

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FOTOQUIMIOPROTETORA DO ÁCIDO CAFEICO E DE SEU DERIVADO EM CÉLULAS L-929 EXPOSTAS À RADIAÇÃO UVB

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

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Fotoproteção, Antioxidante, Radiação UVB.

Resumo:

O excesso de exposição à radiação ultravioleta (UV) causa inúmeros danos à pele, como envelhecimento precoce e câncer de pele, principalmente devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, compostos antioxidantes, possuem potencial de retardar ou mesmo neutralizar essas EROs, sendo um exemplo destes, o ácido cafeico e seus derivados. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi esclarecer e evidenciar a atividade antioxidante do ácido cafeico e de seu derivado contendo ftalimida, por meio de um sistema livre células e investigar sua ação fotoquimioprotetora em fibroblastos da pele de murino (L-929) expostos à radiação UVB. Os resultados desse estudo mostraram que tanto o ácido cafeico quanto seu derivado contendo ftalimida possuem atividade antioxidante. Além disso, nenhum deles foi citotóxico aos fibroblastos e ambos inibiram a geração de espécies reativas de oxigênio de forma significativa em L929 irradiadas com UVB.

Introdução

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, a qual é dividida em camadas que se caracterizam como um tecido de sustentação, e como uma barreira de resistência a estresses ambientais, como, a radiação ultravioleta (UV) (D'ORAZIO et al., 2013). Os raios UV podem causar patologias, como o câncer de pele, através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Entretanto, formulações fotoquimioprotetoras que contenham substâncias antioxidantes atenuam os efeitos da radiação UV, pois, as mesmas neutralizam ou sequestram as EROs. Sendo um exemplo destes compostos o ácido cafeico (AC) (SOARES, 2002). Estudos apontam que um composto derivado deste ácido, contendo ftalimida, possua provavelmente excelentes características relacionadas aos compostos antioxidantes (SHARMA et al., 2010). Isto posto, é de extrema importância a investigação das potenciais propriedades ativas de ambas as substâncias, a fim de que

possam ser agregadas a produtos inovadores, como as formulações fotoquimioprotetoras.

Materiais e métodos

Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Ensaio de DPPH

Experimento colorimétrico, no qual o radical (cor púrpura) sofre redução (cor amarela) na presença de compostos antioxidantes, diminuindo sua intensidade de absorção.

Análise do Sequestro do Radical Livre ABTS^{•+}

Neste ensaio, a capacidade antioxidante é medida de acordo com a reação do composto com o radical ABTS^{•+}.

Avaliação da Atividade Antioxidante usando o Sistema Xantina/XOD/Luminol

Esse experimento é resultante da análise da intensidade de luz emitida pela oxidação do luminol, a partir da presença de ânion superóxido. Compostos antioxidante inibem a oxidação do luminol alterando a intensidade de luz emitida comparado ao controle.

Cultura e Manutenção das Células L-929

Para a realização dos experimentos, foram utilizados fibroblastos de murino L-929 mantidos em meio DMEM suplementado.

Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método de Vermelho Neutro

Esse experimento tem por finalidade avaliar se ácido cafeico e o seu derivado contendo ftalimida são tóxicos para as células L-929, utilizando como marcador o vermelho neutro.

Efeito de AC e DF em Células L-929 Submetidas à Radiação UVB

Esta metodologia avalia se o ácido cafeico e o seu derivado contendo ftalimida protegem as células L-929 da radiação UVB.

Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) Totais

Este processo avalia a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células tratadas com o ácido cafeico e o seu derivado contendo ftalimida expostas à radiação UVB utilizando o marcador H₂DCFDA.

Análise Estatística

Os dados encontrados foram apresentados a partir de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Os mesmos foram analisados por meio do teste ANOVA (one-way), e em sequência pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando $p < 0,05$ significativo. Por fim, a análise estatística foi efetuada pelo software Prism5.0

Resultados e Discussão

A partir dos resultados dos experimentos que avaliavam a ação antioxidante dos compostos, pode-se inferir que tanto o ácido cafeico quanto o seu derivado contendo ftalimida possuem atividade antioxidante significativa em ambos os métodos. Estudos anteriores afirmam que valores de EC₅₀ abaixo de 50 são considerados bons para este método.

Tabela 1. Atividade antioxidante do ácido cafeico e de seu derivado contendo ftalimida em sistemas livres de células. Sendo, a quercetina usada como controle.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE			
SUBSTÂNCIA	DPPH• EC ₅₀ (µg/mL) ± DP	ABTS•+ mmol TE/g	Xantina Oxidase IC ₅₀ (ug/mL) ± DP
Quercetina	10,3688 ± 0,87	3,624 ± 0,99	0,3867 ± 0,06
Ácido Cafeico	17,126 ± 1,18	1,267 ± 0,5	0,45 ± 0,05
Ácido Cafeico + Ftalimida	19,3803 ± 2,00	0,818 ± 0,12	0,2733 ± 0,04

Já a avaliação da viabilidade celular (Fig 1) mostrou que ambos os compostos testados não foram citotóxicos para as células L929 em nenhuma das concentrações abordadas.

