srinivasan, P., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S., 2007. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci.* 80, 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>
- Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D., 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: a review. *Biomed.Papers* 147, 137–145.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 150, 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Tang, S., Liao, P., Hung, S., Ge, J., 2017. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6 , IL-8 , MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- k B signaling pathway in keratinocytes and mice skin. *J. Dermatol. Sci.* 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.03.004>
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, Â.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.023>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

- Van Laethem, A., Agostinis, P., 2009. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 299–308.
<https://doi.org/10.1039/b813346h>
- Verri, W.A., Guerrero, A.T.G., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2008. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *PNAS* 105, 2723–2728.
- Vicentini, F.T.M.C., He, T., Shao, Y., Fonseca, M.J. V, Verri, W.A., Fisher, G.J., Xu, Y., 2011. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J. Dermatol. Sci.* 61, 162–168.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.002>
- Wang, Y., Chen, J., Ling, M., López, J.A., Chung, D.W., Fu, X., 2015. Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: An oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation. *J. Biol. Chem.* 290, 1422–1431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599084>
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M., 2002. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* 185, 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00240-9)
- Wilgus, T.A., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Kusewitt, D.F., Rubal, P.A., Oberyszyn, T.M., 2003. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol. Carcinog.* 38, 49–58.
<https://doi.org/10.1002/mc.10141>
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617–653.
- Xu, Y., Fisher, G.J., 2005. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermatological Sci. Suppl.* 2 SUPPL., 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.descs.2006.08.001>
- Zhang, X., Dodd, G., Rovin, B.H., Kunsch, C., Chen, X.-L., Thomas, S., Wasserman, M.A., 2005. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 290, H1862–H1870. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2005>

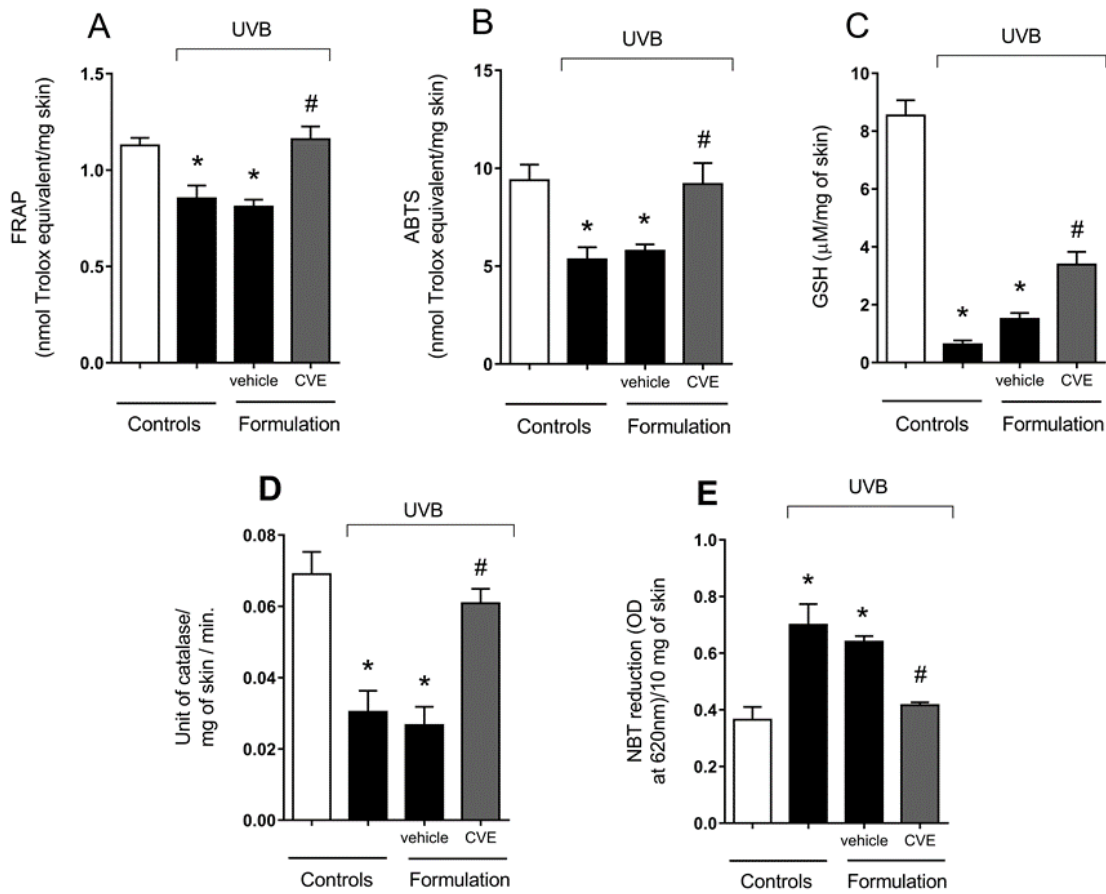


Figure 1. CVE added formulation inhibits UVB radiation-induced antioxidant depletion and oxidative stress. Antioxidant capacity of skin was measured by FRAP (A) and ABTS (B) scavenging assays; GSH levels (C) and catalase activity (D). Superoxide anion production was measured by nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay (E). Samples were collected 12 h after the end of the radiation for FRAP, ABTS and GSH and 2 h after the end of the radiation for catalase activity and superoxide anion production. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bars).

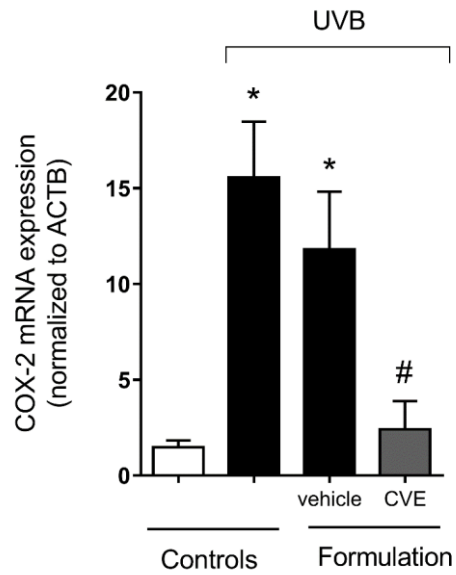


Figure 2. CVE added formulation reduces mRNA expression of COX-2 determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in samples collected 4 h after the end of the radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bars).

