

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOQUIMIOPROTETORA DO ÁCIDO CAFEICO E DE UM DE SEUS DERIVADOS CONTENDO FTALIMIDA EM CÉLULAS L-929 EXPOSTAS À RADIAÇÃO UV-B.

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

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

### Farmácia/Farmacognosia

**Palavras-chave:** Antioxidante, Fotoproteção, Radiação UV.

### Resumo:

A Radiação Ultravioleta (UV) causa danos graves à pele dos seres humanos, principalmente quando estes são expostos a ela de maneira excessiva e sem proteção. Essa exposição pode causar entre outros danos, o melanoma e o envelhecimento precoce. Essas complicações clínicas, podem ser causadas pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso, que são responsáveis pelo estresse oxidativo nas células, que levam a alterações celulares até mesmo em seu material genético. Apesar de o organismo humano produzir antioxidantes eles não são suficientes para combater as EROs geradas pela exposição exacerbada aos raios UV, sendo então necessárias ações externas. Tais danos podem ser evitados a partir do uso de formulações fotoquimioprotetoras que contenham agentes antioxidantes, a fim de manter um equilíbrio na concentração de EROs. Essas substâncias antioxidantes geralmente fazem parte de grupos fenólicos, dentre os quais estão presentes o ácido cafeico e a ftalimida. Desta forma, esse estudo teve por finalidade analisar os mecanismos de ação antioxidante do ácido cafeico e de um derivado do mesmo contendo ftalimida, através de experimentos com fibroblastos da pele de murinho (L-929) expostos à Radiação Ultravioleta B (UVB). Dentre os resultados encontrados foi observado que o derivado do ácido cafeico contendo ftalimida na concentração de 1µM teve o melhor desempenho na avaliação do potencial de membrana mitocondrial quando comparado ao restante dos compostos analisados.

### Introdução

Diariamente o ser humano é exposto à radiação ultravioleta (UV) ao longo do desempenho de suas atividades cotidianas, sendo que, quando isso ocorre de forma excessiva, à mesma pode ser prejudicial à saúde e estética do indivíduo (TURNER; PARISI, 2018), podendo causar eritema (queimaduras), envelhecimento precoce, melanoma, ou mesmo alteração no DNA celular (D'ORAZIO et al., 2013).

Esse excesso de exposição à radiação gera estresse oxidativo nas células, ou seja, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são responsáveis pelos danos anteriormente citados. Substâncias chamadas de antioxidantes possuem a capacidade de retardar ou mesmo neutralizar essas EROs (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Desta forma, compostos como o Ácido Cafeico e

a Ftalimida vêm sendo amplamente estudados por apresentarem atividades anticarcinogênicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e especialmente antioxidantes (LAMIE et al., 2015). Sendo assim, é de extrema importância que sejam realizadas mais pesquisas abordando compostos contendo ácido cafeico e ftalimida em sua composição a fim de que caso comprovado sua eficácia os mesmos possam ser usados como agentes antioxidantes em formulações fotoquimioprotetoras. Logo, esse trabalho teve como objetivo analisar a atividade fotoquimioprotetora do ácido cafeico e de seu derivado contendo ftalimida nas células L-929 expostas à radiação UVB.

## **Materiais e Métodos**

### ***Manutenção e cultivo celular***

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

### ***Processo de plaqueamento e irradiação da cultura celular***

As células foram plaqueadas em placas de 96, 24 ou 6 poços de acordo com o experimento que seria realizado. Em seguida, foram mantidas em estufa por 24 horas. Logo após, foi adicionado a elas o tratamento com os compostos analisados em suas respectivas concentrações ao longo de 60 minutos. Após, as células foram expostas à radiação UVB e novamente mantidas em estufa por mais 24 horas e em sequência foram utilizadas na execução dos experimentos.

### ***Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial***

A análise foi realizada por meio da quantificação da fluorescência do fluorocromo TMRE (tetrametilrodamina), sendo este um marcador permeável à membrana mitocondrial ativa, por possuir uma carga negativa. No entanto, quando a membrana encontra-se despolarizada ocorre uma diminuição em seu potencial de membrana, conseqüentemente, o marcador torna-se impermeável. Deste modo, quanto menor a fluorescência, maior será a despolarização da membrana mitocondrial.

