

## AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE FORMULAÇÕES CONTENDO CURCUMINA EM CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L-929 SUBMETIDAS A RADIÇÃO UVB

Bruna Lenzion Alves (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Sueli de Oliveira Silva  
Lautenschlager (Orientador), e-mail: lautenschlager@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Básicas  
Saúde/Maringá, PR.

### Farmácia/ Farmacognosia

**Palavras-chave:** radiação UVB, curcumina, atividade antioxidante

#### Resumo:

A curcumina é uma substância antioxidante que poderia ser utilizada para amenizar os danos causados pela radiação UVB, mas apresenta efeitos fototóxicos. Como maneira de diminuir esse efeito podem ser utilizadas formulações. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um gel e um emulgel contendo curcumina. Para tanto foram realizados ensaios de atividade antioxidante, sendo eles, DPPH, ABTS, FRAP e Xantina, além de ensaios de viabilidade celular em célula de fibroblasto L-929, associado ou não a radiação UVB. Os ensaios mostraram que apesar de ter havido uma diminuição da atividade antioxidante, as formulações mostraram amenizar os efeitos fototóxicos da curcumina.

#### Introdução

A radiação UVB (290-320 nm) está entre os componentes mais danosos da radiação solar, causando danos no DNA e levando ao estresse oxidativo. (Trautinger 2001; Cavinato and Jansen-Du`rr 2017). Como alternativa para amenizar os efeitos negativos que a radiação ultravioleta proporciona podem ser utilizadas substâncias antioxidantes (Kasote, et al., 2015). Entre substâncias antioxidantes conhecidas está a curcumina (Mahmood, et al.;2015), mas apesar de antioxidante, a curcumina é uma substância que apresenta respostas fototóxicas, sendo assim, de difícil aplicabilidade como fotoprotetor (DAHLL et al., 1994).

Assim, neste trabalho avaliamos e comparamos o efeito de duas formulações, um gel e um emulgel contendo curcumina e a curcumina livre, em sistemas livre de células e com células do tipo fibroblasto.

#### Materiais e métodos

*Atividade antioxidante em sistema livre de célula:*

Para avaliar o sequestro do radical livre DPPH foram adicionados em placa de 96 poços, 100 µL de DPPH 65 µM e 100 µL de uma das amostras diluída,

seguido de incubação por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente e lido em espectrofotômetro em 517 nM.

Para avaliar o sequestro do cátion-radical ABTS, foram adicionados em placa de 96 poços, 7 µL das amostras previamente diluídas e 200 µL de solução ABTS, seguido de incubação por 6 minutos no escuro em temperatura ambiente e lido em espectrofotômetro em 734 nM. O TROLOX foi utilizado como curva padrão.

Para avaliar a redução do Fe<sup>+3</sup> para Fe<sup>+2</sup> (FRAP) foram adicionados em placa de 96 poços 150 µL do reagente FRAP e 30 µL das amostras previamente diluídas. Após 30 minutos, a placa foi lida em espectrofotômetro em 595 nM. O TROLOX foi utilizado como curva padrão.

Para avaliar a concentração do radical superóxido (Xantina), foi preparado um meio de reação contendo tampão glicerina, xantina e luminol. Após foram misturados 560 uL de meio de reação, 10 uL da formulação diluída, 100 uL de xantina oxidase e lido em fluorímetro.

#### *Ensaio de viabilidade celular:*

Células L929 foram cultivadas em placa de 96 poços, em uma concentração de 2,5×10<sup>5</sup>/100 µL, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após, as células foram tratadas com gel e emulgel contendo ou não curcumina (100 – 1,56 mg/mL) e curcumina sozinha (25 -1,56 µg/mL) e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após, as células foram lavadas com PBS e adicionado o marcador vermelho neutro, que é incorporado por células viáveis, incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois foi feita a fixação e solubilização do marcador e lido em espectrofotômetro em 540 nM.