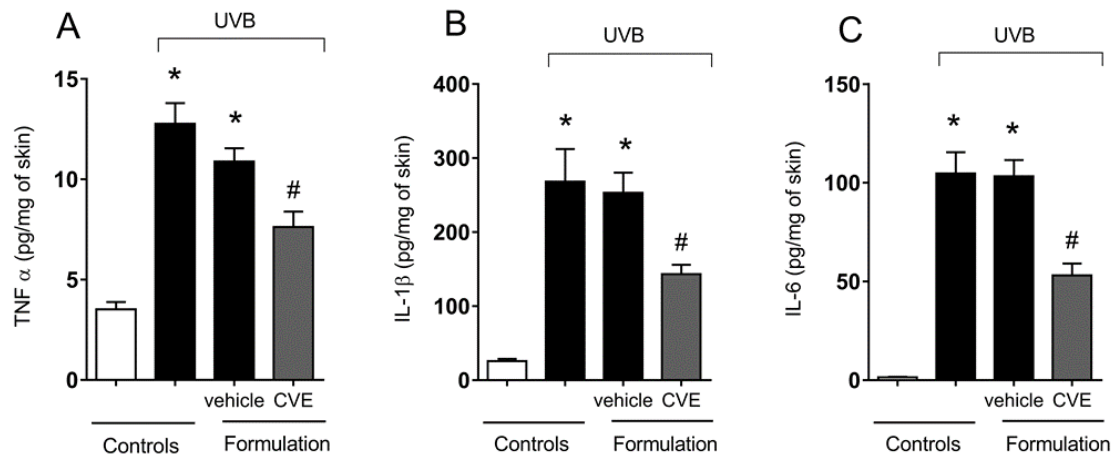


Figure 3. CVE added formulation inhibits cytokine production. Levels of TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) were determined 4 h after the end of the radiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bars).

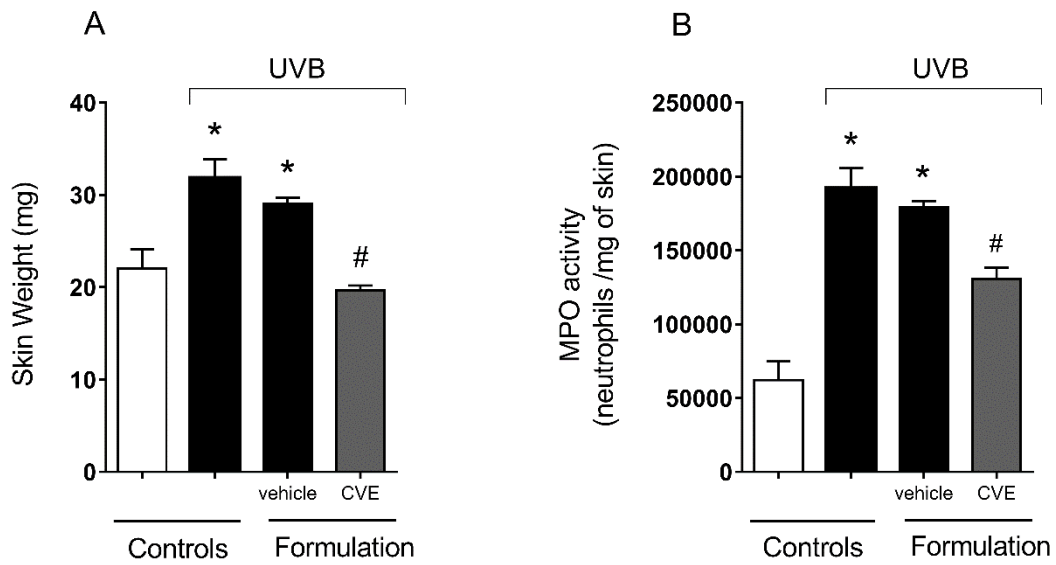


Figure 4. CVE added formulation inhibits UVB induced edema **(A)** and MPO activity **(B)**. Edema and MPO activity were determined in samples collected 12 h after irradiation. Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-irradiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to irradiated control groups (black bar).

