



## **AValiação DA ATIVIDADE FOTOQUIMIOPROTETORA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA EM FIBROBLASTOS L929 SUBMETIDOS À RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA.**

Karine Campos Nunes (PIC/UEM), Aline de Souza Lima (PIC/UEM), Karen E. Peloi, Fabianne Martins Ribeiro, Celso Vataru Nakamura (Orientador),  
email: kaahnunes07@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências  
Farmacêuticas/Maringá, PR.

**Área: Ciências da Saúde (4.00.00.00-1) subárea: Farmácia (4.03.00.00-5)**

**Palavras-chave:** radiação ultravioleta, fotoenvelhecimento cutâneo, fotoproteção

### **Resumo:**

A biodiversidade Amazônica constitui a maior fonte de recursos disponíveis no Brasil, tornando-se alvo das bioindústrias que buscam pesquisar e desenvolver novos bioprodutos através de espécies vegetais, dentre eles, os fotoprotetores. Os raios ultravioletas (RUV) possuem a capacidade de penetrar na pele provocando alterações celulares que podem levar ao câncer e envelhecimento precoce. A RUV é dividida de acordo com seu comprimento de onda em: UVC (200-280nm), UVB (280-320nm) e UVA (320-400nm). Apesar de atingir a superfície terrestre com maior frequência, a radiação UVA possui um menor potencial causador de danos à pele do que UVB. O principal mecanismo pelo qual a RUV inicia as alterações moleculares na pele, é a geração de (EROs). Os efeitos nocivos da luz solar sobre a pele tem despertado atenção para o desenvolvimento de estudos que envolvem a síntese e a extração de compostos orgânicos a partir de fontes naturais que possam absorver a RUV, e anti-inflamatórios, que podem ser utilizados como agentes fotoquimioprotetores para reduzir o dano induzido por radiação UV na pele. A proposta do presente trabalho é avaliar o potencial fotoprotetor de extratos de compostos da Amazônia (extratos **2099** e **2100**), em fibroblasto de murino da linhagem L-929 submetidas a radiação UVA e UVB.

### **Introdução**

A pele humana é o órgão mais exposto à radiação solar, e a utilização de filtros solares constitui uma das medidas preventivas ao



fotoenvelhecimento e o câncer de pele (GUARATINI et al., 2009). De acordo com o INCa (2012), Instituto Nacional de Câncer, o câncer de pele é o mais frequente dos tumores malignos incidentes no Brasil, representando 25% dos tipos de cânceres.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pela radiação UV é o principal mecanismo pelo qual é iniciado as respostas moleculares na pele, desencadeando o estresse oxidativo, caracterizado por uma cadeia de reações que podem levar à alterações em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (PILLAI, CORNELL, ORESAJO, 2010; POLJSK, DAHMANE, 2012). A ação cumulativa da radiação UV sob a pele desprotegida provoca um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas. Devido à complexidade dos efeitos nocivos provocados na pele, estudos têm sido desenvolvidos a partir de espécies vegetais com propriedades antioxidantes podendo absorver a radiação UV, e ação antiinflamatórias, podendo ser utilizados como agentes fotoquimioprotetores reduzindo o dano induzido pela radiação UV (FIGUEIREDO, 2014).

Sendo assim, a identificação de compostos com propriedades antioxidante e fotoprotetora é de grande importância na prevenção da fotocarcinogênese e outros efeitos nocivos da RUV. Diante do exposto, a proposta deste trabalho é avaliar o potencial fotoprotetor de extratos de compostos da Amazônia, em fibroblasto de murino da linhagem L-929 submetidas a radiação UVA e UVB.

## **Materiais e métodos**

### *Citotoxicidade da radiação ultravioleta*

Para determinar a intensidade das radiações UVA e UVB, em joules/cm<sup>2</sup> (J/cm<sup>2</sup>) e milijoules/cm<sup>2</sup> (mJ/cm<sup>2</sup>), foram realizados o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (MOSSMANN, 1983), onde determinou-se a intensidade de radiação citotóxica para 20% das células.