#### *Ensaio de viabilidade celular associado ao UVB:*

Células L929 foram cultivadas em placa de 24 poços, em uma concentração de 2,5×10<sup>5</sup>/500 µL. Após 24 horas as células foram tratadas com gel e emulgel contendo ou não curcumina (20 e 10 µg/mL de curcumina) e curcumina sozinha (20 e 10 µg/mL), mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Após, as células foram lavadas com PBS e adicionado 250 uL de meio HBSS (Hank's buffered salt solution) e então expostas à irradiação utilizando-se caixa de irradiação equipada com uma lâmpada UVB (TL 40W/12RS PHIPLIPS ®) em uma intensidade de 500 mJ/cm<sup>2</sup>. Após a irradiação o HBSS foi substituído por DMEM, e as células incubadas por 24 horas, seguindo da adição do marcador Vermelho Neutro, incubadas por mais 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Então o marcador foi fixado e solubilizado, e a placa foi lida em espectrofotômetro em 540 nM.

## **Resultados e Discussão**

Quanto a atividade antioxidante em sistema livre de células, os ensaios de DPPH, ABTS, FRAP e Xantina mostraram que as formulações contendo curcumina deve-se apenas a ela, já que as formulações sem esse composto

não apresentaram nenhuma atividade antioxidante. No entanto, observamos que a atividade antioxidante da curcumina na formulação diminuiu quando comparado com a curcumina sozinha.

Tabela 1. Atividade antioxidante de um gel e um emulgel contendo curcumina em sistemas livres de células. Quercetina foi usado como controle

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE				
COMPOSTO	ABTS <sup>•+</sup> (mmol TE/g)	DPPH <sup>•</sup> EC <sub>50</sub> (µg/mL) ± DP	FRAP (mmol TE/g)	Xantina Oxidase IC <sub>50</sub> (µg/mL) ±DP
Curcumina	7496,36±187,24	2,94±0,82	2381,98±16,27	0,19±0,03
Curcumina no gel	1087,74±68,35	4,96±0,2	223,4±20	2,8±0,24
Curcumina no emulgel	1562,50±169,98	4,74±0,34	429,67± 43	1,125±0,07
Gel	≅0	>10000	≅0	>15000
Emulgel	≅0	>10000	≅0	>15000
Quercetina	10894,60±1464,92	2,53±0,31	7389,94±135,59	0,11±0,02

Já a avaliação da viabilidade celular (Fig. 1) mostrou que tanto as formulações contendo ou não curcumina, e a curcumina sozinha não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas para as células L929.