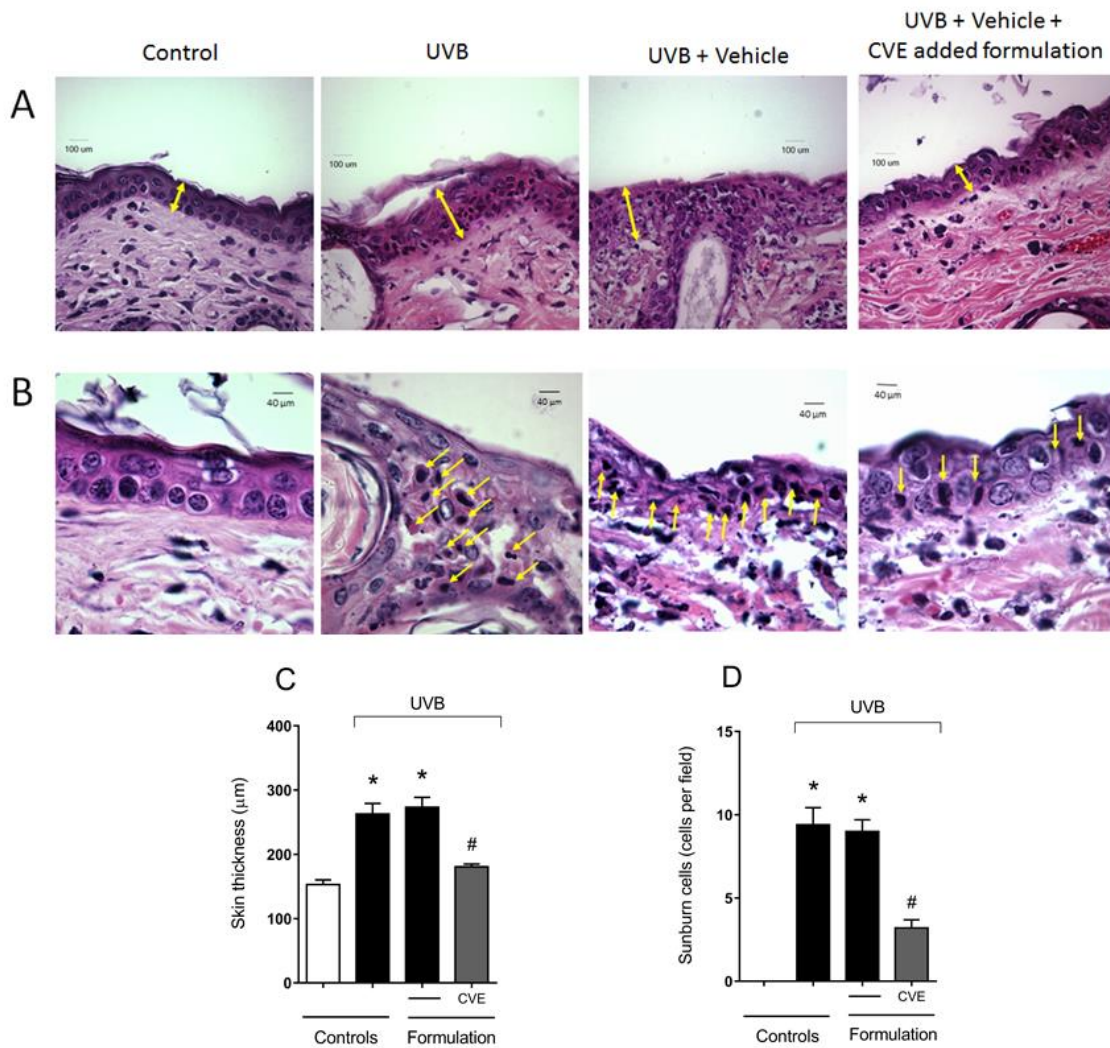


Figure 5. CVE added formulation reduces UVB radiation-induced epidermal thickness and the number of sunburn cells. Skin samples were collected 12 h after the end of the radiation, stained with hematoxylin and eosin staining (HE) and examined using light microscopy under 400 x objectives for determination of the epidermal thickness and 100x objectives for the counting of sunburn cells. Epidermal thickness image of the four test groups (**A**); sunburn image of the four test groups (**B**); epidermal thickness in micrometers (**C**); and number of sunburn cells per field (**D**). Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bar)

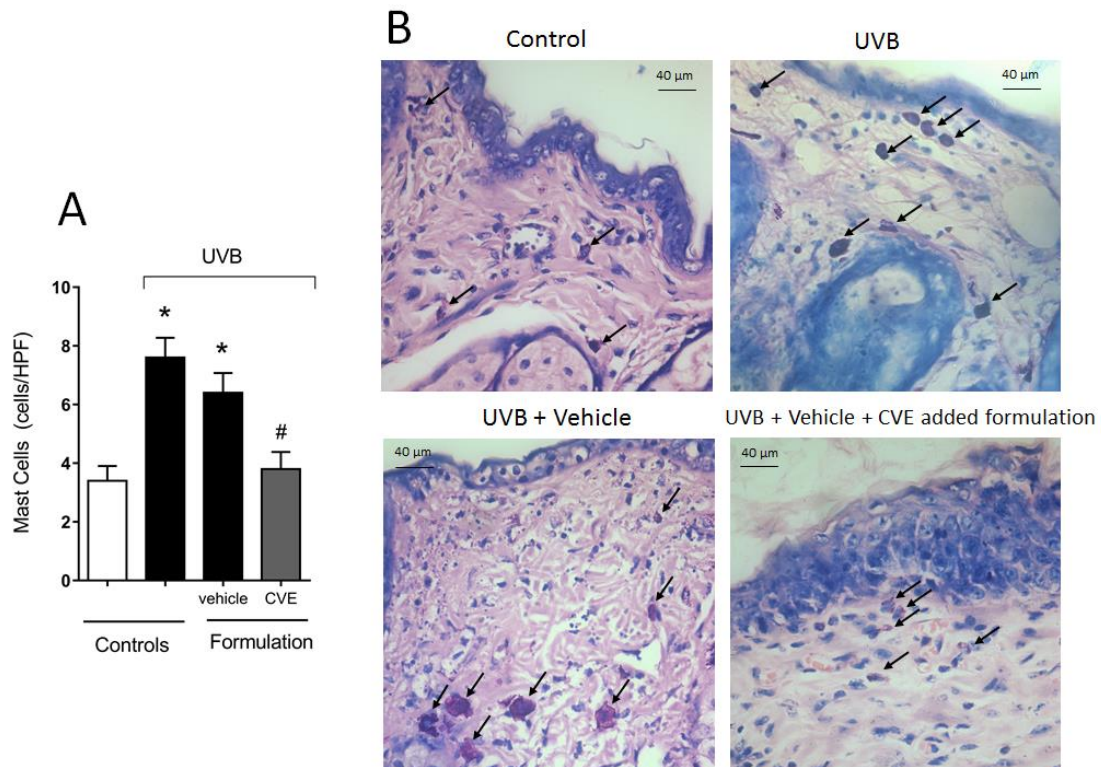


Figure 6. CVE added formulation reduces UVB radiation-induced mast cells number in the skin. Mast cells were evaluated using blue toluidine stained skin samples collected 12 h after the end of radiation. Number of mast cells **(A)** and the sections stained with blue toluidine and examined under light microscopy at 400 x magnification **(B)**. Bars represent means \pm SEM; of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to radiated control groups (black bars).

