



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ISADORA CAROLINE SAWONIUK

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIOXIDANTE DE DI-RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS  
POR *Pseudomonas aeruginosa***

---

LONDRINA

2022

**ISADORA CAROLINE SAWONIUK**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTIOXIDANTE DE DI-RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS  
POR *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia, da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial ao  
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Josiane A. Vignoli Camilios

LONDRINA  
2022

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

S271a Sawoniuk, Isadora Caroline .

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de Di-ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* / Isadora Caroline Sawoniuk. - Londrina, 2022.  
51 f. : il.

Orientador: Doumit Camillos Neto.

Coorientador: Josiane A. Vignoli Camillos.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Di-ramnolipídeos - Tese. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. 3. Atividade anti-inflamatória e antioxidante - Tese. I. Neto, Doumit Camillos . II. Camillos, Josiane A. Vignoli . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

**ISADORA CAROLINE SAWONIUK**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDADE  
DE DI-RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDO POR *Pseudomonas  
aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rúbia Casagrande Universidade  
Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de Março de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora da Medalha Milagrosa.

Aos meus orientadores, Professores Dr. Doumit Camilios Neto e Dr<sup>a</sup>. Josiane

A. Vignoli Camilios, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e auxílio durante a realização deste trabalho.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Rubia Casagrande, por ceder o seu laboratório para a realização dos testes.

Aos professores do curso pelos ensinamentos que oportunizaram, de algum modo, o desenvolvimento deste trabalho.

A minha amiga Ingrid e companheira de laboratório, que compartilhou todo o seu conhecimento e me ajudou durante os experimentos.

As minhas amigas da turma do mestrado: Gabriela, Fernanda e Vitória. Vocês foram essenciais, durante todos esses anos, compartilhando os bons momentos e tornando essa jornada mais leve.

A minha amiga Gabriela Dornelas, que mesmo distante, sempre se fez muito presente. A minha irmã Beatriz, minha alma gêmea, pelo apoio incondicional.

Ao meu noivo Richard, por me acalmar nos momentos de desespero. Obrigada, por me incentivar e não deixar desistir dos meus sonhos.

A presente Universidade, pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação científica e crescimento pessoal.

SAWONIUK, Isadora Caroline. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e anti oxidante de Di-ramnolípideos produzido por *Pseudomonas aeruginosa***. 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2022.

### RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e sua principal função é agir como barreira química e física contra danos externos. A radiação UVB chama bastante atenção por estar atingindo constantemente a superfície da Terra e causando diversos danos na pele, como envelhecimento e o desenvolvimento de câncer. Assim a suplementação da pele com produtos naturais parece ser uma alternativa interessante para mitigar os efeitos nocivos da exposição aos raios UVB. Neste trabalho foi realizada a produção de ramnolípideos por fermentação submersa, seguida de extração, para obtenção de extrato bruto concentrado, e processo de purificação com obtenção de Di-ramnolípideos (Di-RL) de alto grau de pureza (99,9 %). A inflamação e o estresse oxidativo foram induzidos por radiação UVB com uma dose de 4,14 J/cm<sup>2</sup> e o tratamento com Di-RL, *in vivo*, indicou uma considerável redução na inflamação cutânea evidenciada através: da diminuição do edema de pele; da diminuição de recrutamento de neutrófilos, da redução do espessamento da epiderme; da redução da contagem de mastócitos; e da redução da degradação de fibras de colágenos e da atividade/secreção da metaloproteinase – induzidos por irradiação UVB. Enquanto a proteção da pele contra o estresse oxidativo foi confirmado pelos níveis da glutathiona reduzida (GSH), atividade da enzima catalase, que se manteve a níveis basais, além de reduzir a produção de hidroperóxidos lipídicos e de ânions superóxidos. Deste modo, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os Di-RL apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante e consequente grande potencial para proteção da pele contra a irradiação UVB.

**Palavras-Chave:** Di-ramnolípideo, radiação UVB, atividade anti-inflamatória e atividade antioxidante.

SAWONIUK, Isadora Caroline. **Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activity of Di-ramnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa***. 2022. Dissertation (master's degree in biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, 2022.

### **ABSTRACT**

Skin is the largest organ in the human body and its main function is to act as a chemical and physical barrier against external damage. UVB radiation draws a lot of attention as it is constantly reaching the Earth's surface and causing various damages to the skin, such as aging and cancer development. Thus, skin supplementation with natural products seems to be an interesting alternative to mitigate the harmful effects of exposure to UVB rays. In this work, the production of rhamnolipids by submerged fermentation was carried out, followed by extraction to obtain a concentrated crude extract, and a purification process to obtain Di-rhamnolipids (Di-RL) of high purity (99.9%). Inflammation and oxidative stress were projected by UVB radiation with a dose of 4,13 J/cm<sup>3</sup> as well and treatment with Di-RL, *in vivo*, indicated a considerable reduction in cutaneous inflammation evidenced through: reduction of skin edema; decreased recruitment of neutrophils, reduced epidermal thickening; reduction of mast cell counts; and reduction of collagen fiber degradation and metalloproteinase activity/secretion – induced by UVB irradiation. While the protection of the skin against oxidative stress was confirmed through the levels of reduced glutathione (GSH), activity of the enzyme catalase, which remained at basal levels, and reducing of the production of lipid hydroperoxides and superoxide anions. Thus, the results obtained in the present work suggest that Di-RL have anti-inflammatory and antioxidant activity and, consequently, great potential for skin-protecting against UVB irradiation.

**Keywords:** Di-ramnolipid, UVB radiation, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1	Estruturas químicas das moléculas de mono e di-ramnolipídeos	23
Figura 2	Fluxograma dos tempos de tratamento com os protocolos experimentais para avaliação da eficácia do di-ramnolipídeos	29
Figura 3	Soma dos gráficos de deconvolução de cada um dos sinais de hidrogênio presentes no espectro dos Ramnolipídeos	38
Figura 4	Gráfico construído a partir da área calculada para cada sinal a partir da deconvolução dos sinais de hidrogênio presentes no espectro de Ramnolipídeos, com as regiões integradas e valores	38
Figura 5	Di-ramnolipídeos inibem o edema cutâneo (A) e atividade de MPO (B) induzidos por irradiação-UVB	40
Figura 6	Di-ramnolipídeos reduzem o aumento da espessura epidérmica induzido por irradiação-UVB	41
Figura 7	Di-ramnolipídeos inibem o aumento da atividade de MMP-9 e danos nas fibras de colágeno induzidos por irradiação UVB	43
Figura 8	Di-ramnolipídeos reduzem a contagem de mastócitos induzidos por irradiação UVB na pele	44
Figura 9	Di-ramnolipídeos inibem a depleção de antioxidantes e o estresse oxidativo induzidos por irradiação UVB	45
Figura 10	Di-ramnolipídeos reduzem a produção de ânion superóxido e peroxidação lipídica induzidos por irradiação UVB	46

## LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Gel de separação e de concentração do ensaio de eletroforese (MMP-9)	31
Tabela 2	Processo de produção e obtenção de extrato orgânico brutos dos ramnolipídeos	37
Tabela 3	Composição química e abundância relativa da mistura de extrato bruto e ramnolipídeos purificados produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 em cultivos submersos na condição controle	38
Tabela 4	Regiões cuja integração foi agregada como relativas aos ramnolipídeos, rA	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Acetato de etila
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
DI-RL	Di- ramnolipídeos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão de média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fermentação submersa
Gp91phox	Glutationa peroxidase 91fox
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GSH	Glutationa reduzida
GPX	Glutatione peroxidase
HAc	Ácido acético
H&E	Hematoxilina e eosina
HCL	Ácido clorídrico
HO•	Radical hidroxil
<sup>1</sup> H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio

H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
I.p	Intraperitoneal
KCL	Cloreto de potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
KOH	Hidróxido de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
LB	Meio Luria-Bertani
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólico
NRF2	Fator nuclear [derivado eritróide-2] tipo 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
OH	Radical hidroxil
PBS	Tampão fosfato salino
RL	Ramnolipídeos
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TRIS	Hidroximetil aminometano
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
UVB	Radiação ultravioleta B
UV	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivo Específico .....</b>	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 PELE .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO UV .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5 RAMNOLIPÍDEOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Microrganismo e inóculo .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Produção de Ramnolipídeos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Extração de Ramnolipídeos para obtenção de extrato orgânico bruto .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4 Purificação dos Di- ramnolipídeos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.5 Quantificação por <sup>1</sup>H-rmn: análise de pureza relativa dos ramnolipídeos.....</b>	<b>25</b>
<b>4.6 Determinação da abundância percentual de cada congênere de ramnolipídeo por espectrometria de massas.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7 Aplicação <i>in vivo</i> para avaliação anti-inflamatória e antioxidante do Di - RL.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7.1 Animais experimentais.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7.2 Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de inflamação.....</b>	<b>26</b>
<b>4.7.3 Protocolo experimental de avaliação da eficiência do Di – RL.....</b>	<b>26</b>
<b>4.7.4 Avaliação do edema cutâneo .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7.5 Avaliação da atividade da enzima MPO.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.6 Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9) .....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.7 Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP).....</b>	<b>30</b>
<b>4.7.8 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical ABTS</b>	

.....	30
<b>4.7.9 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7.10 Avaliação da atividade da CAT .....</b>	<b>31</b>
<b>4.7.11 Avaliação da produção de O<sub>2</sub><sup>•</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>4.7.12 Avaliação da produção de LOOH .....</b>	<b>32</b>
<b>4.7.13 Avaliação histopatológica por microscopia óptica.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.14 Análise estatística dos resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Produção de ramnolipídeos .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Cálculo de pureza.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Avaliação anti-inflamatória e antioxidante do Di – RL.....</b>	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e funciona como uma barreira de proteção física e química contra vários agentes químicos, biológicos e físicos (CAMPONAGARA *et al.*, 2020; PRADE *et al.*, 2020). A radiação ultravioleta (UV) é um fator físico e a constante exposição da pele a esta irradiação coloca em perigo a integridade de estruturas oxidáveis, que são críticas para homeostase celular. Espécies reativas de oxigênio (EROS), formadas sob essas condições, levam a oxidação de biomoléculas, peroxidação lipídica e liberação de mediadores inflamatórios, desempenhando uma função importante em patologias cutâneas como câncer de pele e fotoenvelhecimento (CASAGRANDE *et al.*, 2006; TEWARI *et al.* 2013).

Uma alternativa, para prevenção aos danos da radiação UV, seria o tratamento ou a suplementação da pele, com produtos naturais. Dentre esses, os ramnolipídeos (RL) se apresentam como uma alternativa podendo ser obtido por meio de processo fermentativo pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Esse microrganismo é um patógeno oportunista, gram-negativo, metabolicamente versátil, capaz de sobreviver em vários tipos de ambiente, principalmente, os hospitalares (LAMONT *et al.*, 2002; STOVER *et al.*, 2000; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013). Os RL são formados por uma (mono- ramnolipídeo) ou duas moléculas de ramnose (di-ramnolipídeos) ligadas entre si e uma ou duas moléculas de ácido 3-hidroxi alconóico (3HAs) que lhes confere excelente propriedade tensoativa, detergente e emulsificante. Contêm ácidos graxos com cadeias que variam entre 8 a 14 carbonos. Cerca de 60 homólogos de ramnolipídeos (RL) já foram descritos, os quais são obtidos de acordo com as cepas utilizadas e condições de cultivos específicas (LOVAGLIO *et al.*, 2015; WADEKAR *et al.*, 2012).

Apesar do grande número de estudos de ramnolipídeos, ainda não foram avaliadas, propriamente, suas funções biológicas e sua aplicação como anti- inflamatório e antioxidante. Porém, sabe-se que os ramnolipídeos são capazes de proteger a célula microbiana do sistema de defesa do hospedeiro (inibir a fagocitose por macrófagos) e, ainda, podem atuar como hemolisinas e moduladores do sistema imune de plantas e animais (ABDEL-MAWGOUD; LEPINE; DÉZIEL, 2010; ABDEL- MAWGOUD *et al.*, 2011; PILJAC, 2012; VATSA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico de Di-RL produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a fim de corroborar com as necessidades de suplementação da pele. Para isso, serão analisadas as atividades anti-inflamatórias e antioxidante do Di-RL como prevenção de danos cutâneos causados pela radiação UV, bem como as suas propriedades imunomoduladoras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os potenciais terapêuticos anti-inflamatório e antioxidante de Di-ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em danos cutâneos induzidos pela radiação UVB.