As células L-929 ( $8 \times 10^5$  células/mL) foram plaqueadas em discos de cultura celular (40 x 11 mm TPP<sup>®</sup>), em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, e então mantido em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até a formação da monocamada. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo tampão Hanks, e as células foram irradiadas em diferentes intensidades de radiação UVB (100, 200, 400, 600, 800, 1000 mJ/cm<sup>2</sup>) e UVA (5, 10, 20, 30, 40 J/cm<sup>2</sup>). Após a irradiação, as células foram incubadas por mais 24 h em meio DMEM sem SFB, para posterior determinação da viabilidade celular através do método colorimétrico MTT. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Bio Tek – Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao



controle (não irradiado). A intensidade de radiação citotóxica para 20% das células foi determinada por análise de regressão linear.

### *Ensaio de citotoxicidade*

Este método baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tretazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) hidrossolúvel em um composto púrpuro insolúvel denominado formazan.

Uma suspensão de células L-929 ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foi plaqueada em microplacas de 96 poços em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, e então mantido em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até a formação da monocamada. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos de espécies da Amazônia (**2099** e **2100**) por 24 h em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tratamento as células foram lavadas com 100 µL de PBS (tampão fosfato de salina) em seguida foi adicionado MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 2 mg/mL, a placa foi incubada por 4 h em estufa a 37 °C protegida da luz. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em um espectrofotômetro de microplacas (Bio Tek – Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. O CC<sub>20</sub> (concentração citotóxica em 20%) foi determinado por análise de regressão linear.

### **Resultados e Discussão**

Primeiramente foi determinada a atividade antioxidante dos extratos de espécies da Amazônia (**2099** e **2100**) pelo método do DPPH. O DPPH é um radical livre que é capturado por antioxidantes, e esta reação leva à uma mudança de coloração que pode ser monitorada por espectrofluorimetria (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), e que permite determinar o EC<sub>50</sub>. O EC<sub>50</sub> do extrato **2099** foi de 4,186 µg/mL e do **2100** foi 5,973 µg/mL.

Para determinar a intensidade de radiação que induzisse a produção de dano, mas ao mesmo tempo não inibisse mais que 20 % das células, realizamos uma curva dose-resposta. Assim, determinamos a intensidade de radiação que foi utilizada na irradiação das células L929.

Outra etapa preliminar foi determinar a toxicidade dos extratos **2099** e **2100** sobre as células L929. O tratamento das células com diferentes concentrações dos extratos nos permitiu determinar o CC<sub>20</sub> dos extratos **2099** e **2100**,  $19,0 \pm 0,23$  e  $30,0 \pm 0,50$  respectivamente. Pudemos assim trabalhar com concentrações de baixa toxicidade e também sem



comprometer a atividade antioxidante, pois o  $CC_{20}$  obtido é maior do que o  $EC_{50}$ .

## Conclusões

Verificamos que os extratos de espécies da Amazônia, **2099** e **2100**, mostraram  $CC_{20}$  baixo e  $EC_{50}$  alto, ou seja, baixas citotoxicidades e fortes atividades antioxidantes, portanto poderiam reduzir danos causados na pele pela radiação ultravioleta.

## Referências

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F.M.; SILVA, C. A.; CUNHA, T. M.; DOS SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 131, p. 65-73, 2014.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil. 2012. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_57/v04/pdf/13\\_resenha\\_estimativa2012\\_incidencia\\_de\\_cancer\\_no\\_brasil.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_57/v04/pdf/13_resenha_estimativa2012_incidencia_de_cancer_no_brasil.pdf). Acesso em: 19 abril 2015.

PILLAI, S.; CORNELL, M.; ORESAJO, C. Skin Physiology Pertinent to Cosmetic Dermatology. In: Draelos, Z. D. *Cosmetic dermatology: products and procedures*. 1.ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010, p. 3-12.