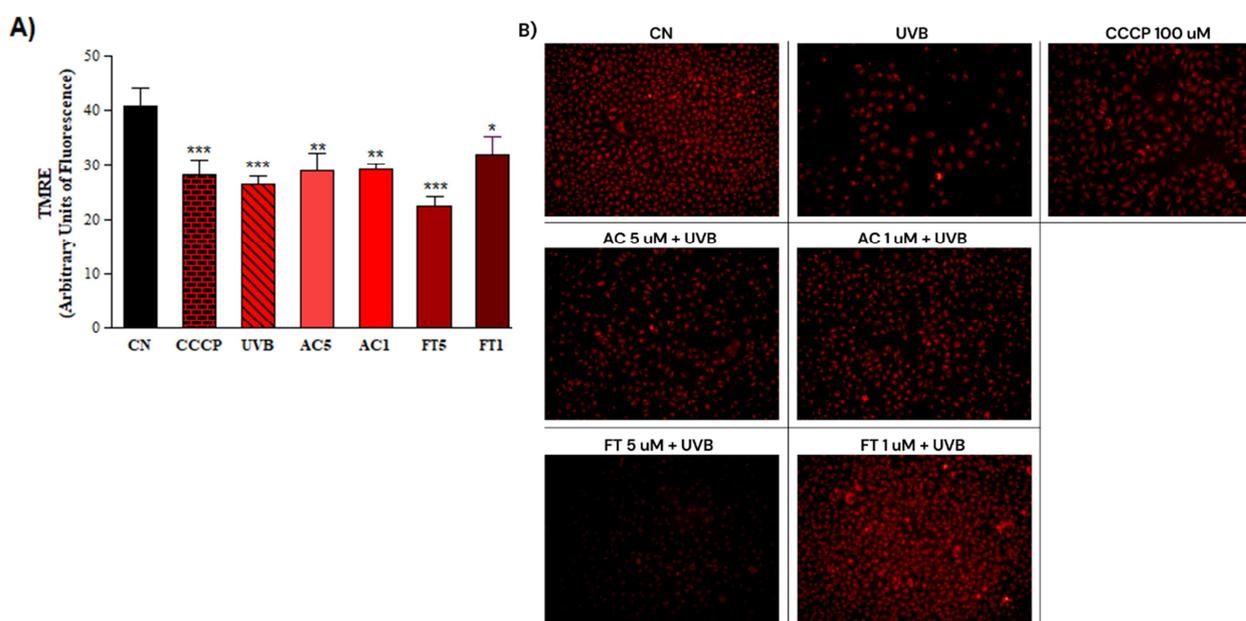
### ***Análise estatística***

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

## **Resultados e Discussão**

A partir dos resultados encontrados no experimento que avaliava o potencial da membrana mitocondrial foram construídos o gráfico e a imagem que compõem a figura 1. De acordo com os dados apresentados pode-se inferir que o TMRE no controle negativo (células não tratadas e não irradiadas) mostrou uma alta

intensidade de fluorescência, indicando células viáveis. Nas células submetidas a radiação UVB, a fluorescência do TMRE diminuiu significativamente comparado ao CN, devido à morte celular causada pela radiação. O mesmo foi observado para o controle CCCP. O tratamento com o derivado de ácido cafeico contendo ftalimida na concentração de 1uM (FT 1uM) teve um aumento na intensidade de fluorescência, porém não significativo, comparado as células submetidas a radiação UVB, o que não foi observado com a concentração de FT 5uM e nem com os grupos tratados com AC 5µM e AC 1uM. Esses resultados indicam uma provável ação fotoprotetora do ácido cafeico contendo ftalimida provavelmente devido a ação antioxidante desse composto já descrito na literatura (LAMIE et al., 2015).



**Figura 1** – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em fibroblastos L929 irradiados com UVB pré-tratados com AC e FT usando sonda TMRE. A) Análise qualitativa. CN: células não irradiadas e não tratadas. UVB: células irradiadas e não tratadas. CCCP: M-clorofenilhidrazona. AC: Ácido Cafeico. FT: Derivado do Ácido Cafeico contendo Ftalimida.

a) As células foram fotografadas por microscopia de fluorescência (ampliação 20x). As imagens são representativas de três experimentos independentes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparado com o controle.

## Conclusões

A partir dos resultados preliminares deste estudo o derivado do ácido cafeico contendo ftalimida na concentração de 1uM demonstrou ser uma alternativa para inibir os efeitos negativos da radiação UVB. Os resultados dos demais experimentos, Avaliação dos Níveis de GSH e Avaliação da Peroxidação Lipídica, que ainda estão sendo analisados possibilitarão uma conclusão mais clara sobre o efeito fotoprotetor do ácido cafeico contendo ftalimida.

## 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.
- HISSIN PJ, H. R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1967.
- LAMIE, P. F. et al. Design, synthesis and evaluation of novel phthalimide derivatives as in vitro anti-microbial, anti-oxidant and anti-inflammatory agents. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16620–16642, 2015.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 2009.
- TURNER, J.; PARISI, A. V. Ultraviolet radiation albedo and reflectance in review: The influence to ultraviolet exposure in occupational settings. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7, 2018.