



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOQUIMIOPROTETORA DA DIVANILINA

Andressa Fumagalli Dacome (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager (Orientador)

e-mail: lautenschlager@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Maringá, PR

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): 40300005/40302008

**Palavras-chave:** fotoproteção, fotoenvelhecimento, UV.

### Resumo

A exposição excessiva e crônica à radiação ultravioleta (UV) induz efeitos deletérios à epiderme e derme da pele, contribuindo para o envelhecimento precoce. Isso ocorre principalmente devido a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocados pela radiação UV, gerando danos oxidativo às biomoléculas celulares. Dessa forma, torna-se importante a pesquisa de agentes fotoprotetores para prevenir e tratar danos celulares, aumentando a eficácia dos protetores solares e diminuindo a incidência de doenças dermatológicas. Conduziu-se ensaios para avaliar a atividade antioxidante da divanilina, para tanto as metodologias *in vitro* ABTS<sup>•+</sup> e sistema xantina/luminol/xantina apresentaram resultados satisfatórios,  $0,571 \pm 0,065 \mu\text{M ET/g}$  e um  $\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$  de  $6,25 \pm 0,04$ , respectivamente. Analisou-se também a atividade biológica do composto frente a fibroblastos L-929 e sua atividade fotoquimioprotetora. Dessa forma constatou-se que a divanilina não apresenta ação citotóxica às células de mamíferos e atua protegendo a viabilidade celular na concentração de  $200 \mu\text{M}$ . A partir dos resultados finais, considerou-se que a substância divanilina pode ser considerada uma alternativa para o tratamento e/ou prevenção de doenças dérmicas.

### Introdução

Por ser o órgão mais exposto do nosso sistema, a pele acaba sofrendo agressões externas, tornando-se mais susceptível à danos causados pela exposição solar (CLYDESDALE et al., 2001). As ondas provenientes da radiação UV induzem danos celulares devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (POLJAK; MILISAV, 2013). As células possuem um sistema antioxidante composto por enzimas capazes de neutralizar a presença das EROs. Quando há um desequilíbrio causado pela deficiência no sistema antioxidante e um aumento da geração de EROs, instala-se o processo de estresse oxidativo, provocando danos oxidativos as biomoléculas celulares (POLJAK; MILISAV, 2013).

Os compostos fenólicos estão entre as principais substâncias antioxidantes naturais. Entre eles destacam-se por sua atividade antioxidante os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, fenóis simples e taninos (ANGELO; JORGE, 2007). A Divanilina é um homodímero de vanilina, que por sua vez

é um composto fenólico o qual apresenta diversas atividades biológicas. Ela atua como realçador de sabor em alimentos e possui uma ação anticarcinogênica (JANTAREE et al., 2017). No entanto, não há relatos em literatura com relação a sua atividade fotoquimioprotetora. Em virtude disso, este trabalho avaliou o potencial da divanilina em minimizar os danos oxidativo provocados pela radiação UVB em fibroblastos L-929. Para isso avaliamos: o potencial antioxidante da divanilina através dos métodos ABTS<sup>•+</sup>, FRAP, DPPH e sistema xantina/luminol/xantina oxidase; a citotoxicidade da divanilina em fibroblastos L9-29 e em fibroblastos L9-29 irradiados com UVB.