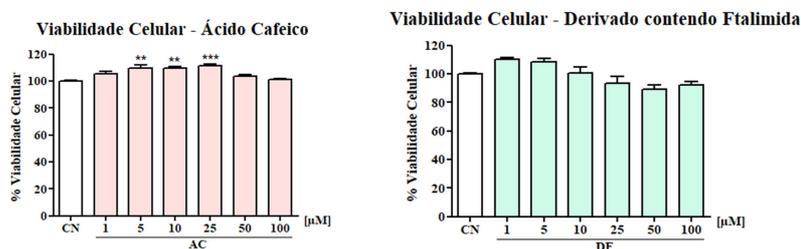


Figura 1- Viabilidade das células L-929 tratadas por 24 horas com ácido cafeico (AC) (A) e com seu derivado contendo Ftalimida (DF) (B). CN – células sem tratamento. AC – Ácido Cafeico. DF – Derivado do Ácido Cafeico contendo Ftalimida. **p < 0.01, ***p < 0.001, significativamente diferente comparado a CN.

A avaliação da viabilidade celular associada à exposição das células à radiação UVB (Fig. 2) mostra que a presença dos compostos diminuiu significativamente a citotoxicidade promovida pela radiação, quando comparados ao controle UVB. Tendo como destaque a menor concentração testada (1µM) com o derivado contendo ftalimida.

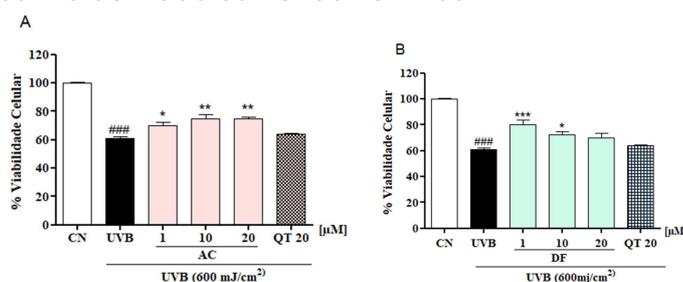


Figura 2 A e B– Viabilidade das células L-929 expostas à 600 mJ/cm² de radiação UVB e tratadas por 24 horas com ácido cafeico (AC) (A) e com seu derivado contendo Ftalimida (DF) (B). CN – células sem tratamento e sem irradiação. UVB – Células sem tratamento e irradiadas. AC – Ácido Cafeico. QT – Quercetina. DF – Derivado do Ácido Cafeico contendo Ftalimida. ###p < 0.001 significativamente diferente comparado a NC. *p < 0.1, **p < 0.01, ***p < 0.001, significativamente diferente comparado a UVB.

Os resultados preliminares da determinação de espécies reativas de oxigênio – EROs totais possibilitam afirmar que ambos os compostos estudados inibiram a geração de ERO causada pela ação da radiação UVB sobre as células L-929. Mais experimentos serão realizados, para confirmem esses resultados.

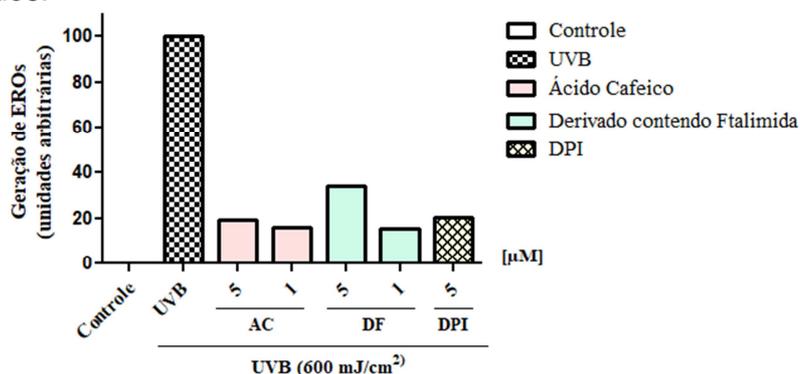


Figura 3 – Efeito do ácido cafeico (AC) 5 e 1 μM (A) e de seu derivado contendo Ftalimida (DF), 5 e 1 μM (B), na produção de espécies reativas de oxigênio em células L-929 irradiadas com 600mJ/cm² de UVB. Controle negativo – células sem tratamento e sem irradiação, UVB – células sem tratamento e irradiadas, DPI (5μM) controle positivo.

Conclusões

A partir deste estudo concluímos que tanto o ácido cafeico quanto seu derivado contendo ftalimida, apresentam potencial antioxidante, não são citotóxicos às células L-929, protegem as mesmas quando expostas à radiação UVB e além disso, inibem a geração de espécies reativas de oxigênio. Assim o ácido cafeico e seu derivado contendo ftalimida apresentam, potencial fotoquimioprotetor.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e pela Bolsa de iniciação científica.

Referências

- D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.
- SHARMA, U. et al. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 678–704, 2010.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.