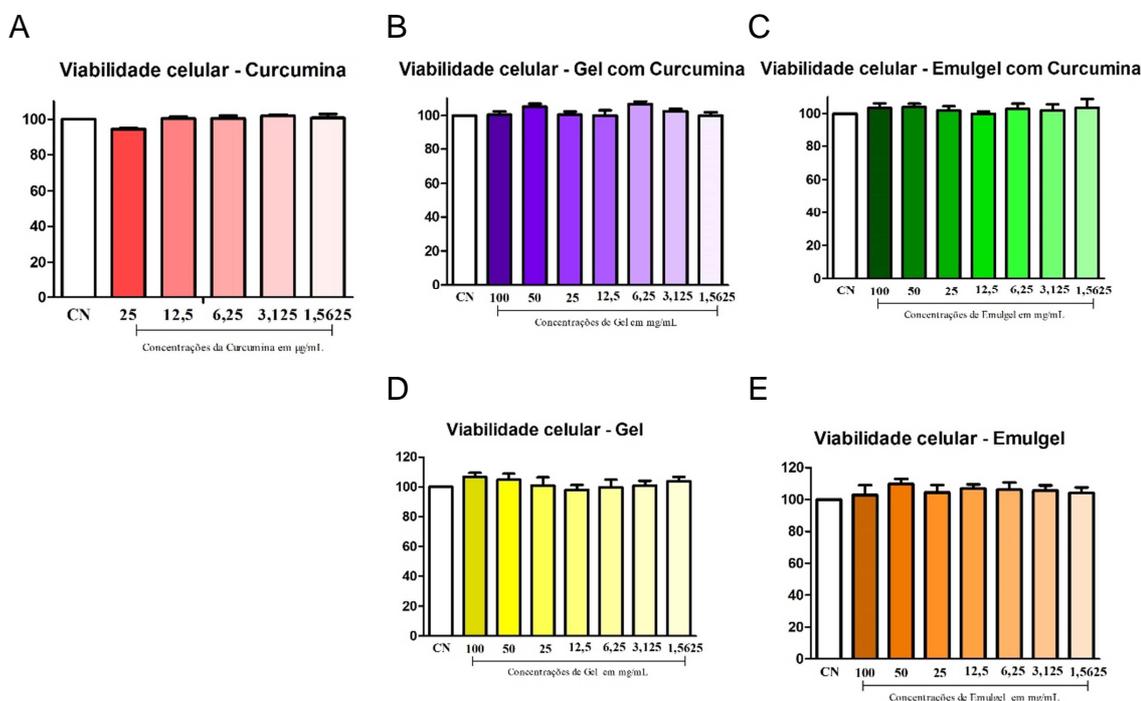


Figura 1- Viabilidade celular de células tratadas por 24 horas com curcumina (A), gel contendo curcumina (B), emulgel contendo curcumina (C), gel (D) e emulgel (E).

A avaliação da viabilidade celular associada a radiação UVB (Fig. 2), mostra que tanto o gel quanto o emulgel, conseguiram amenizar a fototoxicidade da curcumina livre. Em relação a concentração de 10 µg/mL, a curcumina no gel apresentou efeito fotoprotetor significativo.

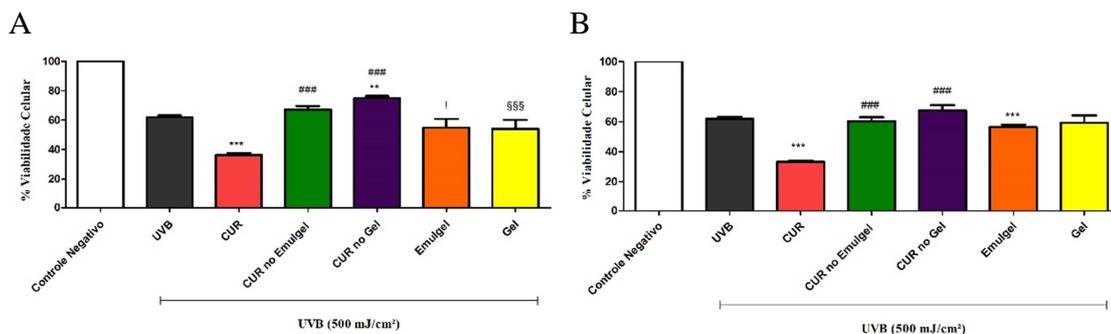


Figura 2- Efeito do tratamento do gel e emulgel contendo (A) 10 e (B) 20 µg/mL de curcumina, em comparação a curcumina livre (A) 10 e (B) 20 µg/mL na viabilidade das células L-929 irradiadas com 500 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB. Controle negativo – células sem tratamento e sem irradiação, UVB – células sem tratamento e irradiadas, CUR – curcumina. \*\*\*p<0.001 e \*\*p<0.01 diferença significativa em relação ao UVB, ####p<0.001 diferença significativa em relação a CUR, |p<0,05 diferença significativa em relação a CUR no Emulgel, §§§p<0,001 diferença significativa em relação a CUR no Gel.

## Conclusões

Nossos resultados mostram que as formulações gel e emulgel contendo curcumina conseguiram amenizar os efeitos fototóxicos da curcumina.

## Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e Bolsa de iniciação científica.

## Referências

KASOTE, Deepak M. et al. **Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications**. International Journal Of Biological Sciences, [s.l.], v. 11, n. 8, p.982-991, 2015. Ivyspring International Publisher.

Trautinger F (2001) **Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing**. Clin Exp Dermatol 26:573–577.

Cavinato M, Jansen-Du"rr P (2017) **Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin**. Exp Gerontol.

Dahll, T. A.; Bilski, P.; Reszka, K. J.; Chignell, C. F. **Photocytotoxicity of curcumin**. 835 Photochemistry and photobiology 1994, 59, 290-294. MAHMOOD, Kashif et al. **Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review**. International Journal of Biological Macromolecules, [s.l.], v. 81, p.877-890, nov. 2015. Elsevier BV.