### 2.2 Objetivo Específico

Avaliar a eficácia terapêutica *in vivo* do Di-ramnolipídeos (L-ramnosil-L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxi-decanoato) de *P. aeruginosa*, nos danos cutâneos com enfoque em:

- Avaliação do edema de pele;
- Avaliação do infiltrado leucocitário (ensaio da mieloperoxidase – MPO);
- Avaliação da atividade/secreção de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9);
- Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio de FRAP e ABTS;
- Avaliação de níveis do antioxidante endógeno GSH e atividade da catalase;
- Avaliação da produção do ânion superóxido (NBT) e hidroperóxido lipídicos (LOOH);
- Avaliação histopatológica pelas colorações de hematoxilina-eosina (H&E), azul de toluidina e tricrômio de masson.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PELE

A pele corresponde ao maior órgão do corpo humano. A sua principal função é proteger os órgãos internos do ambiente atuando como barreira química e física. Além disso, garante proteção ao corpo contra danos externos relacionados aos estresses ambientais, penetração de patógenos, exposição a produtos químicos e à radiação ultravioleta (UV) e regula a perda de água do corpo (ANSARY *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2020; NIEHUES *et al.*, 2018; PÉREZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). A pele é

dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme, sendo a epiderme a camada mais externa e a hipoderme a mais interna (NATARA *et al.*, 2019; NATARAJAN *et al.*, 2014).

A epiderme é dividida em 4 camadas, sendo: extrato córneo que é a camada mais externa, seguido pela camada granulosa, camada espinhosa e a camada basal. Cada camada é identificada pela morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos conforme a expressão de citoqueratinas e outras proteínas. É um tecido estratificado, de rápida renovação no qual os queratinócitos são perdidos constantemente da superfície e substituídos pela proliferação de células da camada mais interna (CAPALLERE *et al.*, 2018; D'KAUR *et al.*, 2013; KAUR; LI., 2000). Dentre as células que compõe a epiderme 95% são os queratinócitos. Essas células são caracterizadas pela produção de queratina, uma proteína que torna a pele à prova da água, enquanto os outros 5% restantes são compostos por: melanócitos, células responsáveis por produzir melanina, o pigmento que proporciona a pigmentação da pele e a proteção contra a radiação UV, células de Merkel, com função de captar estímulos sensoriais e as células de Langerhans responsáveis por resposta imunológica (BRAND *et al.*, 2020; PÉREZ-SANCHEZ *et al.*, 2018; SOUCI; DENESVRE 2021 ; YOUSEF *et al.*, 2020).

A derme compreende a maior parte da pele e está localizada abaixo da epiderme, sendo formada de tecido conjuntivo fibroso, amorfo e filamentoso. Esse tecido é composto, em grande parte, por uma matriz extracelular densa e rica em colágeno (QUAN; FISHER, 2015; PÉREZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). As células mais abundantes na derme são os fibroblastos e eles contribuem, diferencialmente, para homeostase da pele, depositando colágeno, fibras elásticas e reticulares que dão

elasticidade a pele, além de contribuir com a cicatrização e a formação de folículos capilares. Também podem ser encontradas na derme, células imunes como macrófagos e mastócitos (LAI-CHEONG; GRATH, 2017; SOUCI; DENESVRE 2021); vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e, glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (KOLARSICK *et al.*, 2011; PÉREZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). Essa camada da pele fornece proteção contra lesões mecânicas, retém água e contribui para regulação térmica (HONARI; MAIBACH, 2014).

A hipoderme, camada mais profunda da pele, é constituída, principalmente, de tecido adiposo, que funciona como fonte de reserva de energia, também, é composta por tecido conectivo, que mantém a adesão da derme aos ossos e músculos (HONARI; MAIBACH, 2014; SHIMIZU, 2017).

### **3.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

A radiação solar é essencial para o desenvolvimento e manutenção da vida na terra por ter capacidade de fornecer energia. Os benefícios da exposição à luz solar estão relacionados à estimulação da formação de vitamina D3 (colecalfiferol), que atua no desenvolvimento e manutenção da integridade óssea, no funcionamento do sistema imunológico, aumento da expressão e produção de beta-endorfina (HOLICK, 2016; MAKIDA *et al.*, 2020; NATARAJAN *et al.*, 2014)

A Terra recebe fótons de 3 tipos: luz infravermelha, luz visível e radiação ultravioleta (UV) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Os raios UV são divididos em três grupos de acordo com as faixas de comprimento de onda: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320- 400 nm). A camada de ozônio absorve a radiação UVC. Consequentemente, a luz solar que atinge a superfície terrestre tem mais de 90% de radiação UVA e de 5 a 10% de UVB. Mas, devido aos danos ambientais, uma maior quantidade de UVB vem chegando ao solo (D' ORAZIO *et al.*, 2013; SÁNCHEZ- MARZO *et al.*, 2019).

A radiação UV consegue penetrar na pele de maneira dependente do comprimento de onda. Os raios UVA, por apresentar um comprimento de onda maior, penetram profundamente a derme, enquanto UVB tem um menor comprimento de onda e uma menor capacidade de penetrar na pele atuando, principalmente, na

camada celular basal da epiderme (DE GRUIJIL, 2002; PASSERON *et al.*, 2020; PILLAI *et al.*, 2005; SVOBODOVA, 2006).

Apesar da luz do sol apresentar benefícios à saúde humana, a exposição em excesso pode causar diversas mudanças patológicas na pele como: queimaduras solares, envelhecimento, imunossupressão, certos tipos de carcinogênese cutânea e intensificação de dermatoses provenientes de reação inflamatória intensa e aumento de radicais livres (BERNARD *et al.*, 2019; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018; YEAGER; LIM, 2019).

### 3.3 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são pequenas moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, que são instáveis e reativos (JONES DEAN, 2008). Espécies reativas de oxigênio são chamadas de (EROS) e podem ser formadas como consequência da exposição à radiação UV, como produtos do metabolismo aeróbico e por resposta de células imunes, principalmente, os neutrófilos recrutados, que produzem ânion superóxido e outras EROS no local (D'ORAZIO *et al.*, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2018).

Como os radicais livres são formados constantemente, o nosso corpo apresenta um sistema de antioxidantes capaz de produzir, neutralizar e reparar as EROS. Se houver um desequilíbrio entre a produção e a capacidade de controlá-los, instala-se o estresse oxidativo, que leva a uma falha do funcionamento fisiológico adequado do nosso corpo (AHMAD; AHSAN, 2020; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

A radiação UV absorvida pelas células epidérmicas leva a formação excessiva de EROS como o ânion superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) (ANSARY *et al.*, 2021). Os níveis elevados dessas moléculas podem causar diversos danos, como: a peroxidação lipídica, por ter a capacidade de atacar e quebrar a membrana lipídica, bem como provocar fluidez, permeabilidade e danificar o DNA pela quebra da fita; oxidação da desoxirribose; remoção dos nucleotídeos e modificação oxidativa de bases (CADETE *et al.*, 2017; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

No entanto a pele apresenta mecanismos de defesa para manter um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes. Esses mecanismos podem ser divididos em sistema enzimáticos, que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT)

e glutathione peroxidase (GPX) e os não enzimáticos como a glutathione (GSH), alfa tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno entre outros, que atuam bloqueando ou inativando a formação de radicais livres (POLLETA *et al.*, 2016).

A glutathione (GSH) é uma das mais importantes moléculas antioxidantes celulares. Ela é responsável por neutralizar os radicais livres. No processo em si, a GSH se torna oxidada, pois doa elétrons para moléculas reativas, mas pode ser reduzida novamente ao seu estado basal usando NADPH como doador de elétrons e ser reciclada, tornando um ciclo (D'ORAZIO *et al.*, 2013). Outra forma de neutralizar oxidantes é através da SOD, ela é uma metaloenzima capaz de dismutar ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$  molecular (SINGH *et al.*, 2017). A CAT e a GPX são responsáveis pela reação que catalisa a quebra de  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  molecular (GRORAS *et al.*, 2017).

O sistema de defesa antioxidante é regulado por diferentes moléculas sinalizadoras. O fator nuclear eritróide, relacionado ao fator 2 (Nrf2) apresenta um papel primordial na defesa ao estresse oxidativo, através da indução para a expressão dos genes, que são responsáveis por codificar as proteínas antioxidantes e desintoxicantes. Esse sistema também é muito importante por estar relacionado à citoproteção contra agentes cancerígenos, efeito neuroprotetor e estímulos a resposta anti-inflamatória (BEYER *et al.*, 2007; KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005).

### **3.4 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO UV**

A inflamação e estresse oxidativo estão intimamente relacionados. A exposição aos raios UV tem muitos efeitos na fisiologia da pele, algumas consequências agudas e outras crônicas. Um dos efeitos agudos mais evidentes após a exposição da pele aos raios UVB, é a indução da inflamação, causando queimaduras solares, formação de manchas vermelhas na pele conhecido como eritema, espessamento da epiderme e da derme e a infiltração perivascular (CUELHO *et al.*, 2018; D'ORAZIO *et al.*, 2013; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

A radiação UVB atua, principalmente, na camada celular basal da epiderme, quando ocorre um processo inflamatório seja ele infeccioso ou não as células migram rapidamente para a área afetada e promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e outros mediadores

inflamatórios (FERNANDO *et al.*, 2018; PRADE *et al.*, 2020). Com a liberação de IL-1 $\beta$ , os leucócitos podem se aderir a pele levando à hiperplasia da epiderme e formar EROS (PILLAI *et al.*, 2005).

A partir do momento que os neutrófilos são ativados para produzir uma resposta inflamatória, eles liberam a mieloperoxidase (MPO), que é uma enzima armazenada nos grânulos azurofílicos, responsáveis por catalisar a formação de intermediários reativos de oxigênio, incluindo o HOCl a partir do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PULLI *et al.*, 2013). Como nesse momento ocorre uma ausência de processo infeccioso causado por patógenos e sim uma inflamação pela UVB as células contribuem para intensificação de danos teciduais e celulares (CLYDESDALE *et al.*, 2011; FRANCK *et al.*, 2009).

Diversas células como os neutrófilos, macrófagos, mastócitos são capazes de produzir a enzima metaloproteinase de matriz (MMPs) e sua expressão aumenta com a radiação UV (KHALID, A.; JAVAID, M.S., 2016). As MMPs pertencem a família de endopeptidases dependente de zinco, são responsáveis por regular as vias de sinalização que controlam a inflamação, crescimento celular e a angiogênese. São responsáveis principalmente pela degradação de proteína da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanos levando ao fotoenvelhecimento (KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z., 2010; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

### 3.5 RAMNOLIPÍDEOS

Ramnolipídeos (RL) são produzidos, principalmente, por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Eles são biosurfactante pertencentes à classe dos glicolipídeos (ROCHA *et al.*, 2020). Essas biomoléculas representam uma das mais importantes classes de biosurfactantes microbianos, por possuir uma excelente propriedade tensoativa e com capacidade de ser produzido em altas concentrações (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2009, 2011). Em 1949, os pesquisadores Jarvis e Johnson foram os primeiros a mostrar, após o esgotamento de nitrogênio, que os RL eram secretados para o meio, durante a fase estacionária (NOH; SALLEH; YAHYA, 2014). O RL tem uma estrutura química composta, basicamente, por uma região glicona e uma região aglicona ligada entre si, por meio de uma ligação glicosídica. A região glicona contém um açúcar ramnose (mono-RL) ou dois (Di-RL) unidos por uma ligação

$\alpha$ - 1,2- glicosídica. A região aglicona contém um ou dois ácidos graxos  $\beta$ - hidroxilados ligados entre si, por uma ligação do tipo éster, formada entre o grupo  $\beta$ -hidroxilado da cadeia distal e o grupo carboxílico da cadeia proximal (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; LOVGLIO *et al.*, 2015). A maioria das cadeias de ácidos graxos são saturadas, mas podem ser encontradas algumas cadeias mono ou poli-insaturadas (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

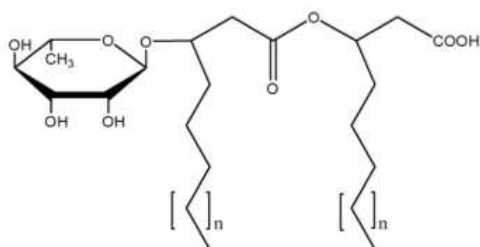
O RL é produzido de uma maneira heterogênea pela *P. aeruginosa*, com uma ampla gama de congêneres possíveis. Normalmente, a cadeia de ácido graxo, dessa biomolécula, varia de 8 a 14 carbonos (WITTGENS *et al.*, 2017). Cerca de 60 homólogos de RL já foram descritos até o momento. Esses são obtidos de acordo com as cepas utilizadas e, conforme as condições de cultivo específicas. O ácido hidrodecanoico é constituído de 10 carbonos (C10) o mais comumente encontrado na fração lipídica da molécula de ramnolipídeo, podendo ter como possíveis substituintes os ácidos hidrooctanoico (C8), hidroxidodecanoico (C12) e hidroxidodecenóico (C12:1) (WADEKAR *et al.*, 2012).