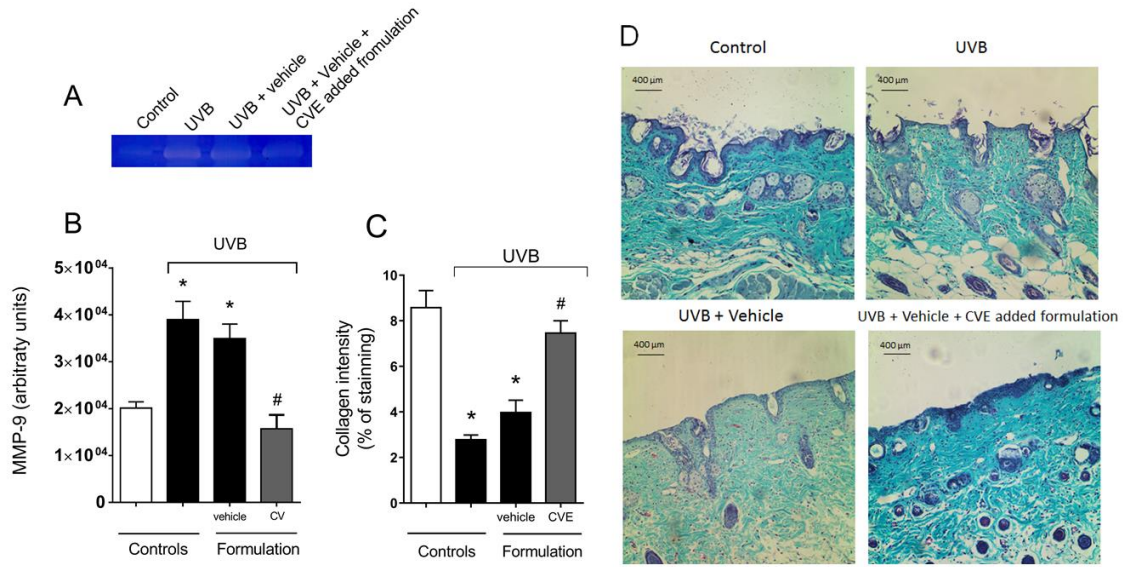


Figure 7. CVE added formulation inhibits UVB radiation-induced increase of MMP-9 activity and collagen fibers damage to the skin in hairless mice. Samples were collected 12 h after the end of radiation. Representative image of gelatin zymography illustrating MMP-9 activity (**A**); MMP-9 activity (**B**); collagen fiber intensity evaluated as percentage of staining (**C**) and collagen fiber intensity and bundles, shown in blue, were analyzed by Image J Program (10 x magnification) (**D**). Bars represent means \pm SEM of 5 mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ compared to non-radiated control group (white bar); # $p < 0.05$ compared to the radiated control groups (black bars).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O dano inflamatório e oxidativo causado pelo UVB representa um desafio importante, uma vez que já tem sido demonstrada a ligação entre alta exposição à radiação UVB e o câncer de pele.

Estudos anteriores já mostram que *C. verbenacea* apresenta grande potencial terapêutico em doenças inflamatórias e, devido à sua composição em compostos fenólicos, também apresenta um grande potencial antioxidante. Nesse trabalho, foi comprovada a presença de compostos fenólicos e flavonóides no ECV. A avaliação do potencial antioxidante do ECV *in vitro* demonstrou atividade sequestradora de radicais livres, quelante e inibidora da peroxidação lipídica.

A administração oral ou tópica de ECV a camundongos sem pelo, submetidos à radiação UVB, diminuiu o edema, a infiltração de neutrófilos e mastócitos, inibiu a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, a hiperplasia epidérmica e o aparecimento de queratinócitos apoptóticos, controlou a produção de MMP-9 e a consequente degradação do colágeno e, no caso do tratamento tópico, inibiu a expressão da COX-2. Com relação ao controle do estresse oxidativo, ECV oral aumentou a expressão de genes ligados a resposta antioxidante Nrf-2, NQO-1 e HO-1 e preveniu a formação de peróxidos lipídicos. Tanto no tratamento oral como no tópico os resultados mostraram que ECV foi capaz de aumentar o GSH e a atividade da catalase, inibir a formação de ânion superóxido e aumentar a capacidade de neutralização de radicais livres pela pele.

Concluindo, os resultados desse estudo sugerem que, por seu efeito no controle da inflamação e do estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB, ECV pode ser considerado uma boa estratégia de fotoquimioprevenção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 571, 153–173.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.019>
- Afaq, F., Mukhtar, H., 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* 15 (9) :678-84 .<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x>
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Al-Musayeib, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., Hussain, A., 2011. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules.* 16, 10214–10226. <https://doi.org/10.3390/molecules161210214>
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D.J., Decker, E.A., 2009. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2969–2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Amoah, S.K.S., Sandjo, L.P., Kratz, J.M., Biavatti, M.W., 2016. Rosmarinic Acid - Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med.* 82, 388–406.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1568274>
- Aratani, Y., 2018. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 640, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Athar, M., An, K., Morel, K.D., Kim, A., Aszterbaum, M., Longley, J., Epstein, E.H., Bickers, D.R., 2001. Ultraviolet B (UVB) - Induced COX-2 expression in murine skin : an immunohistochemical study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1047, 1042–1047.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4201>
- Baldwin Jr., A.S., 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649–683.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>
- Balupillai, A., Prasad, R.N., Ramasamy, K., Muthusamy, G., Shanmugham, M., Govindasamy, K., Gunaseelan, S., 2015. Caffeic acid inhibits UVB-induced inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- c in mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 1458–1468.
<https://doi.org/10.1111/php.12522>
- Bayeux, M.C., Fernandes, A.T., Foglio, M.A., Carvalho, J.E., 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian J.*

- Med. Biol. Res. 35, 1229–1232. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002001000017>
- Bellik, Y., Boukraâ, L., Alzahrani, H.A., Bakhotmah, B.A., Abdellah, F., Hammoudi, S.M., Iguer-Ouada, M., 2013. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules* 18, 322 – 353. <https://doi.org/10.3390/molecules18010322>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power":FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70 – 76.
- Bhatia, N., Demmer, T.A., Sharma, A.K., Elcheva, I., Spiegelman, V.S., 2011. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.023>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200. [https://doi.org/BLOIS, M. S. \(1958\)](https://doi.org/BLOIS, M. S. (1958)).
- Bolann, J.B., Ulvik, R., 1987. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem.J.* 243, 55–59.
- Bolfa, P., Vidrighinescu, R., Petruta, A., Dezmirean, D., Stan, L., Vlase, L., Damian, G., Catoi, C., Filip, A., Clichici, S., 2013. Photoprotective effects of romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food Chem. Toxicol.* 62, 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.078>
- Bowden, G.T., 2004. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B light signalling. *Nat. Rev. Cancer* 4, 23–35. <https://doi.org/10.1038/nrc1253>
- Bradley, P.P.B., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Brasil, 2010. Farmacopeia Brasileira, 5th ed. ANVISA.
- BRASIL - Ministério da Saúde, 2009. RENSUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS Espécies vegetais.
- Braun, S., Hanselmann, C., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Kan, Y.W., Werner, S., Chan, K., Gassmann, M.G., 2002. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5492–5505. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.15.5492-5505.2002>
- Brewer, M.S., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of Action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 221–247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Brownlow, B., Nagaraj, V.J., Nayel, A., Joshi, M., Elbayoumi, T., 2015. Development and *in vitro* evaluation of vitamin E-enriched nanoemulsion vehicles loaded with genistein for chemoprevention against UVB-induced skin damage. *J. Pharm. Sci.* 104, 3510–3523.