### Materiais e métodos

-Capacidade sequestradora do radical ABTS<sup>•+</sup>: preparou-se a solução estoque (SE) de ABTS (7 mmol L<sup>-1</sup>) Em seguida adicionou-se a solução de ABTS em diferentes concentrações de padrão trolox, da amostra e/ou do ácido ascórbico em microplaca transparente de 96 poços, onde foi mantida durante 6 min no escuro. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 734 nm. Foi realizado uma curva de calibração para cada amostra, onde a atividade antioxidante foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox (ET/g de amostra). Potencial redutor pelo método FRAP: preparou-se uma solução de reagente FRAP. Realizou-se as diluições das amostras: padrão trolox, divanilina e ácido ascórbico as quais foram adicionadas em placa de 96 poços com o reagente FRAP para leitura a 595 nm em espectrofotômetro. Soluções de padrão trolox com concentrações conhecidas (1-1000  $\mu\text{mol/g}$ ) foram utilizadas na curva de calibração, com resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  ET/g de amostra. Capacidade sequestradora do radical DPPH: diferentes concentrações das amostras foram adicionadas ao DPPH<sup>•</sup> (65  $\mu\text{M}$ ), em microplaca. Em seguida, incubou-se o ensaio por 30 min. a temperatura ambiente no escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A porcentagem de inibição do radical foi calculada pela sua atividade antioxidante (%) =  $(A_0 - A_1)/A_0 * 100$  (Eq. 1) ( $A_0$ : abs do DPPH;  $A_1$ : abs do DPPH<sup>•</sup> com a amostra). Onde os valores de  $CI_{50}$  (concentração inibitória em 50% do radical) foram estimados por análise de regressão linear. Capacidade sequestradora do radical O<sup>2•-</sup>, pelo sistema xantina/luminol/XOD: preparou-se a solução de reação o qual foi adicionado em placa de 96 poços, com diferentes concentrações das amostras e com a enzima XOD, mantida resfriada. Feito a leitura em luminômetro (Berthold®, Auto-Lumat LB 953). A porcentagem de inibição do radical foi calculada pela Eq. 1, e os valores de  $IC_{50}$  foram estimados por regressão não linear. Citotoxicidade da divanilina, fibroblastos L9-29 ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foram tratados em tampão DMEM com diferentes concentrações da divanilina durante 24 h. Em seguida, realizou-se a leitura usando metodologia do Vermelho Neutro (VN). Viabilidade celular frente a radiação UVB, células L9-29 ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foram pré-tratadas com divanilina e irradiadas até com 600 mJ/cm<sup>2</sup>. Por fim, acrescentou-se meio DMEM, no qual as células foram mantidas por 24 h e realizada a leitura utilizando a metodologia do VN.

## Resultados e Discussão

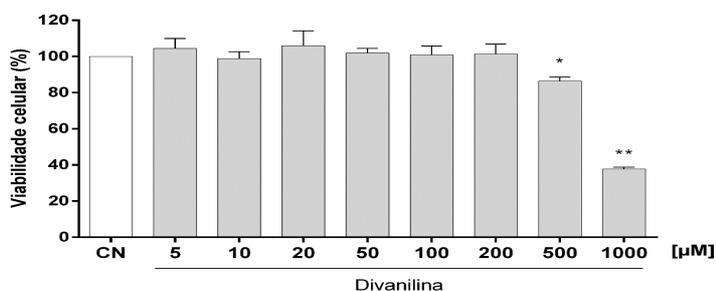
Conforme **Tabela 1**, a divanilina apresentou atividade antioxidante pelas metodologias ABTS<sup>•+</sup> e sistema xantina/luminol/XOD. Os resultados obtidos são próximos ao padrão ácido ascórbico. Entretanto, o potencial redutor da divanilina pelo método FRAP foi aproximadamente 4 vezes menos eficaz e a capacidade sequestradora do radical DPPH<sup>•</sup> foi 15 vezes menos eficaz

**Tabela 1.** Avaliação do potencial antioxidante de divanilina e do padrão ácido ascórbico através dos métodos FRAP, ABTS, DPPH e XO