Na literatura, podem ser descritos quatro principais espécies de homólogos presentes em uma mistura heterogênea de ramnolipídeos, como ilustra a Figura 1: mono-ramno-di-lipídeo (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), mono-ramno-mono-lipídeo (RhaC<sub>10</sub>), di-ramno- di-lipídeo (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e di-ramno-mono-lipídeo (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>) (WITTGENS *et al.*, 2017). Dentre esses, aqueles que predominam na produção por *P. aeruginosa* são: RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> (JADHAV *et al.*, 2018).

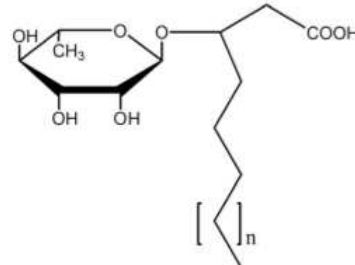
**Figura 1.** Estrutura química dos Ramnolipídeos. (A) Mono-ramnolipídeos e (B) Di-ramnolipídeos, subdivididos pelo número de cadeia de ácidos graxos.

### Mono-ramnolipídeos

Mono-ramno-di-lipídeo

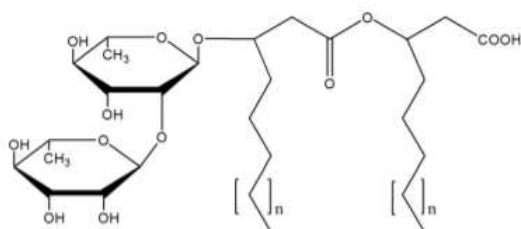


Mono-ramno-mono-lipídeo

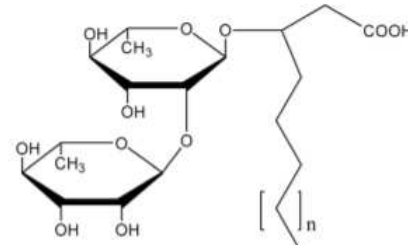


### Di-ramnolipídeos

Di-ramno-di-lipídeo



Di-ramno-mono-lipídeo



**Fonte:** Adptado de WITTGENS *et al.*, 2017.

Diferentes estudos demonstraram maior atividade biológica para a molécula Di

- ramnolipídeos (Di- RL). Foi evidenciado que o Di-RL Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> tem uma maior atividade contra crescimento de fungos *Aspergillus niger* NUM92.13 e *Aspergillus carnonarius* NUM 05.18 quando comparado com uma mistura de RL e mono – RL purificado (RODRIGUES *et al.*, 2017). Também foi observado uma maior atividade do Di-RL purificado contra diversos patógenos de planta enquanto mono-RL apresentou atividade inibitória irrelevante (SHA *et al.*, 2012). Thanomsub *et al.*, (2006) relatou que houve diferença em atividades citotóxicas entre extrato bruto de RL, Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub>. O extrato bruto não apresentou atividade citotóxica, mas os Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub> apresentaram uma inibição significativa contra o crescimento de células de câncer de mama com concentração inibitória mínima de 6,25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.

Também tem sido explorado o uso do Di-RL purificado, como agente cicatrizante em feridas cutâneas, em avaliações histológicas. Em modelo experimental utilizando pele de camundongo foi possível demonstrar a influência do Di-RL no processo de cicatrização, acelerando o fechamento de ferida (STIPCEVIC *et al.*, 2006). O uso de pomada com 0,1% de di-ramnolipídeos na sua formulação aumentou a eficiência no tratamento de úlceras em pacientes em decúbito (PILJAC *et al.*, 2008). Tawfeed e Yesser (2018) também relataram resultados eficientes como o processo acelerado da recuperação da pele infeccionada de ratos com o uso tópico de RL.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo e inóculo

Neste trabalho foi utilizada *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, originalmente isolada na Austrália, a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa referência de *P. aeruginosa*, mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, apresenta o genoma sequenciado, publicado (STOVER et al., 2000) e que vem recebendo constantes atualizações nas anotações (<http://www.pseudomonas.com>). Este microrganismo está depositado no banco coleção de culturas americano ATCC (do inglês: American Type Culture Collection) sob o número ATCC 15692. A cepa foi mantida em meio Luria-Bertani (LB) (composição por litro: 10 g triptona, 5 g extrato de levedura e 10 g de NaCl) adicionado de glicerol (20%, v/v) e estocada a -80°C. O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculado com 3-5 colônias de PAO1 proveniente de placas de meio LA (LB adicionados de 1,5 % (m/v) de ágar) e incubado por 12-16 h a 37 °C/200 rpm. O inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculado com o pré-inóculo em uma proporção de 2% (v/v) e incubado a 37 °C por 5-6 h sob agitação de 200 rpm em agitador orbital.

### 4.2 Produção de Ramnolipídeos

Os ensaios de produção foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 7,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adicionados de 3 % v/v de glicerol. Os meios foram esterilizados por 20 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % de volume de pré-inóculo em volume de meio de cultivo. Os cultivos foram incubados por 9 dias a 37 °C/200 rpm. Os cultivos foram interrompidos e centrifugados a 2.500 g por 10 minutos. Os sobrenadantes livres de células foram submetidos à extração com  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (3:1) e a posterior quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. 1956), utilizando uma curva padrão de ramnose (CAMILIOS NETO et al, 2008).

### 4.3 Extração de Ramnolipídeos para obtenção de extrato orgânico bruto

Para a obtenção do extrato orgânico bruto concentrado de ramnolipídeos, os sobrenadantes de cultivo foram acidificados com HCl 1M até atingir pH 2. Em seguida, o conteúdo foi incubado em câmara fria (4 - 8 °C) durante 5 dias e então submetido novamente à centrifugação (2500 g / 4 °C / 20 minutos). Ao final, descartou-se o sobrenadante e o ramnolipídeo retido no tubo foi submetido à extração com clorofórmio/metanol (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH) em proporção 9:1 e o solvente eliminado por evaporador rotativo (Mello, 2019).

### 4.4 Purificação dos Di- ramnolipídeos

A purificação dos di-RL foi realizada utilizando protocolo desenvolvido por Mello (2019), cartucho de fase normal, utilizando-se como coluna uma ponteira de 5 mL empacotada com 200 - 300 mg de sílica Gel 60 PF254 (Merck®). O cartucho foi previamente ativado com metanol (CH<sub>3</sub>OH). A amostra foi aplicada diretamente sobre a sílica (fase estacionária) e coberta por algodão. O processo de separação dos congêneres ocorreu pela eluição dos respectivos solventes uma única vez para cada etapa. Foi utilizado como solventes de lavagem: CHCl<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (etapa 1); CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 2% ou CHCl<sub>3</sub>:C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> 5% (etapa 2); finalizando com solvente extrator CH<sub>3</sub>OH:HAc 2% (etapa 3). As etapas 1 e 2 foram responsáveis pela retirada de compostos apolares e demais congêneres, sendo di-ramnolipídeos recuperados após passagem do solvente extrator. As frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, 20x20cm), sendo o eluente composto por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético. A presença dos ramnolipídeos foi identificada com a utilização de revelador orcinol específico para carboidrato aquecido a 100 °C por 5 minutos. A confirmação das identidades e a avaliação da pureza foram feitas por Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado à frequência de 400,6 MHz para <sup>1</sup>H, e a 100 MHz para <sup>13</sup>C usando probe direto de 5 mm, BBO, a 25°C. Os deslocamentos químicos (δ) para hidrogênio foram expressos em ppm e calibrados de acordo com o sinal do TMS presente no CDCl<sub>3</sub> em 0 ppm. Para o carbono foi usado igualmente a escala com unidades em ppm e calibrado com TMS interno em 0 ppm.

#### 4.5 Quantificação por <sup>1</sup>H-rmn: análise de pureza relativa dos ramnolipídeos

A determinação da pureza foi realizada pelo método modificado da quantificação relativa (BHARTI & ROY, 2012). A pureza foi determinada a partir de gráficos de deconvolução dos espectros de <sup>1</sup>H RMN, utilizando programa de pulso *zgpr* com 8 varreduras (*ns*), com tamanho de *fid* de 65536 (*td*, *size of fid*), tempo de relaxamento (*d1*, *relaxation delay*) de 1 s, com ajuste automático polinomial da linha de base. O grau de pureza foi obtido a partir da razão da massa de hidrogênios totais do ANALITO contra a massa total de hidrogênios da amostra seguindo a fórmula abaixo:

$$p\% = \frac{rA}{(rA + rC)} \cdot 100$$

#### 4.6 Determinação da abundância percentual de cada congênera de ramnolipídeo por espectrometria de massas

As amostras, extrato orgânico bruto ramnolipídeos ou purificadas (solubilizadas em metanol), foram analisadas por injeção direta, em Espectrômetro de Massas QTOF da marca Bruker modelo Compact, em modo negativo. As condições de análise foram: energia do capilar de 2,45 kV, e energia do cone de 43 V. Para aquisição dos espectros foi utilizada uma faixa de *m/z* de 200 a 800. As abundâncias relativas (%) da mistura de ramnolipídeos foram calculadas pela integração da intensidade relativa de seus correspondentes íons pseudomoleculares.

#### 4.7 Aplicação *in vivo* para avaliação anti-inflamatória e antioxidante do Di – RL

##### 4.7.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo, machos ou fêmeas, adultos, pesando em média 30 g, linhagem HRS/J. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL. No biotério é utilizado ciclo de claro/escuro (12/12 h) com livre acesso a água e ração e controle de temperatura. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEL (10739.2019.32).

#### 4.7.2 Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de inflamação

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  $\lambda$  de 270 a 400nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A medida da irradiância foi realizada utilizando-se um radiômetro (IL 1700) com detectores para radiação UV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CARINI *et al.*, 2000; CASAGRANDE *et al.*, 2006). A lâmpada é acoplada no interior de uma caixa retangular de madeira desenvolvida especialmente para a indução da lesão cutânea, com capacidade máxima de 6 caixas de polipropileno com dimensão de 30x19x13 cm para o acondicionamento de camundongos. Os camundongos foram distribuídos nas caixas e colocados a 20 cm de distância da lâmpada UVB e expostos à radiação à temperatura ambiente. A dose de irradiação utilizada para indução da inflamação/estresse oxidativo foi de 4,14 J/cm<sup>2</sup> durante o período de exposição de cinco horas e trinta minutos (CAMPANINI *et al.* 2013; IVAN *et al.*, 2014).

#### 4.7.3 Protocolo experimental de avaliação da eficiência do Di – RL

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em cinco grupos experimentais contendo 6 animais cada:

- Grupo não irradiado (CN);
- Grupo irradiado e tratado com solução salina (CI);
- Grupo irradiado e tratado com a dose de 0,3 mg / camundongo de Di – RL (D1);
- Grupo irradiado e tratado com a dose de 3 mg / camundongo de Di – RL (D2);
- Grupo irradiado e tratado com a dose de 30 mg / camundongo de Di – RL (D3).
- Os camundongos foram tratados com 300  $\mu$ l das diferentes concentrações de Di – RL (0,3, 3 e 30 mg/ camundongo) diluídas em salina estéril ou apenas o veículo (salina estéril) via intraperitoneal (i.p) 1 h antes do início da irradiação e 1 h após o término da irradiação. As doses foram selecionadas baseando-se nos resultados encontrados na sequência de experimentos.

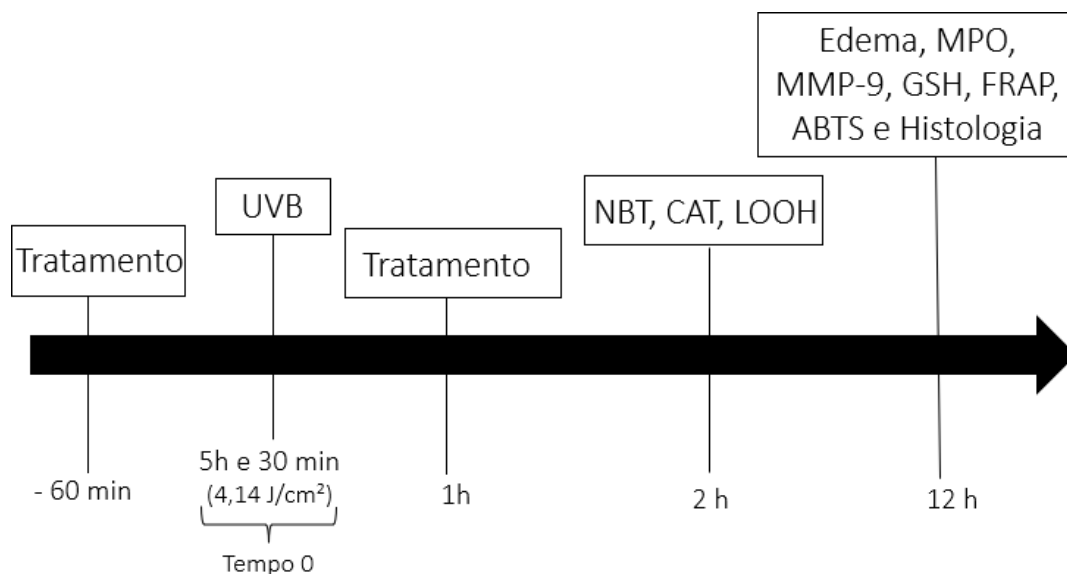
Os animais foram, terminalmente, eutanasiados com 5 % de isoflurano e as amostras de pele, da região dorsal, foram coletadas após 12 horas da radiação para

os testes de edema, MPO e MMP-9, histologia, avaliação do FRAP, ABTS e níveis de GSH. Em outra série de experimentos, as amostras foram coletadas após 2 horas do fim da exposição à UVB para os testes de CAT e produção do ânion superóxido (NBT) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Para as coletas de amostras de 2 horas, os animais foram anestesiados com 5 % de isoflurano e decapitados. Cada parâmetro foi analisado em um tempo específico de coleta, após determinação prévia em outros trabalhos do grupo (CAMPANINI *et al.*, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2015).