- <https://doi.org/10.1002/jps.24547>
- Buckman, Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., Pentland, A.P., 1998. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin : Implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. 19 (5): 723–729.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Biomembr. - Part C Biol. oxidations* 129, 302–310. [https://doi:10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi:10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
- Campanini, M.Z., Custodio, D.L., Ivan, A.L., Martins, S.M., Paranzini, M.J., Martinez, R.M., Verri Jr., W.A., Vicentini, F.T., Arakawa, N.S., Baracat, M.M., Casagrande, R., Georgetti, S.R., 2014. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech* 15, 86–95. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0049-8>
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L.M., Ferreira, V.S., Vilela, F.M.P., Vicentini, F. M.C., Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.08.007>
- Cao, H., Cheng, W.X., Li, C., Pan, X.L., Xie, X.G., Li, T.H., 2005. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 719, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.01.029>
- Carini, M., Aldini, G., Piccone, M., Facino, R.M., 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmaco* 55, 526–534. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(00\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(00)00037-9)
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W. a, Jabor, J.R., Santos, A.C., Fonseca, M.J. V, 2006a. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech* 7, E10. <https://doi.org/10.1208/pt070110>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Borin, M.F., Lopez, R.F. V, Fonseca, M.J. V, 2007. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *Int. J. Pharm.* 328, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.006>
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Dorta, D.J., dos Santos, A.C., Fonseca, M.J.V., 2006b. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>
- Cezar, T.L.C., Martinez, R.M., Rocha, C., Melo, C.P.B., Vale, D.L., Borghi, S.M., Fattori, V., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr, W.A.,

- Casagrande, R., 2019. Treatment with maresin 1, a resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. *Sci. Rep.* 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39584-6>
- Chen, L., Hu, J.Y., Wang, S.Q., 2012. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Dermatology* 67, 1013–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.009>
- Choi, J.Y., Choi, D.I., Lee, J.B., Yun, S.J., Lee, D.H., Eun, J.B., Lee, S.C., 2013. Ethanol extract of peanut sprout induces Nrf2 activation and expression of antioxidant and detoxifying enzymes in human dermal fibroblasts: implication for its protection against UVB-irradiated oxidative stress. *Photochem. Photobiol.* 89, 453–460.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01244.x>
- Clydesdale, G.J., Dandie, G.W., Muller, H.K., 2001. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79, 547–568.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01047.x>
- Colica, C., Renzo, L. Di, Aiello, V., Lorenzo, A. De, Abenavoli, L., 2018. Rosmarinic Acid as Potential Anti-Inflammatory Agent. *Rev Recent Clin Trials.* 13 (4): 240-242.
<https://doi.org/10.2174/157488711304180911095818>.
- Cooper, S., Bowden, G., 2007. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 325–334.
<https://doi.org/10.2174/156800907780809714>
- Correa, E.C., Vitorino, A.V., 2002. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações do luminol em métodos cinéticos de análise. *Quim.Nova* 25, 1003–1011.
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Deng, Y., Ediriwickrema, A., Yang, F., Lewis, J., Girardi, M., Satzman, M., 2016. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. *Nat Mater.* 14, 1278–1285.
<https://doi.org/10.1038/nmat4422>
- Dodeigne, C., Thunus, L., Lejeune, R., 2000. Chemiluminescence as diagnostic tool : a review. *Talanta.* 6; 51(3):415-39.
- Dos Santos, J.I., Cardoso, F.F., Soares, A.M., Silva, M.P.S., Gallacci, M., Fontes, M.R.M., 2011. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid : new insights into Lys49-PLA 2 inhibition. *PLoS One* 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>
- Dresler, S., Szymczak, G., Wójcik, M., 2017. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharm. Biol.* 0, 000.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265986>

- Duan, X., Wu, T., Liu, T., Yang, C., Ding, X., Mu, Y., Chen, Y., 2019. Vicenin-2 ameliorates oxidative damage and photoaging via modulation of MAPKs and MMPs signaling in UVB radiation exposed human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 190, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.018>
- Dupont, E., Gomez, J., Bilodeau, D., 2013. Beyond UV radiation: A skin under challenge. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 224–232. <https://doi.org/10.1111/ics.12036>
- Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Elmets, C.A., Ledet, J., Athar, M., Diseases, S., 2015. Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *J Invest Dermatol.* 134, 2497–2502. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.192.Cyclooxygenases>
- Englberger, W., Hadding, U., Graf, E., Leyck, S., Winkelmann, J., Parnham, M.J., 1988. Rosmarinic acid: a new inhibitor of complement C3-convertase with anti-inflammatory activity. *Int.J.Immunopharmacology* 10, 729–737.
- EPA, 2011. Recommended Use of Body Weight 3 / 4 as the Default Method in Derivation of the Oral Reference Dose.
- Fernando, P., Piao, M.J., Kang, K.A., Ryu, Y.S., Ruwan, S., Madduma, K., Chae, S.W., Hyun, J.W., 2016. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells *Biomol Ther (Seoul)*. 24 (1): 75–84.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T.M.C., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J.V., 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J. Ethnopharmacol.* 127, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Fuchs, J., Zollner, T.M., Kaufmann, R., Podda, M., 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 337–353. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00482-2)
- Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and Leukotrienes : advances in eicosanoid biology. *Science.* 30 ;294 (5548): 1871–1876.
- Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., 2011. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol.* 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/451682>
- Geller, F., Schmidt, C., Götttert, M., Fronza, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E.M.M., Merfort, I., Laufer, S., 2010. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 561–566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.062>

- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Di Mambro, V.M., Azzolini, A.E.C.S., Fonseca, M.J. V, 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci* 5, 1–5. <https://doi.org/10.1208/ps050220>
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Moura-de-Carvalho Vicentini, F.T., Verri, W.A., Fonseca, M.J.V., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.04.003>
- Georgetti, S.R., Casagrande, R., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Verri, W.A., Fonseca, M.J. V, 2013. Protective effect of fermented soybean dried extracts against tpa-induced oxidative stress in hairless mice skin. *Biomed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/340626>
- Georgetti, S.R., Verri, W.A., Borin, M.D.F., 2007. Assessment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different in vitro methods. *Lat. Am. J. Pharm.* 26, 252–7.
- Gilbert, B., Favoreto, R., 2013. *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. *Rev. Fitos* 7, 17–25.
- Gilchrest, B.A., 2016. A review of skin ageing and its medical therapy. *British J. dermatology* 135, 867–875.
- Gonzalez Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A., 1991. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93–100.
- Granado-serrano, A.B., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2012. Chemico-Biological Interactions Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells : Involvement of p38. *Chem. Biol. Interact.* 195, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.005>
- Grujil, F.R.; Van Der Leun, J.C. 2000. Environment and health: ozone depletion and ultraviolet radiation. *CMAJ.* 163, 851–855.
- Guaratini, T., Medeiros, M.H.G., Colepicolo, P., 2007. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quim. Nova* 30, 206–213. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100033>
- Hahn, H.J.I.N., Kim, K.I.B., An, I.N.S., Ahn, K.Y.U.J., Han, H.J.O.O., 2017. Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide - induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Mol. Med. Rep.* 16, 9763–9769. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7804>
- Halliday, G.M., 2005. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>

- Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 531–542.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008>
- Harris, R.E., Beebe, J., 2012. Reduction in cancer risk by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *J. Exp. Pharmacol.* 91–96.
- Harvima, I.T., Nilsson, G., 2011. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Derm Venerol* 91, 2–10. <https://doi.org/10.2340/00015555-1197>
- Hassan, S.M.A., Hussein, A.J., Saeed, A.K., 2015. Role of green tea in reducing epidermal thickness upon ultraviolet light-B injury in BALB/c mice. *Adv. Biol.* 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/890632> Research
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132, 344–362.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hoeltgebaum, M.P., Montagna, T., Lando, A.P., 2018. Reproductive biology of *Varronia curassavica* Jacq . (Boraginaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 59–71.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160273>
- Holick, M.F., 2016. Biological effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light , infrared radiation and vitamin D for health. *Anticancer Res.* 36, 1345–1356.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., De Fátima, Â., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova* 31, 1170–1179.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21–39.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ivan, A.L.M., Campanini, M.Z., Martinez, R.M., Ferreira, V.S., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vilela, F.M.P., Martins, F.S., Zarpelon, A.C., Cunha, T.M., Fonseca, M.J.V., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2014. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 138, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010>
- Jenkins, G., 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123, 801–810.
<https://doi.org/10.4161/derm.19858>
- John, A., Tuszynski, G., 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis

- and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 7, 14–23.
<https://doi.org/10.1007/BF03032599>
- Karin, M., Greten, F.R., 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.
<https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Katalinic, V., Modun, D., Music, I., Boban, M., 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 140, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.005>
- Katiyar, S.K., Mukhtar, H., 2001. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *J Leukoc Biol* 69, 719–726.
- Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Dewitt, D.L., 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7, 7–13.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80015-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80015-X)
- Kim, E.K., Choi, E.J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 396–405.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Kobayashi, M., Yamamoto, M., 2005. Pathway of antioxidant gene regulation. *Antiox Redox Signal* 7, 385–394. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.385>
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C., 2011. Anatomy and physiology of the skin. *J. Dermatology Nurses Association* 3, 203–213.
<https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Albuhaydar, A.R., Mayer, W., Luca, D., Korkina, L., 2017. Natural substances for prevention of skin photo-ageing: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Res.* 1–34.
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K.N., Wood, J.G., 2016. Mast cell: a multi-functional master cell. *Front. Pharmacol.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH RC Kukreja, HA Kontos, ML Hess and EF Ellis *Circ. Res.* 1986;59;612-619. *Circ. Res.* 59, 612–620.
- Kumar, H., Kim, I., More, S.V., Kim, B., 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2 / ARE pathway for chronic diseases. *R. Soc. Chem. - NPR* 2.
<https://doi.org/10.1039/c3np70065h>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Laethem, A. Van; Claerhout, S.; Garmyn, M.; Agostinis, P. 2005. The sunburn cell :

- regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1547–1553. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.015>
- Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, 1–10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Lembo, S.; Balato, A.; Caprio, R.; Di Cirillo, T.; Giannini, V.; Gasparri, F.; Monfrecola, G. 2014. The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine / chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) Cells. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/346793>
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 125, 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>
- Lephart, E.D. 2016. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 31, 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>
- Lin, W., Karin, M., Lin, W., Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. Review series: a cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer 117, 1175–1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537.data>
- Lingnert, H., Vallentin, K., Eriksson, C.E. 1979. Measurement of antioxidant effect in model system. *J. food Process. Preserv.* 3, 87–103. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1979.tb00574.x>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S., 2017. NF-kB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Machado, N.F.L., Domínguez-Perles, R., 2017. Addressing facts and gaps in the phenolics chemistry of winery By-Products 1–48. <https://doi.org/10.3390/molecules22020286>
- Mantena, S.K., Katiyar, S.K., 2006. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-κB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1603–1614. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.032>
- Mao, L., Wang, H., Qiao, L., Wang, X., 2010. Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor-kappaB activity, tumor necrosis factor- α, and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2010/238321>
- Marrot, L., Meunier, J.R., 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.12.007>
- Martinez, R.M., Fattori, V., Saito, P., Melo, C.B.P., Borghi, S.M., Pinto, I.C., Bussmann, A.J.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2018. Lipoxin A4

- inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *J. Dermatol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.04.014>
- Martinez, R.M., Pinho-ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Carla, V., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2015a. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 148, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.030>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C.V., Fattori, V., Busmann, A.J.C., Bottura, C., Fonseca, M.J.V., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2017a. Trans-Chalcone, a Flavonoid Precursor, Inhibits UV-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice by Targeting NADPH Oxidase and Cytokine Production 1011 to 1202. <https://doi.org/10.1039/C6PP00442C>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C.V., Pala, D., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016a. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 15, 554–63. <https://doi.org/10.1039/c5pp00467e>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Caviglione, C. V., Vignoli, J.A., Barbosa, D.S., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2015b. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. *J. Nat. Prod.* 78, 1647–1655. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00198>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S., Silva, T.C.C., Caviglione, C.V., Bottura, C., Fonseca, M.J.V., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2016b. Topical formulation containing naringenin: Efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146296>
- Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Vale, D.L., Steffen, V.S., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Casagrande, R., 2017b. Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 171. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.002>
- Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Zimmermann, V.V.M., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Fonseca, M.J. V, Vicentini, F.T.M.C., Moreira, I.C., Andrei, C.C., Verri-JR, W.A., Casagrande, R., Vanessa, V.M., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., 2012. *Tephrosia sinapou* extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 587–597.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000006>

- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Santos, B.S., Sobral De Souza, C.E., Alencar Ferreira, J.V. De, Santos De Lavor, A.K.L., Figueredo, F.G., Ferreira De Lima, L., Vieira Dos Santos, F.A., Neves Peixoto, F.S., Viana Colares, A., Augusti Boligon, A., Saraiva, R.D.A., Athayde, M.L., Da Rocha, J.B.T., Alencar Menezes, I.R., Douglas Melo Coutinho, H., Da Costa, J.G.M., 2013. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/164215>
- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Silva, M.K. do N., Carvalho, V.R. de A., Coutinh, H.D.M., da Costa, J.G.M., 2015. The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. Brazilian J. Pharmacogn. 25, 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.012>
- Matos, D.O., Tironi, F.L., Martins, D.H.N., Fagg, C.W., Netto Júnior, N.L., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y.M., 2015. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. Rev. Bras. Pl. Med. 7, 857–864.
- Medeiros, R., Passos, G.F., Vitor, C.E., Koepf, J., Mazzuco, T.L., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. Br. J. Pharmacol. 151, 618–627. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707270>
- Medina, I., Gallardo, J.M., González, M.J., Lois, S., Hedges, N., 2007. Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. J. Agric. Food Chem. 55, 3889–3895. <https://doi.org/10.1021/jf063498i>
- Melo, F.H.M., Molognoni, F., Jasiulionis, M.G., 2013. The role of oxidative stress in melanoma development progression and treatment, in: recent advances in biology, therapy and management of melanoma. <https://doi.org/10.5772/54937>
- Meloni, M., Nicolay, J.F., Franc, J., 2003. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. Toxicol. Vitr. 17, 609–613. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00114-0)
- Michielin, E.M.Z., De Lemos Wiese, L.P., Ferreira, E.A., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S., 2011. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. J. Supercrit. Fluids 56, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.11.006>
- Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S., Smânia, A., Smânia, E.F.A., Ferreira, S.R.S., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts

- obtained by different methods. *Bioresour. Technol.* 100, 6615–6623.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.061>
- Moon, D., Kim, M., Lee, J., Hyun, Y., Kim, G., 2010. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett.* 288, 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.033>
- Murphy, G., Ar, Y., Hc, W., Kulms, D., The, S.T., Wulf, H.C., Kulms, D., 2001. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp. Dermatol.* 10, 155–160.
- Na, E.J., Ryu, J.Y., 2018. Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomed. Dermatology* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41702-018-0024-9>
- Natarajan, V.T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R., Gokhale, R.S., 2014. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat. Chem. Biol.* 10, 542–551.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1548>
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. 284, 13291–13295.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Nichols, J.A., Katiyar, S.K., 2010. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Arch Dermatol Res.* 302, 71. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Nishigori, C., Hattori, Y., Toyokuni, S., 2004. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 6.
- Onoue, S., Kobayashi, T., Takemoto, Y., Sasaki, I., 2003. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 33, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.08.002>
- Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., Bach, F.H., 2003. Heme oxygenase-1 : unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24, 449–455.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00181-9)
- Parisotto, E.B., Michielin, E.M.Z., Biscaro, F., Ferreira, S.R.S., Filho, D.W., Pedrosa, R.C., 2012. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* 61, 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.016>
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., da Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.* 110, 323–333.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>
- Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., Micol, V., 2018. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients* 10, 1–22.

- <https://doi.org/10.3390/nu10040403>
- Petersen, M., Simmonds, M.S., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Pinnell, S.R., 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 1–19. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.16>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Pulli, B., Ali, M., Wojtkiewicz, G., Chen, J.W., Hsieh, K.L.C., Forghani, R., Schob, S., Innoila, J.J., 2013. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS One* 8, e67976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067976>
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., Sauder, D.N., 2006. Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.05.010>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Aggarwal, B., 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49, 1603–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Rhodes, L., Lim, H.W., 2007. The acute effects of ultraviolet radiation, in: *Photodermatology*. Informa Healthcare USA, Inc, New York, pp. 75–89.
- Rhodes, L.E., Belgi, G., Parslew, R., Mcloughlin, L., Clough, G.F., Friedmann, P.S., 2001. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *J. Invest. Dermatol.* 117, 880–885. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01514.x>
- Rhodes, L.E., Gledhill, K., Masoodi, M., Haylett, A.K., Brownrigg, M., Thody, A.J., 2019. The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J.* 23, 3947–3956.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-136077>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S.M., Silva, A.M.S., Laufer, S., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2014. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine / chemokine production in human whole blood. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9995-x>
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic

- compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159. <https://doi.org/716050096>
- Rijken, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., 2011. Photoaged Skin: the role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 120–124. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.221>
- Roldão, E. de F., Witaicenis, A., Seito, L.N., Hiruma-Lima, C.A., Di Stasi, L.C., 2008. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). *J. Ethnopharmacol.* 119, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.001>
- Rozema, J., Van Geel, B., Björn, L.O., Lean, J., Madronich, S., 2002. Toward solving the UV puzzle. *Science* (80). 296, 1621–1622. <https://doi.org/10.1126/science.1070024>
- Saito, P., Melo, C.P.B., Martinez, R.M., Fattori, V., Cezar, T.L.C., Pinto, I.C., Busmann, A.J.C., Vignoli, J.A., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Verri Jr., W.A., Casagrande, R., 2018. The lipid mediator resolvin D1 reduces the skin inflammation and oxidative stress induced by UV irradiation in hairless mice. *Front. Pharmacol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem.* 90, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.037>
- Santi, M.M., Sanches, F.S., Silva, J.F.M., Santos, P.M.L., 2013. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Rev. Bras. Plantas Med.* 16, 256–261. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000200014>
- Saw, C.L., Huang, M., Liu, Y., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A., 2011. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation / photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol. Carcinog.* 486, 479–486. <https://doi.org/10.1002/mc.20725>
- Saw, C.L.L., Yang, A.Y., Huang, M., Liu, Y., Lee, J.H., Khor, T.O., Su, Z., Shu, L., Lu, Y., Conney, A.H., Kong, A.T., 2014. Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell Biosci.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-39>
- Scheckel, K.A., Degner, S.C., Romagnolo, D.F., 2008. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1 – dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer. *J. Nutr.* 2–9. <https://doi.org/10.3945/jn.108.090431>
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E., Williams, R.J., Cadenas, E., Rice-evans, C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration : influences of flavonoids and of nitric oxide 23, 861–880.
- Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T.A., Schwarz, T., 1995. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial

- involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104, 922–927. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12606202>
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, T.T., Azzolini, C.P., Penna, S.C., 1991. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of crude leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* 31, 239–247.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of Artemetin 56, 36–40.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1988. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. *Planta Med.* 7–10.
- Sertié, J.A.A., Woisky, R.G., Wiesel, G., Rodrigues, M., 2005. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine* 12, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.013>
- Shah, H., Rawal Mahajan, S., 2013. Photoaging: new insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. *Biomed. Aging Pathol.* 3, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.05.003>
- Sharma, P., de Oca, M.K.M., Alkeswani, A.R., McClees, S.F., Das, T., Elmets, C.A., Afag, F., 2018. Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 34, 50–59. <https://doi.org/10.1111/phpp.12356>
- Shimizu, H., 2017. Structure and function of the skin, in: Shimizu's Dermatology. John Wiley & sons Inc., pp. 1–42.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L., 1994. Enzymic and non enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 122–124.
- Srinivasan, P., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, C.S., 2007. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. *Life Sci.* 80, 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.051>
- Staurengo-Ferrari, L., S., B.-G., Hohmann, M.S.N., Manchope, M.F., Zaninelli, T.H., Casagrande, R., Verri Jr., W.A., 2019. Contribution of Nrf2 modulation to the mechanism of action of analgesic and anti-inflammatory drugs in pre-clinical and clinical Stages. *Front. Pharmacol.* 9, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01536>
- Stocker, R., Mcdonagh, A.F., Glazer, N., Ames, B.N., 1990. Antioxidant activities of Bile Pigments: biliverdin and Bilirubin. *Methods Enzymol.* 6, 301–309.
- Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D., 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: a review. *Biomed.Papers* 147, 137–145.
- Svobodova, A., Walterova, D., Vostalova, J., 2006. Ultraviolet light induced alteration to the

- skin. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 150, 25–38.
<https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Tang, S., Liao, P., Hung, S., Ge, J., 2017. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6 , IL-8 , MCP-1 and COX-2 inflammation by modulating NF- k B signaling pathway in keratinocytes and mice skin. J. Dermatol. Sci. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.03.004>
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, Â.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon 46, 318–327.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.023>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Acker, S.A.B.E., van der Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant of flavonoids. Free Radic Biol Med. 20, 331–342.
- Van Laethem, A., Agostinis, P., 2009. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. Photochem. Photobiol. Sci. 299–308.
<https://doi.org/10.1039/b813346h>
- Vayalil, P.K., Elments, C.A., Katiyar, S.K., 2003. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. Carcinogenesis. 24, 927–936. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg025>
- Velde, V., Lavie, D., Zelnik, R., Matida, A.K., Panizza, S., 1982. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. J.Chem.Soc.PerkinTrans. 2697–2700.
- Ventrella, M.C., Marinho, C.R., 2008. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC . (Boraginaceae) leaves. Rev. Bras. Botânica 31, 457–467.
- Verri, W.A., Guerrero, A.T.G., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2008. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. PNAS 105, 2723–2728.
- Vicentini, F.T.M.C., He, T., Shao, Y., Fonseca, M.J. V, Verri, W.A., Fisher, G.J., Xu, Y., 2011. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-κB pathway. J. Dermatol. Sci. 61, 162–168.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.002>
- Wang, Y., Chen, J., Ling, M., López, J.A., Chung, D.W., Fu, X., 2015. Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: An oxidative mechanism for

- regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation. *J. Biol. Chem.* 290, 1422–1431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599084>
- Wei, H., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M., 2002. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* 185, 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00240-9)
- Wilgus, T.A., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Kusewitt, D.F., Rubal, P.A., Oberyszyn, T.M., 2003. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol. Carcinog.* 38, 49–58. <https://doi.org/10.1002/mc.10141>
- Wilgus, T.A., Ross, M.S., Parrett, M.L., Oberyszyn, T.M., 2000. Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 62, 367–384. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(00\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(00)00089-7)
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L., 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617–653.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Xu, Y., Fisher, G.J., 2005. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermatological Sci. Suppl.* 2 SUPPL., 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.descs.2006.08.001>
- Yin, Y., Li, W., Son, Y.O., Sun, L., Lu, J., Kim, D., Wang, X., Yao, H., Wang, L., Prateheeshkumar, P., Hitron, A.J., Luo, J., Gao, N., Shi, X., Zhang, Z., 2013. Quercitrin Protects Skin from UVB-induced Oxidative Damage Yuanqin. *Toxicol Appl Pharmacol.* June, 1385–1395. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.167>
- Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., Kimura, H., 2008. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol. Int.* 32, 1405–1411. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.08.011>
- Zaganjor, E., Cobb, M.H., 2011. Function and modulation of MAPK pathway. *Tocris Biosci. Cient. Rev. Ser.* 35, 1–12.
- Zhang, D., Lu, C., Yu, Z., Wang, X., Yan, L., Zhang, J., Li, H., Wang, J., Wen, A., 2017. Echinacoside alleviates UVB irradiation-mediated skin damage via inhibition of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6851464>
- Zhang, X., Dodd, G., Rovin, B.H., Kunsch, C., Chen, X.-L., Thomas, S., Wasserman, M.A.,

2005. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 290, H1862–H1870. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2005>

Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. <https://doi.org/10.1021/JF010697N>