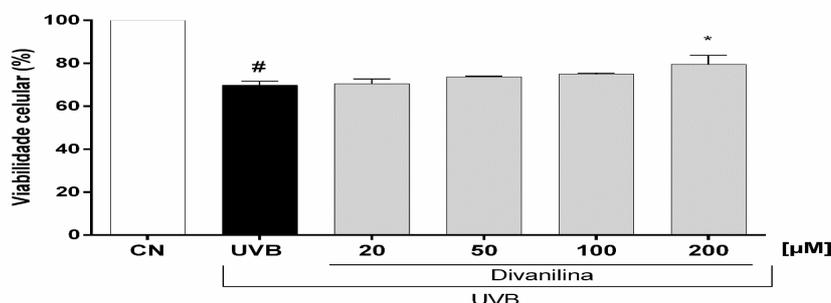
Compostos	ABTS	FRAP	DPPH	XO
	µM ET/g		IC <sub>50</sub> (µM)	
<b>Divanilina</b>	0,571 ± 0,065	491,6 ± 21,8	440,14 ± 5,07	6,25 ± 0,04
<b>Ác. ascórbico</b>	1,511 ± 0,036	2115,44 ± 1,29	15,52 ± 0,05	8,11 ± 0,04

Dados experimentais: média ± desvio padrão; n = 3. ET = equivalente de trolox. IC<sub>50</sub> = concentração inibitória em 50%. Para cada método letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05)

No ensaio de citotoxicidade em fibroblastos L9-29, a divanilina não apresentou toxicidade em diferentes concentrações (**Figura 1**). Dessa forma, avaliou-se a atividade fotoprotetora *in vitro* da divanilina através da viabilidade celular das células pré-tratadas com a substância, e irradiadas com UVB com intensidade de 600 mJ/cm<sup>2</sup>. Como resultado, observou-se que a divanilina atuou protegendo a viabilidade celular na concentração de 200 µM (**Figura 2**).



**Figura 1.** Avaliação da citotoxicidade de divanilina em fibroblastos L929 ( $2,5 \times 10^5$ /mL) após 24h de tratamento utilizando o ensaio de vermelho neutro. CN: controle negativo (células não tratadas). \*p < 0,05 e \*\*p < 0,0001 comparado com CN



**Figura 2.** Avaliação do efeito do pré-tratamento por 1h com divanilina na viabilidade celular de fibroblastos L929 ( $2,5 \times 10^5$ /mL) e expostos a radiação UVB. O ensaio de vermelho neutro foi realizado após 24h de incubação. CN: controle negativo (células não tratadas e não irradiadas), UVB: células não tratadas e irradiadas. #p < 0,0001 comparado com CN, \*p < 0,01 comparado com UVB.

### Conclusões

A divanilina apresentou resultados satisfatórios frente a atividade fotoprotetora nas metodologias ABTS e XO. Além disso, mostrou-se segura quando administrada *in vitro* em células de mamíferos e atua aumentando a viabilidade celular nestas células, quando expostas a radiação UVB. Sendo assim, a divanilina pode ser uma alternativa no tratamento e/ou prevenção de doenças dérmicas.

### Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária, CAPES e CNPq.

### Referências

- ANGELO, P. M.; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- CLYDESDALE, G. J.; DANDIE, G. W.; MULLER, H. K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. **Immunology Cell Biology**, v. 79, p. 547–68, 2001.
- JANTAREE, P.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KAEWSRI, W.; THONGSORNKLEEB, C.; CHOOWONGKOMON, K.; ATJANASUPPAT, K.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J. Homodimers of vanillin and apocynin decrease the metastatic potential of human cancer cells by inhibiting the FAK/PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 2299-2306, 2017.
- POLJAK, B.; MILISAV, I. Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants. Chapter 14: **Agging, oxidative stress and antioxidants**. 1º ed. Intech. 2013.

Formatado: Fonte: 12 pt

Formatado: Espaço Antes: 6 pt, Espaçamento entre linhas: simples

Formatado: Fonte: 12 pt, Não Negrito

Formatado: Fonte: 12 pt

Formatado: Fonte: 12 pt

Formatado: Fonte: 12 pt, Não Negrito

Formatado: Fonte: 12 pt

Formatado: Fonte: 12 pt, Negrito

Formatado: Fonte: 12 pt