As amostras de pele do dorso dos animais foram coletadas e separadas para os diferentes testes e armazenadas a - 80 °C, exceto para avaliação de edema cutâneo, que foi realizado logo após a coleta. Para avaliação histopatológica, as peles foram coletadas e, em seguida, adicionadas em formol a 10 %, até serem processadas.

A melhor dose de Di-RL foi determinada através dos resultados obtidos nos testes de edema, atividade da MPO, FRAP, ABTS e GSH e selecionada para os demais parâmetros avaliados.

**Figura 2.** Esquema geral do tempo de tratamento e coleta das peles dos animais.



#### 4.7.4 Avaliação do edema cutâneo

Com o auxílio de um molde, uma área da parte dorsal (5 mm de diâmetro), da pele de cada animal foi coletada e, posteriormente, pesada. O edema foi mensurado pela variação do peso de pele. Posteriormente, os diferentes grupos foram comparados e os resultados foram expressos em mg de pele (IVAN *et al.*, 2014).

#### 4.7.5 Avaliação da atividade da enzima MPO

As amostras de pele foram coletas em 400 µL de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0) com 0,5% de brometo de hexadecil trietil amônio e trituradas com o triturador Tissue-Tearor® (Biospec). O homogenato foi centrifugado a 16,100 g por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante retirado para o ensaio (CASAGRANDE *et al.*, 2006). Para a reação colorimétrica, foram adicionados 30 µL do sobrenadante da amostra, juntamente, com 200 µL de uma solução contendo 10 % de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0, 0,0167 % de *o*-dianisidina e 0,05 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água deionizada. A atividade da MPO das amostras foi realizada após 5 minutos em leitor de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer) em 450 nm e comparada a uma curva padrão de neutrófilos com concentração conhecida. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos/mg de pele (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

#### 4.7.6 Determinação da atividade/secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9)

A MMP-9 é uma enzima proteolítica, que degrada componentes importantes da matriz extracelular como o colágeno e sua expressão é aumentada através da exposição à UV (CUELHO *et al.*, 2018; SAITO *et al.*, 2016). Para a determinação da atividade da MMP-9, foi utilizado o ensaio de zimografia em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), o qual permite a detecção de enzimas que degradam a gelatina presente no gel (FONSECA *et al.*, 2011).

Um pool das amostras de pele, de cada grupo, foi homogeneizado com auxílio do Tissue-Tearor® (Biospec) na proporção 1:4 em tampão fosfato Tris/HCl 50 mM pH 7,4 com cloreto de cálcio CaCl<sub>2</sub> e 1 % de inibidores de proteinases (fenantrolina, fluoreto de fenilmetilsulfonila e N-etilmaleimida). Os homogenatos foram duplamente centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes utilizados para o ensaio. Os 30 µL do sobrenadante das amostras foram diluídos em 6 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. Posteriormente, estas amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C, durante 8 minutos, antes de serem aplicadas no gel de eletroforese. O gel contém 1 mm de espessura e é composto por duas partes: um gel de separação e de concentração, preparados conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Componentes do gel de separação e do gel de concentração

Substância	Quantidade (µL)	
	Gel de separação	Gel de concentração
Água miliQ	5870	4060
Tampão Tris/HCl 1 M + 0,4% SDS pH 8,8	3750	-
Tampão Tris/HCl 0,5 M + 0,4% SDS pH 6,8	-	1670
Acrilamida: bis-acrilamida (30:0,8)	5000	860
Gelatina 10%	375	-
Persulfato de amônio 10%	50	33
Temed 20%	10	6,6

Após o preparo da solução, contendo os dois géis, os mesmos foram aplicados um por vez, no aparato do sistema de eletroforese Mini Vertical (Bio-RAD®). Posteriormente, o gel foi acoplado no suporte localizado no interior da cuba de eletroforese, preenchida 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 de 10 mA, por 15 minutos. Em seguida, foram aplicados 15 µL de cada amostra. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi de 10 mA para o gel de concentração e 13 mA para o gel de separação, sendo que a última corrente foi mantida constante, por 15 minutos, após a saída do corante do gel de separação.

Depois da corrida com as amostras, o gel de poliacrilamida foi retirado da cuba e submetido à lavagem, sob agitação constante, com a solução de Triton X-100 2%. Posteriormente, o gel foi incubado por 16 horas a 37 °C em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,4 contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM e 0,02 de azida sódica. Na etapa seguinte, o gel foi corado com uma solução contendo 0,25 % de azul brilhante, 10 % de ácido acético e

50 % de metanol em água deionizada. Para visualização das bandas o gel foi descorado com ácido acético 20 % (FONSECA *et al.*, 2011). Zonas de atividade enzimática foram detectadas como regiões de coloração negativa contra um fundo escuro. A atividade proteolítica foi analisada pelo programa Image J® (NIH, Bethesda, MD, USA) semi-quantitativamente por meio da comparação das diferenças de densidades de cor entre as bandas de cada grupo.

#### 4.7.7 Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)

A reação de FRAP mede a redução férrica de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) para um produto colorido. A amostra de pele foi homogeneizada com 400  $\mu$ L de KCl (1,15 %) com o auxílio do Tissue-Tearor (Biospec) e centrifugada a 1.000 g por 10 min a 4 °C. O reagente de FRAP foi preparado com 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ, em ácido clorídrico 40 mM, com 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado 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 reação foram adicionados em microplaca de 96 poços 30  $\mu$ L do sobrenadante e 150  $\mu$ L de reagente FRAP, enquanto o branco foi preparado com 30  $\mu$ L de KCl a 1,15% e 150  $\mu$ L do reagente de FRAP. Em seguida, foi feita a leitura a 595nm (EnSpire, Perkin Elmer). Para comparação do poder redutor do Di – RL, foi realizada uma curva padrão, com diferentes concentrações de trolox (0,5 a 20  $\mu$ mol/L). Os resultados foram expressos como mmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005).

#### 4.7.8 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical ABTS

O ensaio baseia-se na capacidade do antioxidante sequestrar o cátion ABTS<sup>+</sup> causando uma redução na absorvância. A capacidade antioxidante é medida pela capacidade do composto em teste diminuir a coloração gradativamente ao reagir diretamente com o radical ABTS<sup>+</sup> (PRIOR *et al.*, 2005).

O método foi realizado de acordo com Sánchez-Gonzalez *et al.* (2005), com algumas modificações. Amostras de pele foram homogeneizadas em 400  $\mu$ L de KCl a 1,15 % com Tissue-Tearor® (Biospec) e centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4 °C, posteriormente o sobrenadante foi utilizado para análise.

A solução ABTS foi preparada em meio aquoso, e o cátion ABTS<sup>+</sup> foi obtido após a reação de 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. 200  $\mu$ L dessa solução foram adicionados na placa com 7  $\mu$ L de sobrenadante das amostras. O branco era composto apenas do tampão. Após 6 minutos de reação, foi feita a leitura da absorvância a 730 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de trolox (0,01 - 20  $\mu$ mol/L) e os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox / mg de pele (Katalinic *et al.*, 2005).

#### 4.7.9 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH

A glutationa reduzida (GSH) é considerada como o principal marcador para o estresse oxidativo induzido pela radiação UVB, pois é produzida em maior quantidade pelas células epidérmicas (CASAGRANDE *et al.*, 2006).

O seu grupamento sulfidrila é responsável pela neutralização de substâncias oxidantes, doando elétrons para essas moléculas reativas (D'ORAZIO *et al.*, 2013). Neste ensaio, GSH doa elétrons para o ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), convertendo em um produto colorido (SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

As amostras de pele foram diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas utilizando o Tissue-Tearor® (Biospec) 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 removido para análise. Para a quantificação dos níveis de GSH, foram adicionados 50 µL do sobrenadante da segunda centrifugação, em microplaca, juntamente com 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9 mg/mL de DTNB em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 405 nm. A curva padrão foi preparada com 5 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (SRINIVASAN; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007).

#### 4.7.10 Avaliação da atividade da CAT

A enzima catalase (CAT) tem como função converter o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio. O princípio da técnica se baseia na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguida da diminuição de absorvância. A diferença de absorvância, por unidade de tempo, mede a atividade da enzima (AEBI, 1984).

As amostras de pele dos animais foram homogeneizadas em 500 µL de EDTA 0,02 M, com auxílio do Tissue-Tearor® (Biospec). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi centrifugado, novamente, a 2.700 g, por 10 minutos, a 4 °C e, o sobrenadante final, foi retirado para análise. Para a reação, foram adicionados 10 µL da amostra, 160 µL do tampão Tris- HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de água deionizada e 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM.

Foi incluído um branco para cada amostra preparada 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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).

#### **4.7.11 Avaliação da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>**

O ânion superóxido é um radical que é formado na primeira redução do oxigênio, na respiração aeróbica. Sua produção pode ser, acentuadamente, induzida pela radiação UVB (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HIRAMOTO *et al.*, 2012). Este

método foi baseado na redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT). As amostras de pele foram homogeneizadas com o Tissue-Tearor® (Biospec) em EDTA 0,02 M e centrifugadas a 2.000 g, por 20 segundos a 4°C. Primeiramente, 50 µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em microplaca e incubado por 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e adicionado o NBT (1 mg/mL) ao meio. Depois de incubado, por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e ao precipitado, adicionado 20 µL de metanol a 100 % para fixar, 120 µL de KOH 2 M e 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o composto formazan (NBT reduzido). A formação desse composto foi medida em espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) a 620 nm e os resultados foram expressos como densidade óptica (OD)/10 mg de pele (CAMPANINI *et al.*, 2013).

#### **4.7.12 Avaliação da produção de LOOH**

As amostras de pele foram coletadas e homogeneizadas em 800 µL de tampão fosfato (pH 7,4), com o homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor® (Biospec) e, posteriormente, 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 tert-butil hidroperóxido 3 mM. Este ensaio foi realizado em contador Glomax 20/20 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 (MARTINEZ *et al.*, 2015).

#### **4.7.13 Avaliação histopatológica por microscopia óptica**

Para a análise histopatológica da pele, as amostras foram coletadas 12 horas após UVB, fixadas em formol a 10 % até serem processadas. Posteriormente, foram desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações crescentes (70 %, 95 % e 100 %) e diafanizadas com xilol para inclusão de parafina. Foram preparadas secções de 5 µm de amostras de pele e coradas com hematoxilina-eosina (H&E), sendo examinadas utilizando microscopia óptica a ampliação de 40 para determinação da espessura epidérmica (DENG *et al.*, 2015).

Além disso, secções dos tecidos também foram coradas com o azul de toluidina para determinação de mastócitos e foram observados por microscopia óptica com o aumento de 40x. As análises foram feitas com o Infinity Analyze (Lumenera® Software). Por fim, secções dos tecidos foram coradas com tricrômico de masson para análise de possíveis alterações nas fibras de colágeno (ampliação de 10x) e a intensidade da coloração azul nas áreas dérmicas da pele foi analisada pelo software Image J® (NIH) (SONG *et al.*, 2016).

#### **4.7.14 Análise estatística dos resultados**

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA com um fator seguido do teste comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média ± erro padrão da média (EPM) de mensuração feitas com 6 animais em cada grupo por experimento realizados através do software GraphPad Prism®, versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram representativos de 2 experimentos separados e foram considerados significamente diferentes para  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Produção de ramnolipídeos**

As concentrações de ramnolipídeos obtidas neste trabalho foram da ordem de 3,0 g/L, alcançando um rendimento de extrato bruto de 44 % (Tabela 2). Embora os níveis de produção não foram muito expressivos o rendimento do extrato bruto e as

estimativas de pureza do extrato bruto foram bem satisfatórias (Tabela 2). Os processos de produção que alcançam concentrações mais expressivas de ramnolipídeos são obtidos utilizando indutores hidrofóbicos e fontes de carbonos mais complexas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020), no entanto estas fontes prejudicam os processos de separação e purificação dos ramnolipídeos (CAMILIOS NETO *et al.*, 2009).

O extrato bruto foi submetido a um processo de purificação em cartucho de sílica e a fração purificada, assim como o extrato bruto, foram submetidos à análise de espectrometria de massas (avaliação da composição da mistura de ramnolipídeos) (Tabela 3) e ressonância nuclear magnética (estimativa de pureza) (Tabela 4).

Tabela 2- Processo de produção e obtenção de extrato orgânico bruto dos ramnolipídeos

	<b>Rendimento</b>	<b>Pureza Estimada</b>	<b>Pureza Calculada *</b>
<b>Ramnolipídeos (g/L)</b>	3,5 ± 0,4 g/L	ND	ND
<b>Rendimento Extrato Bruto</b>	1,5 g/L	90±2 %	ND
<b>Rendimento RL purificado</b>	0,8 g/L	95±1 %	99,0 %

\* Ver item 5.2- cálculo de pureza

Tabela 3- Composição química e abundância relativa da mistura de extrato bruto e ramnolipídeos purificados produzidos *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em cultivos submersos na condição controle.

	[M-H] <sup>-</sup>	Extrato bruto*		Purificado*	
		Porcentagem congêneres	Porcentagem total	Porcentagem congêneres	Porcentagem total
<b>Mono-ramnolipídeos</b>	-	-	-	2,6	2,6
<b>R<sub>1</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	503.2974	4,2	4,2	-	
<b>Di-ramnolipídeos</b>	-	-	95,8		97,4

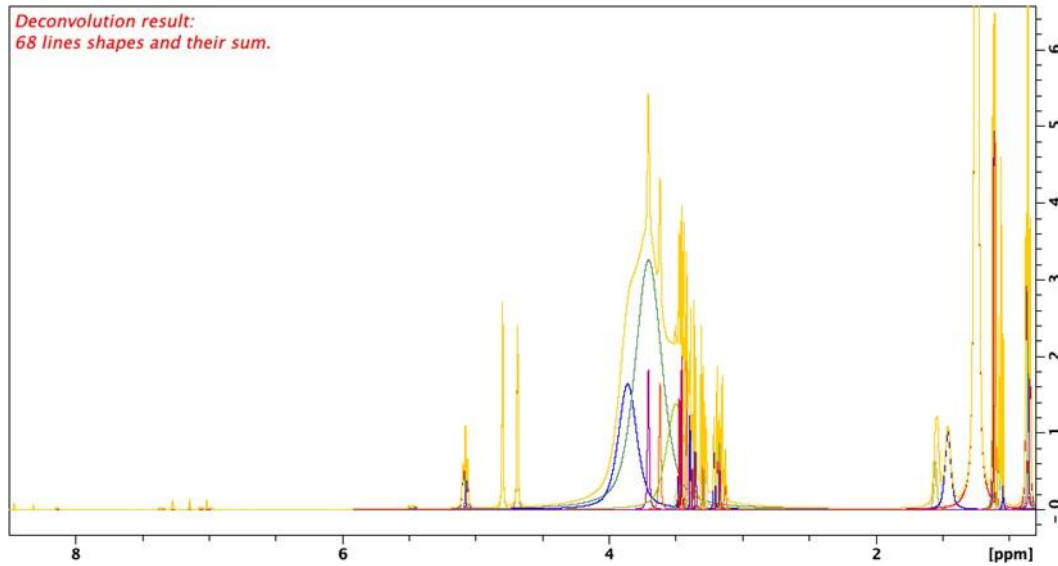
$R_2C_{10}C_8$ $R_2C_8C_{10}$	621.3225	9,3	-	7,2	-
$R_2C_{10}C_{10}$	649.3483	72,9	-	78,7	-
$R_2C_{10}C_{12}$ $R_2C_{12}C_{10}$	677.3778	6,6	-	6,9	-
$R_2C_{10}C_{12:1}$ $R_2C_{12:1}C_{10}$	675.3584	7,0	-	4,6	-

\* Ver Tabela 4

## 5.2 Cálculo da pureza

A determinação da pureza dos ramnolipídeos purificados foi realizada pelo método modificado de quantificação relativa (BHARTI & ROY, 2012). Primeiramente foi realizada a deconvolução de todos os sinais de hidrogênio com exceção do solvente DMSO-*d*6, e o gráfico reconstruído a partir dos dados quantitativos (Figura 3 e Figura 4). As regiões integradas foram 20 x maiores que a largura do sinal em sua altura média; para o cálculo de pureza relativa foram agregados como os valores do analito, **rA**, as áreas de sinais de hidrogênio descritas na (Tabela 4). Todos os demais sinais presentes no espectro foram atribuídos como impurezas, **rC**, observando a ausência de sinais perceptíveis destes contaminantes nas regiões quantificadas como analito no espectro 2D de  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC (*hsqcedetgmsp.3, td 512x256*, número de varreduras *ns 16*) (Dado não mostrado). A medida de hidrogênio relativa considerou que a massa total de hidrogênio é representativa da massa total da amostra, e que os hidrogênios de cada entidade molecular acabam por compor a fração do todo. Desta maneira, uma vez que todos os sinais de hidrogênio dos ramnolipídeos foram caracterizados, a soma de suas áreas é uma representação da sua massa presente na amostra. Ao aplicar os dados de integração relativos ao analito principal, leva a uma pureza percentual de 99,0 % de RL.

**Figura 3** – Soma dos gráficos de deconvolução de cada um dos sinais de hidrogênio presentes no espectro dos Ramnolipídeos



**Figura 4** - Gráfico construído a partir da área calculada para cada sinal a partir da deconvolução dos sinais de hidrogênio presentes no espectro de Ramnolipideo, com as regiões integradas e valores.

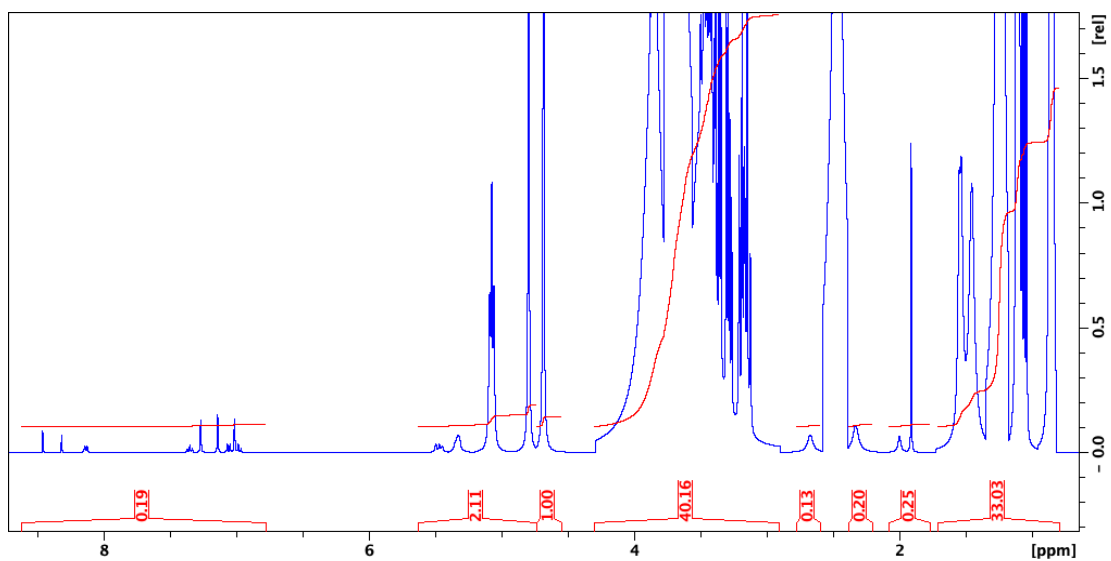


Tabela 4 - Regiões cuja integração foi agregada como relativas aos ramnolipídeos, rA.

Ramnolipídeos/ H, Tipo	Sinais (ppm)
CH <sub>3</sub> Alifático	0,87 (6,7 HZI)
CH <sub>3</sub> ramnose	1,1
CH <sub>2</sub> Alifático	1,26

CH <sub>2</sub> -C=O	1,57
CH <sub>2</sub> (C=O/ CH-O-)	2,38 – 2,50
C1'	4,89
C1''	4,91
CH <sub>1</sub> (H1-O-H1')	5,1
-CH=CH- (Insaturações)	5,33
-CH=CH-	5,47

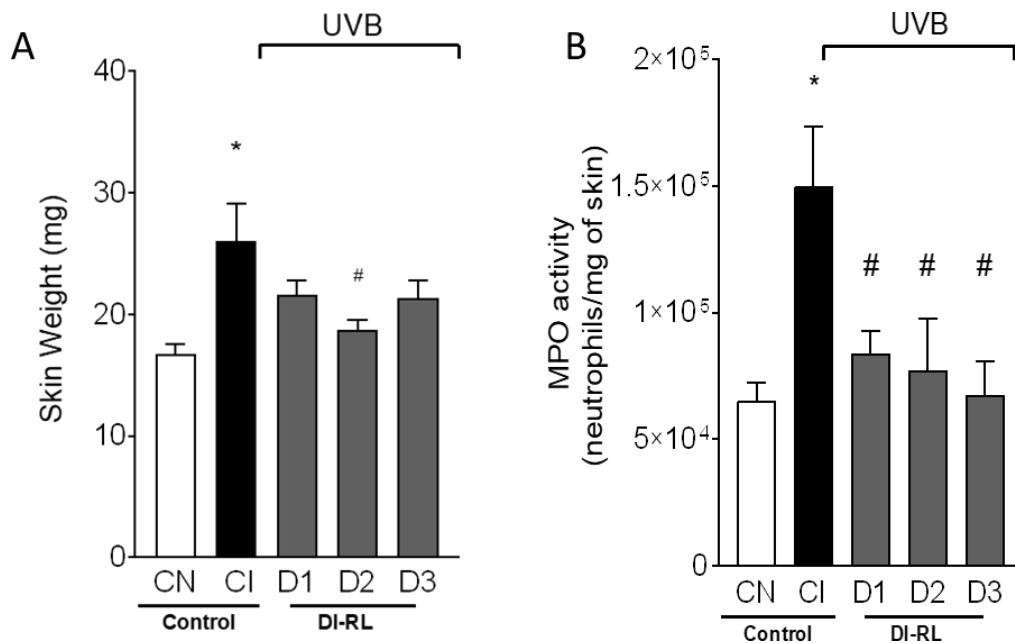
---

### 5.3 Avaliação anti-inflamatória e antioxidante do Di – RL

A pele está exposta a diversos fatores físicos, químicos e bióticos. Dentre todos os fatores de riscos ambientais, a radiação UV ganha atenção devido ao esgotamento gradual da camada de ozônio e, conseqüentemente, maiores níveis de radiação vem atingindo a superfície da Terra. A exposição à radiação UVB, em excesso, leva a danos na pele, principalmente na camada da epiderme que é o estrato mais externo e absorve a maior parte da radiação causando diversos eventos celulares para manutenção da homeostase cutânea como: estresse oxidativo, inflamação, dano ao DNA e várias doenças de pele (XIAO *et al.*, 2021).

A primeira série de experimentos, deste trabalho, foi realizada para investigar se o Di-RL teria eficiência anti-inflamatória. Para a avaliação deste parâmetro foi observado o efeito deste composto no desenvolvimento de edema cutâneo de animais tratados e submetidos à radiação UV (item 4.4.4). Conforme os resultados apresentados na Figura 5A, observa-se que a radiação UVB induziu um aumento significativo de edema nos animais irradiados (CI) quando comparado aos animais não irradiados (CN). Os animais irradiados e tratados com 3 mg de Di-RL (D2) apresentaram redução significativa do edema de pele, mostrando uma possível atividade anti-inflamatória deste composto.

**Figura 5** – Di-ramnolipídeos inibem o edema cutâneo (A) e atividade de MPO (B) induzidos por irradiação-UVB



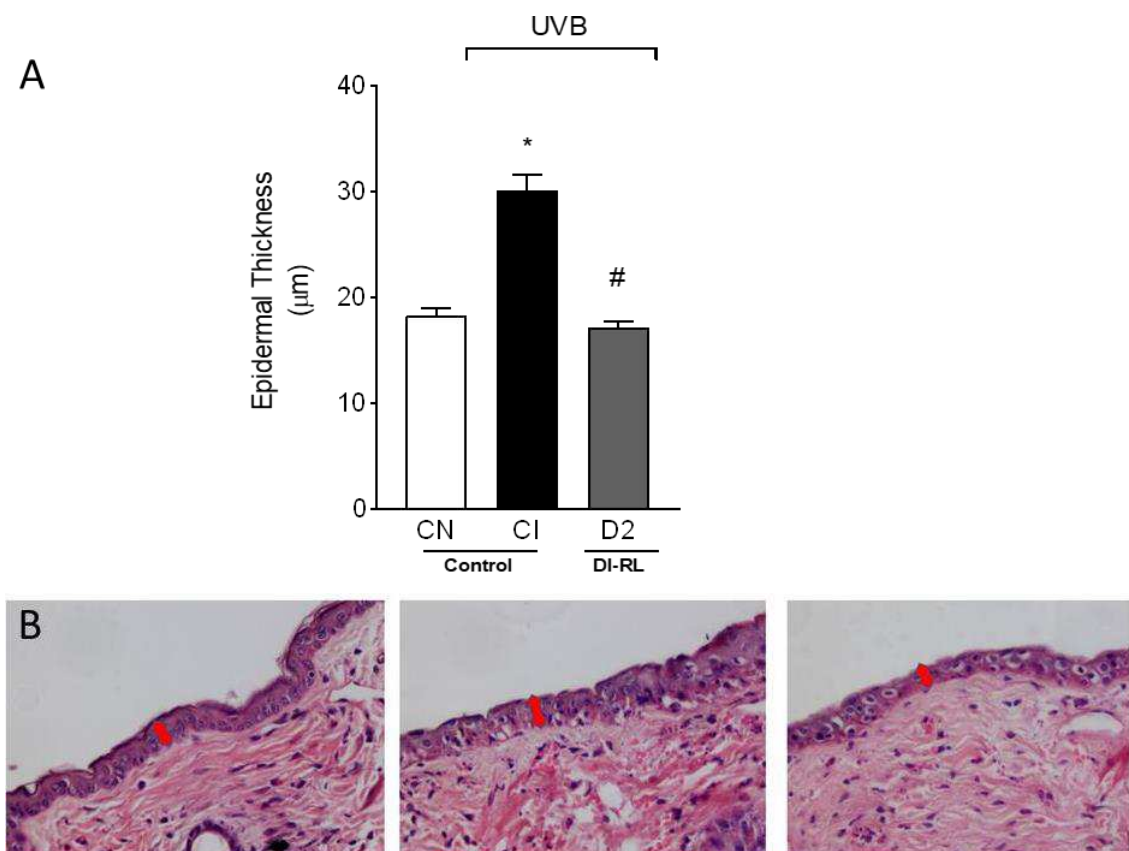
(A) Edema de pele; (B) Atividade de MPO foram determinados em amostras coletadas 12h após a irradiação. CN, controle não irradiado; CI, controle irradiado tratado com veículo salina 1h antes e 1h após o término da irradiação; D1, D2 e D3, tratamento com Di – RL (0,3, 3 ou 30 mg / kg) 1h antes e 1h após o término da irradiação via intraperitoneal i.p. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são representativos de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \*p <0,05 comparado ao grupo controle não irradiado (CN); #p <0,05 comparado ao grupo controle irradiado (CI).

A infiltração de neutrófilos na área exposta a UVB e a consequente liberação de EROS são extremamente prejudiciais às células e tecidos (BJORNSDOTTIR et al., 2015). A mieloperoxidase (MPO) é utilizada como marcador indireto de contagem de neutrófilos, visto que ela tem um importante papel no sistema imunológico pois é considerada um marcador bioquímico da infiltração de células inflamatórias em tecidos que são danificados (PRADE et al., 2020). Pelos resultados mostrados na Figura 5B, é notável que a atividade de MPO teve um aumento significativo nos camundongos irradiados com UVB. Observa-se também que os camundongos irradiados, que receberam tratamento com as diferentes doses de Di – RL, apresentaram níveis mais baixos da MPO, não havendo diferença significativa entre as doses 0,3; 3,0 e 30 mg/Kg. Embora não tenha sido visto diferença significativa entre as doses testadas de Di-RL para MPO, os resultados obtidos para redução de edema

cutâneo proporcionado pelo tratamento com Di-RL foram vistos apenas na dose 3,0mg/Kg (D2), sendo essa a dose de escolha para os próximos experimentos.

A espessura epidérmica também é usada como parâmetro quantitativo para avaliar a inflamação. Para essa análise, foi realizado a preparação histológica (H&E) e a espessura da pele determinada por microscopia ótica (Figura 6).

**Figura 6** – Di-ramnolipídeos reduzem o aumento da espessura epidérmica induzido por irradiação-UVB



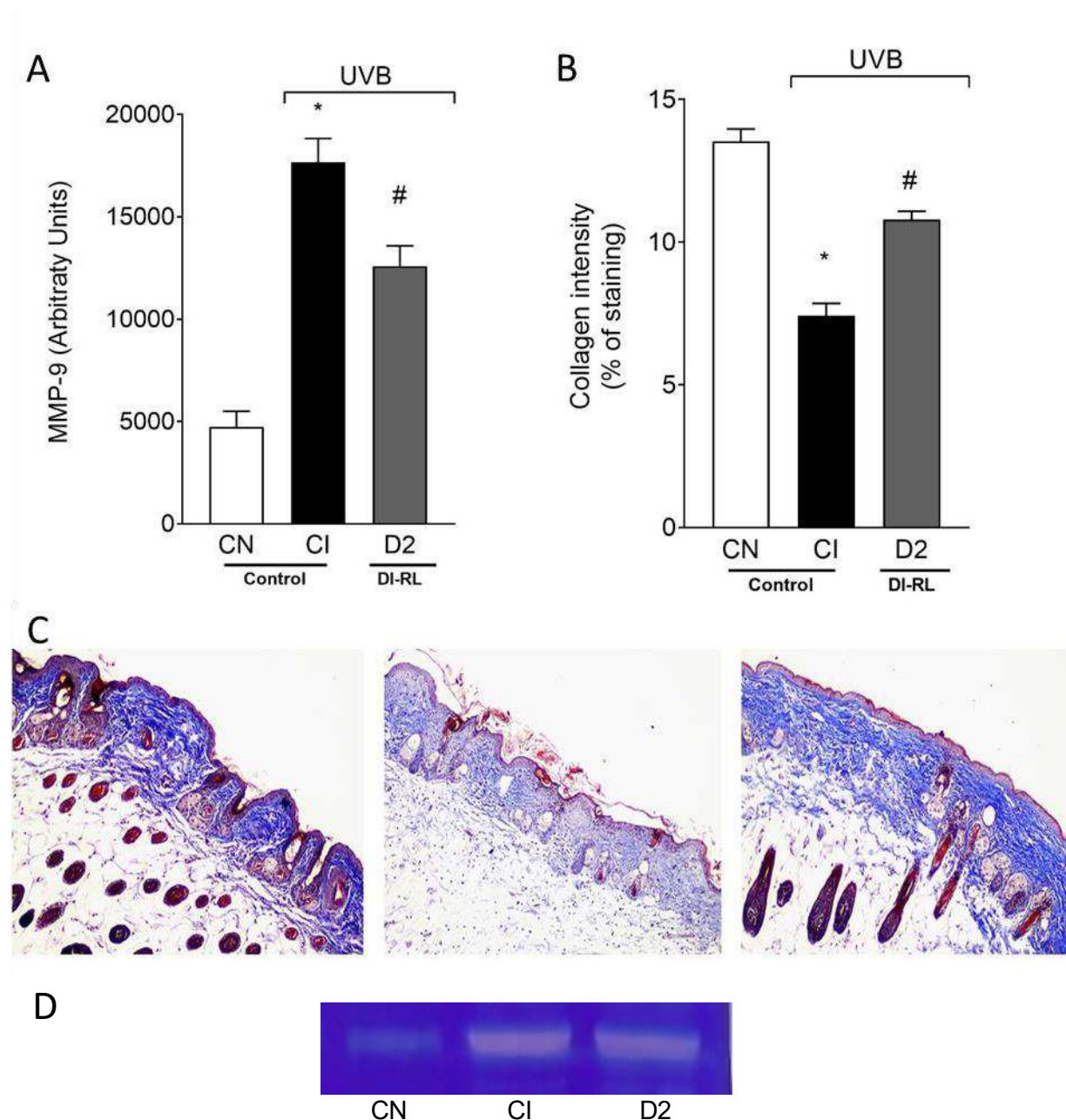
Espessura epidérmica foi avaliada pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E) em amostras de pele coletadas após 12 h após a irradiação. Observado em Microscópio de luz com (aumento de 40x), as setas indicam a espessura da epiderme dos diferentes grupos. (A) Espessura epidermal dos diferentes grupos. (B) Imagens representativas dos grupos CN, controle não irradiado; CI, controle irradiado tratado com veículo salina 1h antes e 1h após o término da irradiação; D2 tratamento com Di – RL (3 mg / kg) 1h antes e 1h após o término da irradiação vi i.p. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são representativos de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \*p <0,05 comparado ao grupo controle não irradiado (CN); #p <0,05 comparado ao grupo controle irradiado (CI).

Os resultados mostraram que, a espessura da epiderme dorsal foi de  $18,26 \pm 0,74 \mu\text{m}$  no controle não irradiado,  $30,10 \pm 1,47 \mu\text{m}$  no controle irradiado e  $17,20 \pm 0,55 \mu\text{m}$  nos animais que receberam tratamento com D2. Pode-se dizer que, o controle irradiado apresentou um aumento significativo de epiderme após a irradiação UVB, em comparação com o grupo controle não irradiado. Em contraste, os animais que foram tratados com 3,0 mg de Di – RL (D2) apresentaram uma redução epidérmica (Figuras 6 A e B).

Outro parâmetro, considerado inflamatório, é a atividade / secreção de MMP- 9. Essas enzimas proteolíticas degradam colágeno da matriz extracelular durante processos que causam fotoenvelhecimento (ZAID et al., 2007). Os resultados mostraram que o tratamento com Di-RL (D2) (Figura 7A), reduziu a atividade / secreção de MMP-9 após a radiação UVB. Além disso, uma análise histopatológica, onde amostras de peles com 3 mg/kg de Di – RL teve um efeito protetor contra danos às fibras de colágeno.

Após a exposição à radiação UVB, ocorreu um aumento significativo no número de mastócitos dérmicos, células que são responsáveis pela imunomodulação. Além disso, os animais tratados com Di - RL 3mg/kg (D2) apresentaram redução na proliferação dessas células quando comparadas às amostras do grupo controle irradiado (Figura 8).

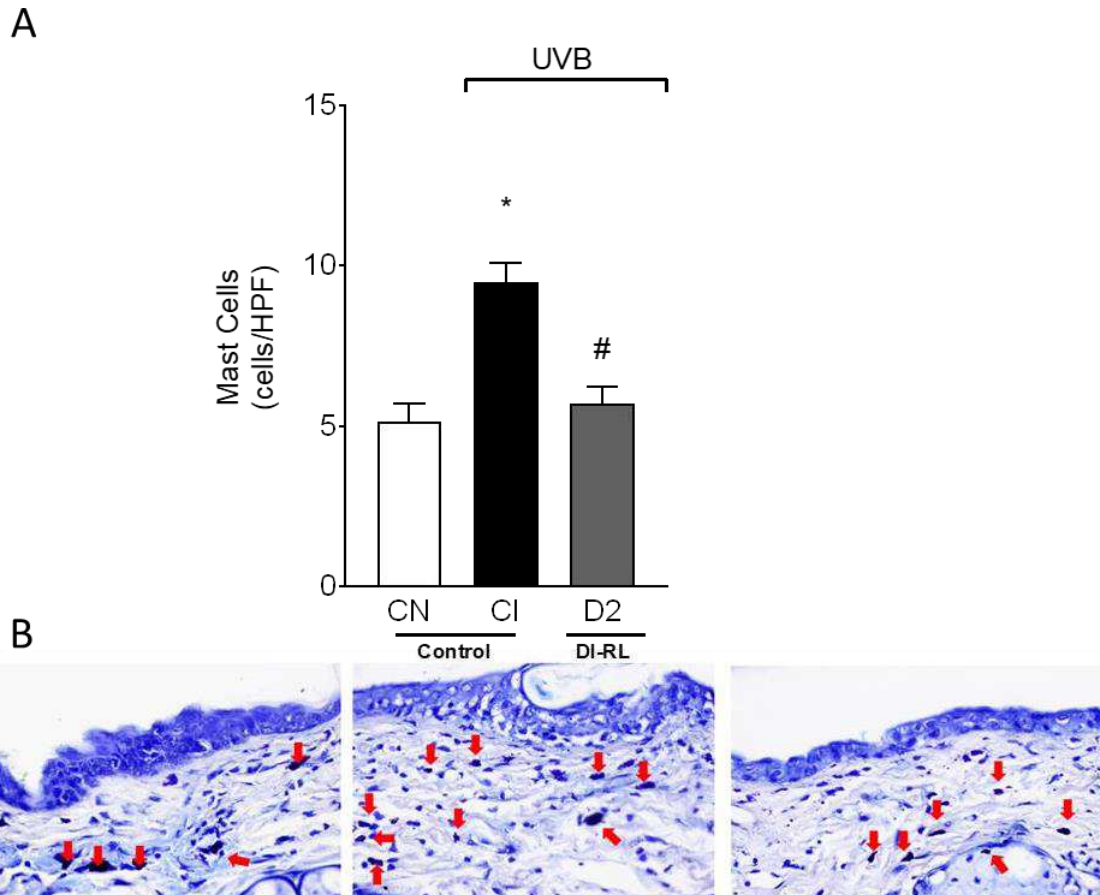
**Figura 7 – Di-ramnolipídeos inibem o aumento da atividade de MMP-9 e danos nas fibras de colágeno induzidos por irradiação UVB**



(A) Atividade/secreção da MMP-9 foi determinado em amostras coletadas 12h após a irradiação, (D) Gel de zimografia representando a intensidade da atividade/secreção da MMP-9 CN, controle não irradiado; CI, controle irradiado tratado com veículo salina 1h antes e 1h após o término da irradiação; D2 tratamento com Di – RL (3 mg / kg) i.p. (B, C) Formação de fibras de colágeno foi avaliada pela coloração de Tricômio de Masson em amostras de pele coletadas após 12 horas do término da irradiação. A intensidade das fibras de colágeno e os feixes mostrados em azul foram analisados através do Programa Image J (aumento de 10x). As barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são

representativos de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle não irradiado (CN); # $p < 0,05$  comparado ao grupo controle irradiado (CI).

**Figura 8** – Di-ramnolipídeos reduzem a contagem de mastócitos induzidos por irradiação UVB na pele

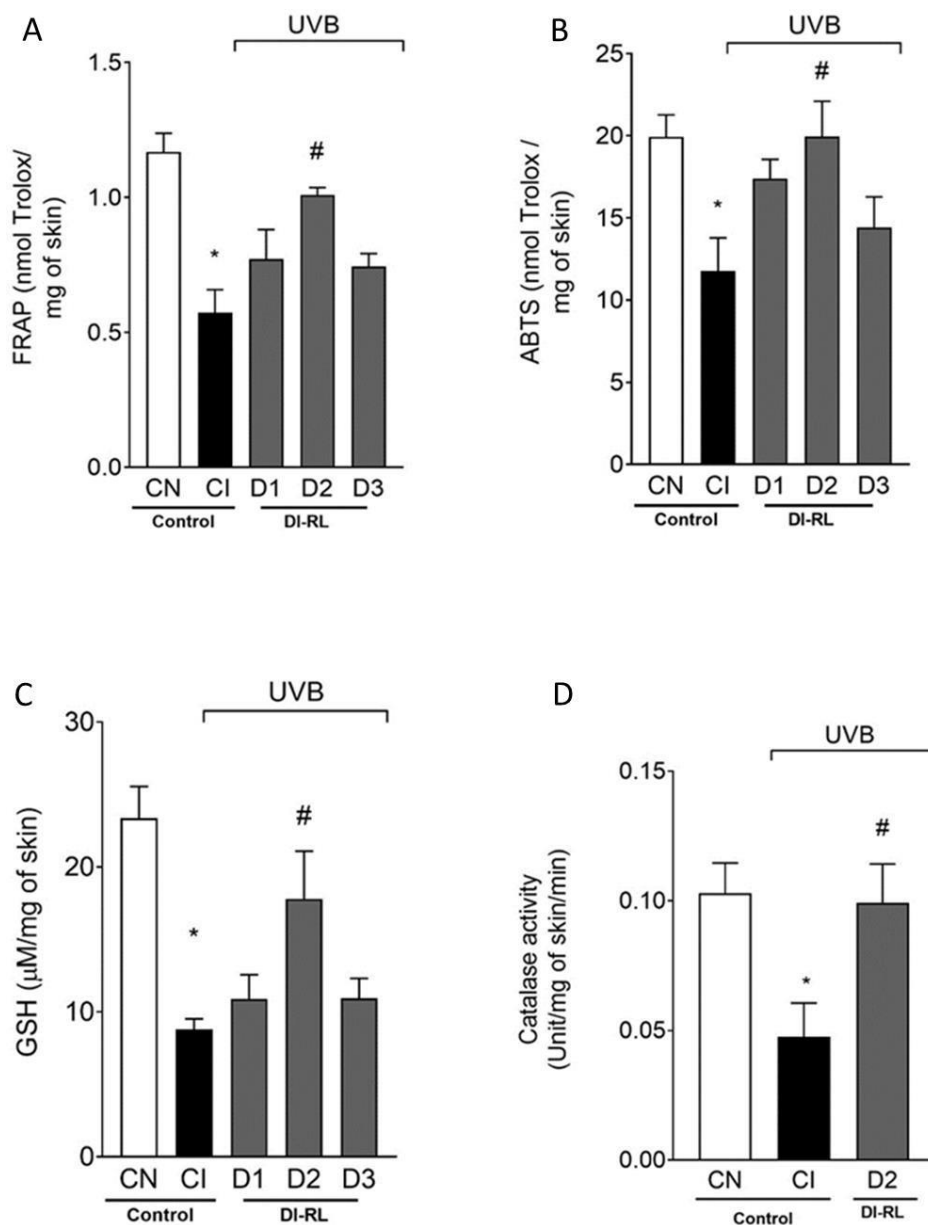


Os mastócitos foram avaliados pela coloração Azul de Toluidina em amostras de pele coletadas após 12 horas do término da irradiação. As secções coradas foram examinadas através do número de mastócitos em Microscópio de luz (aumento de 40x). (A) As barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são representativos de dois experimentos separados e (B) Identificação das células de mastócitos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle não irradiado (CN); # $p < 0,05$  comparado ao grupo controle irradiado (CI).

Os próximos blocos de experimentos tratam de testes para avaliação da atividade antioxidante de Di-RL. A irradiação UVB leva a formação de (EROS) que contribuem para inflamação aguda e crônica (ANSARY *et al.*, 2021). Os animais foram

submetidos à radiação UVB, que por sua vez induziu o estresse oxidativo através da redução da capacidade antioxidante nos níveis de GSH, FRAP e ABTS. O tratamento com Di-RL foi capaz de inibir essa depleção, aumentando significativamente esses níveis na dose D2 (3 mg/kg animal), enquanto as outras doses não apresentaram diferenças significativas (Figura 9 A, B e C).

**Figura 9** – Di-ramnolipídeos inibem a depleção de antioxidantes induzida por irradiação UVB

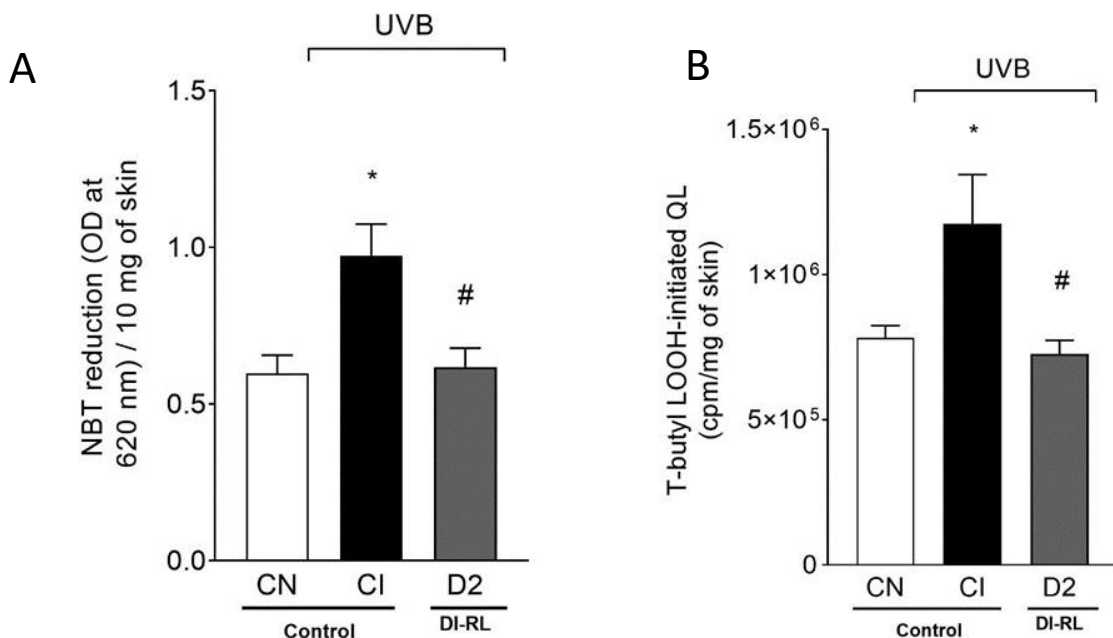


Avaliação da capacidade antioxidante pelos ensaios FRAP (A), ABTS (B), GSH (C) foram determinadas em amostras coletadas 12h após a irradiação. E o ensaio de CAT (D) foi determinado em amostras coletadas 2 horas após o término da irradiação. CN, controle não irradiado; CI, controle irradiado tratado com veículo salina 1h antes e 1h após o término da

irradiação; D1, D2 e D3, tratamento com Di – RL (0,3, 3 ou 30 mg / kg) 1h antes e 1h após o término da irradiação via intraperitoneal i.p. As barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são representativos de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \*p <0,05 comparado ao grupo controle não irradiado (CN); #p <0,05 comparado ao grupo controle irradiado (CI).

A irradiação UVB, também, provocou redução na atividade da CAT (Figura 9D), aumentou a do ânion superóxido (NBT) (Figura 10A) e a produção de LOOH (Figura 10B) no grupo irradiado, em comparação com o não irradiado. O tratamento com D2 levou o esgotamento do ensaio de CAT e a produção de ânion superóxido e hidroperóxido, quando comparado ao grupo não irradiado. Ou seja, o D2 reduziu o estresse oxidativo na pele, causado pela radiação UVB porque melhorou o sistema antioxidante (ensaio GSH e CAT) e reduziu a produção de ânion superóxido (ensaio de NBT).

**Figura 10** – Di-ramnolipídeos reduzem a produção de ânion superóxido e peroxidação lipídica induzidos por irradiação UVB



(A) Redução de nitroblue tetrazolium (NBT), (B) Quimioluminescência determinada por t-butil LOOH, foram determinados em amostras coletadas 2h após a irradiação. CN, controle não irradiado; CI, controle irradiado tratado com veículo salina 1h antes e 1h após o término da irradiação; D2 tratamento com Di – RL (3 mg / kg) i.p. As barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e são representativos de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido ao teste de Tukey. \*p <0,05

comparado ao grupo controle não irradiado (CN); #p <0,05 comparado ao grupo controle irradiado (CI).

Embora haja relatos na literatura científica sobre potenciais efeitos farmacológicos de Di-RL [(i) no estímulo do sistema imune de animais e plantas (ANDRA *et al.* 2006; BAUER *et al.* 2006; HOWE *et al.* 2006; VARNIER *et al.* 2009; VATSA *et al.* 2010; SANCHEZ *et al.* 2012); (ii) no incremento da capacidade cicatrizante (BAUER *et al.* 2006; SANA *et al.* 2018); e (iii) na terapia de redução de queloides (SHEN *et al.* 2016)] esta é a primeira vez que se mostra a capacidade destes glicolipídeos de *P. aeruginosa* na redução da inflamação e do estresse oxidativo cutâneo induzido por exposição à radiação UVB. O presente resultado abre novas oportunidades no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para o tratamento de processos inflamatórios e oxidativos da pele induzidos pela exposição ao sol. Novos estudos ainda são necessários para avaliar a melhor forma de veiculação deste produto, bem como estudar mecanismos moleculares para compreender os seus potenciais efeitos terapêuticos protetor e/ou curativo.

## 6 CONCLUSÃO

A partir da avaliação, *in vivo*, da eficiência de Di – RL administrados via intraperitoneal em camundongos expostos à radiação UVB, observou-se que Di-RL na dose 3mg/kg apresentaram eficazes atividades anti-inflamatória e antioxidante. Quanto a atividade anti-inflamatória a mesma foi observada a partir dos resultados obtidos na inibição do edema cutâneo, recrutamento de neutrófilos, atividade da MMP–9 e histologia através da redução do espessamento epidérmico, queda no número de mastócitos e um aumento na intensidade das fibras de colágenos, enquanto a capacidade antioxidante foi confirmada com os resultados obtidos em relação aos níveis de GSH, atividade de catalase, redução da produção de ânion superóxido e hidroperóxidos lipídicos, além da manutenção do sistema antioxidante da pele comprovada pelos testes de FRAP e ABTS.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984. ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. **Microbiology Monographs**, v. 20, p. 13-55, 2011.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LEPINE F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins, and roles. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- AHMAD, A.; AHSAN, H. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in ophthalmic disorders. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 41, n.3, p. 257-271, 2020.
- ANDRA J, RADEMANN J, HOWE J et al Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from Burkholderia (Pseudomonas) plantarii: immune cell stimulation and biophysical characterization. **Biol Chem** 387:301–310, 2006.
- ANSARY, T. M.; MD. R.; HOSSAI. M.R.; KAMIVA, L.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. **International Journal of molecular sciences**, v. 22, p. 3974, 2021.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Article ID 360438, 2014.
- BAUER J, BRANDENBURG K, ZAEHRINGER U, RADEMANN J Chemical synthesis of a glycolipid library by a solid-phase strategy allows elucidation of the structural specificity of immunostimulation by rhamnolipids. **Chem Eur J** 12:7116–7124, 2006.
- BEYER, T. A.; AUF DEM KELLER, U.; BRAUN, S.; SCHÄEFER, M.; WERNER, S. Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer. **Cell Death and Differentiation**, v.14, n. 7, p. 1250-1254, 2007.
- CADET, J.; DAVIES, K.J.A.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P.D.; WAGNER, J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p.13-34, 2017.
- CAMILIOS-NETO, D. Produção de Rhamnolipídeos por Fermentação em Estado Sólido. 2010. **Tese (Doutorado Bioquímica)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- CAO, H.; KRISHNAN, G.; GOUMNEROV, B.; TSONGALIS, J.; TOMPKINS, R.; RAHME, L. G. A quorum sensing- associated virulence gene of Pseudomonas aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14613–14618, 2001.
- CAMPANINI, M. Z.; RIBEIRO-PINHO, F.A.; IVAN, A.L.M.; FERREIRA, V.S.; VIELA, F.M.P.; VICENTINI, F.T.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. Efficacy of topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153– 160, 2013.
- CAMPONAGARA, C.; BRUM, E.S.; PEGORARO, N.S.; BRUSCO, I.; ROCHA, F. G.; BRANDENBURG, M.M.; CABRINI, D. A.; ANDRÉ, E.; TREVISAN, G.; PLIVEIRA, S. M. Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-

induced skin inflammation in mice. **Life Sciences**, v. 262, 118557, 2020.

CAPALLERE, C.; PLAZA, C.; MEYRIGNAC, C.; ARCIONI, M.; BRULAS, M.; BUSSUTTIL, V.; GARCIA, I.; BAUZA, E.; BOTTO, J.M. Property characterization of reconstructed human epidermis equivalents, and performance as a skin irritation model. **Toxicology in vitro**, v.53, p.45-46, 2018.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; JR VERRI, W. A.; DORTA, D.J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006.

CONCEIÇÃO, K.S., DE ALENCAR ALMEIDA, M., SAWONIUK, I.C. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* grown on membranes of bacterial cellulose supplemented with corn bran water extract. **Environ Sci Pollut Res** 27, 30222–30231, 2020.

CUELHO, C.H.F.; ALVES, G.A.D.; LOVATTO, M.O.; BONILHA, I.F.; BARBISAN, F.; DA CRUZ, I.B.M.; OLIVEIRA, S.M.; FACHINETTO, R.; DO CANTO, G.S.; MANFRON, M.P. Tropical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 189, n.OCTOBER, P. 95-103, 2018.

DE GRUIJL, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 15, p. 316–320.

D' ORAZIO.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. Uv radiation and the skin. **International Journal of molecular sciences**, v.14, p. 12222-12248, 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FONSECA, M. J. V.; FONSECA, Y.M.; OLIVEIRA, F.M.; VICENTINI, F.T.M.C.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUSA, J.P.B.; VALIM, Y. M. L. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011a.

GRIGORAS, A. G.; Catalase immobilization – A review. **Journal Biochemical Engineering**. v. 117, p. 1-20, 2017.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

HE, C.; DONG, W.; LI, J.; LI, Y.; HUANG, C.; MA, Y. Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant *Pseudomonas aeruginosa* strain DAB with removal of crude oil. **Biotechnology Letters**, v. 39, p. 1381-1388, 2017.

HERNÁNDEZ, A.R.; VALLEJO, B.; RUZGAS, T.; BJORKLUND, S. The effect of UVB irradiation and oxidative stress on the skin barrier – A new method to evaluate sun protection factor based on electrical impedance spectroscopy. **Sensors**, v. 19, n. 10, p. 2376, 2019.

HOLICK, M.F. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. **Anticancer Research**, v. 36, p.1345-1356, 2016.

HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa* **Journal of General Microbiology**, v. 13, p. 572-581, 1955.

HONARI, G.; MAIBACH, H. Skin Structure and Function. **Applied Dermatotoxicology**, p.1-10, 2014.

HOWE J, BAUER J, ANDRA J et al., Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. **FEBS J** 273:5101–5112, 2006.

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.; ZARPELO, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. H. V.; BARACAT, M., M.; GEORGETTI, S. R.; JR VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124–133, 2014.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays, **Comparative Biochemistry and Physiology** v.140, p.47–52, 2005.

KAUR, P., LI,A. Adhesive Properties of Human Basal Epidermal Cells: An Analysis of Keratinocyte Stem Cells, Transit Amplifying Cells, and Postmitotic Differentiating Cells. **The Society for Investigative Dermatology, Inc.** p. 413-420 , 2000.

KHALID, A.; JAVAID, M.S. Matriz Metalloproteinases:New Targets in Cancer Threapy. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v.8, p. 143-153, 2016.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matriz Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **CelPress**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 385–394, 2005.

LAI-CHEONG, J.E.; MCGRATH, J.A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 45, n. 6 , p. 347-351 ,2017.

LAMONT, I. L.; BEARE, P.A.; OCHSNER, U.; VASIL, A.I.; VASIL, M.L. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7072-7077, 2002.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology Advances**, v.33, p. 1715-1726, 2015.

MAKIDA, K.; NISHIDA, Y.; MORITA, D.; OCHIAI, S.; HIGUCHI, Y.; SEKI, T.; IKUTA, K.; ISHIGURO, N. Low energy irradiation of narrow-range UV-LED prevents osteosarcopenia associated with vitamin D deficiency in senescence-accelerated mouse prone 6. **Scientific Reports**, v. 10, n. 11892 , 2020.

MARTINEZ, R. M.; RIBEIRO, F. A. P.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNLI, J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; JR VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1647–1655,

2015.

MICOL, V. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. **Nutrients** v. 10, p. 1–22 , 2018.

NATARAJAN, V.T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R.S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology** v. 10, p. 542–551, 2014.

NIEHUES, H.; BOUWSTRA, J.A.; GRALBZOURI, A.E.; BRANDNER, J.M.; ZEEUWEN, P.L.J.M.; BOGAARD, E.H.V.D. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. **Experimental Dermatology**, v. 27 (5), p. 501-511, 2018.

O'LOUGHLIN, C. T.; MILLER, L. C.; SIRYAPORN, A.; DRESCHERA, K.; SEMMELHACKB, M. F.; BASSLER, B. L. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 17981-17986, 2013.

PRADE, J.S.; BÁLSAMO, E.C.; MACHADO, F.R.; POETINI, M.R.; BORTOLOTTI, V.C.; ARAÚJO, S.M.; LONDERO, L.; BOEIRA, S. P.; SEHN, C.P.; GOMES, G.G.; PRIGOL, M.; SOUZA, L.C. Anti-inflammatory effect of *Anica montana* in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 39, e. 2, p. 126-133, 2020.

PASSERON, T., KRUTMANN, J., ANDRESEN, M.L., KATTA, R., ZOUOULIS. Clinical and biological impact of the exposome on the skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v 34, p. 4-25, 2020.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. **Nutrients** v. 10, p. 1–22 , 2018.

PILJAC, T.; PILJAC, G. Use of Rhamnolipids as Cosmetics. Patent no. **EP 1056462 B1**, 2007.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0,1% dirhamnolipid ointment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 12, p. 142-146, 2008.

PILJAC, T.; PILJAC, G. Use of Rhamnolipids as Cosmetics. Patent no. **EP 1056462 B1**, 2007.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v.27, p.17-34, 2005.

POLETTA, G. L.; SIMONIELLO, M. F.; MUDRY, M. D. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 179, p. 29–36, 2016.

PULLI, B.; ALI, M.; WOJTKIEWICZ, G.; CHEN, J.W.; HSIEH, K.L.C.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; INNOILA, J.J. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PloS One** 8 (7), e67976, 2013.

QUAN, T.; FISHER, G.J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin ageing: A mini-review. **Gerontology**, v. 61, p. 427- 434, 2015.

SAITO, M.; TANAKA, M.; MISAWA, E.; YAO, R.; NABESHIMA, K.; YAMAUCHI, K.; ABE, F.; YAMAMOTO, Y.; FURUKAWA, F. Oral administration of aloe vera gel powder prevents uvb-

- induced decrease in skin elasticity via suppression of overexpression of mmps in hairless mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 7, p. 1416–1424, 2016.
- SANA, S.; DATTA, S.; BISWAS, D.R.; AUDDY, B.; GUPTA, M.; CHATTOPADHYAY, H. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. **Wound Med**. 2018, 23, 47–52, 2018.
- SANCHEZ L, COURTEAUX B, HUBERT J, KAUFFMANN S, RENAULT JH, CLÉMENT C, BAILLIEUL F, DOREY S Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. **Plant Physiol** 160:1630–1641, 2012.
- SÁNCHEZ-MARZO, N.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; RUIZ-TORREZ, V.; MARTÍNEZ-TÉBAR, A.; CASTILLO, J.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; BARRAJÓN-CATALÁN, E. Antioxidant and photoprotective activity of a pigenin and its potassium salt derivative in human keratinocytes and absorption in Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- SCHWARZ, A.; BHARDWAJ, R.; ARAGANE, Y.; MAHNKE, K.; RIEMANN, H.; METZE, D.; LUGER, T.A.; SCHWARZ. Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial Involvement of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the Formation of Sunburn Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 6, p. 922–927, 1995.
- SHARIFI-RAD, M.; ANIL KUMAR N.V.; ZUCCA, P.; VARONI E. M.; DINI. L.; PANZARINI, E.; RAJKOVIC, J.; TSOUH, F.P.V.; AZZINI, E.; PELUSO, I.; PRAKASH, M. A.; NIGAM, M.; EL RAYESS, Y.; BEYROUTHY, M. E.; POLITO, L.; IRITI, M.; MARTINS, N.; MARTORELL, M.; DOCEA, A. O.; SETZER, W. N.; CALINA, D.; CHO, W.C.; SHARIFI-RAD, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Journal Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 694, 2020.
- SHEN C, JIANG L, SHAO H, YOU C, ZHANG G, DING S, BIAN T, HAN C, MENG Q Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant dirhamnolipid suggests a therapy against scar formation **Sci Rep**:6, 2016.
- SINGH, V.K.; SEED, T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part I. Radiation sub-syndromes, animal models and FDA-approved countermeasures. **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, e.9, p. 851-869, 2017.
- SHIMIZU, H. 2017. Structure and function of the skin, in: Shimizu's Dermatology. **John Wiley & sons Inc.**, p. 1–42. , 2017.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **Journal of invertigative Dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 1993.
- SONG, J. H. et al. t BA: A review of skin ageing and its medicais therapy. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 2937–2944, 2016.
- SOUCI, L.; DENESVRE, C. 3D skin models in domestic animals. **Veterinary Research**, v. 52, p. 1 – 21, 2021.
- SRINIVASAN, P.; SABITHA, K. E.; SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sciences**, v. 80, n. 12, p..1080–1086, 2007.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 409, p. 959-964, 2000.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers is an official journal of the Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic**, v.150, p.25-38, 2006.

Varnier A-L, Sanchez L, Vatsa P et al Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ** 32:178–193, 2009.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 5095-5108, 2010.

WADEKAR S, D.; KALE, S. B.; LALI, A. M.; BHOWMICK, D. N; PRATAP, A. P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, p. 249-266, 2012.

YEARGER, D.G.; LIM, W.L. What's new in photoprotection: a review of new concepts and controversies. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 2, p. 149-157, 2019.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, skin (integument), epiderme. **StatPearls** , PMID: 29262154, 2020.

XIAO, TA.; CHEN, Y.; SONG, C.; XU, S.; LIN, S.; LI, M.; CHEN, X.; GU, H. Possible treatment for UVB-induced skin injury: Anti-inflammatory and cytoprotective role of metformin in UVB-irradiated keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**. v. 102, p. 25-35, 2021.