

AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOQUIMIOPROTETOR DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO ÁCIDO CAFEICO-FTALIMIDA

Rayane Camilly De Freitas (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 da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Fotoquimioproteção; antioxidantes; fibroblastos.

RESUMO

A radiação ultravioleta (RUV) através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode induzir envelhecimento cutâneo e doenças da pele. O ácido cafeico é um polifenol com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo que sua forma derivada, o ácido cafeico-ftalimida, aumenta o potencial antioxidante. O uso de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido cafeico-ftalimida (NLS-CF) é uma estratégia para aumentar a estabilidade e penetração na pele, com efeitos fotoprotetores. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito antioxidante e fotoquimioprotetor de NLS-CF em fibroblastos L-929 irradiados com UVB. Nossos resultados mostraram que as SLN-CF possuem um potencial antioxidante significativo, não são citotóxicas para fibroblastos L-929 e diminuem o dano oxidativo induzido por UVB em fibroblastos L-929.

INTRODUÇÃO

A exposição contínua à RUV causa desequilíbrio no estado redox celular, resultando em estresse oxidativo, dando início do fotodano da pele. Este processo contribui para o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (SUBEDI, L. *et al.* 2017). Um dos mecanismos pelos quais a RUV danifica a pele é a intensa geração de EROs e a incapacidade dos mecanismos antioxidantes endógenos de neutralizá-las (DARÉ R. G. *et al.*, 2023). O ácido cafeico (CA), um metabólito do hidroxycinamato e fenilpropanóide, é um antioxidante eficaz, com uma estrutura que atua neutralizando radicais livres, combinando um núcleo aromático com uma cadeia lateral conjugada (Ekeuku SO *et al.*, 2021). Além disso, a fração ftalimida, presente em várias moléculas com potencial farmacológico, oferece benefícios significativos, incluindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e imunomoduladoras (SANTOS, W. H. DOS *et al.*, 2021). Visto isso, nosso objetivo foi avaliar o efeito fotoquimioprotetor de NLS-CF em fibroblastos L-929 irradiados com UVB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Avaliação da eliminação de radicais DPPH• e da capacidade sequestradora do radical ânion superóxido pelo sistema xantina/ luminol/ xantina oxidase (XO)

O ensaio de eliminação de DPPH• é baseado na captura de DPPH• por meio de transferência de elétrons que produz uma solução violeta, levando a uma redução na absorbância em 517 nm

O método XO determina a atividade de eliminação de radicais ânion superóxido (O₂•-) usando quimioluminescência.

A concentração que causou 50% de inibição do sistema foi relatada como EC50.

Manutenção da cultura celular

Os ensaios *in vitro* utilizaram a linhagem celular de fibroblastos murino L929 (ATCC CCL1™, Manassas, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% de uma combinação de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

Processo de plaqueamento

As células L-929 foram plaqueadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 96 poços ou 24 poços, dependendo do experimento, com meio DMEM suplementadas e incubadas em estufa a estufa de CO₂ por 24h.

Irradiação da cultura celular

A irradiação ultravioleta foi aplicada em caixa de irradiação equipada com duas lâmpadas de UVB. A intensidade de radiação foi medida por radiômetro UV (Vilber Lourmat®, VLX-3W) até uma dose de 600 mJ/cm². Para o procedimento de irradiação, o meio foi substituído por tampão HBSS (Hank's buffered salt solution).

Citotoxicidade celular pelo método vermelho neutro

O ensaio vermelho neutro emprega um corante catiônico conhecido como cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, corando seletivamente os lisossomos em células viáveis. As medições foram realizadas usando um espectrofotômetro (Bio-Tek®, Power Wave XS) em um comprimento de onda de 540 nm.

Avaliação da produção de ERO totais

O método baseia-se na conversão do marcador H₂DCF-DA não fluorescente em DCF fluorescente, na presença de ERO.

Análise estatística

Os resultados foram calculados a partir da média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi efetuada pelo software Prism 5.0, através do teste ANOVA (one-way) e teste de comparações de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios DPPH• e XO estão apresentados na Tabela 1. As duas formulações de NLS-CF demonstraram potencial antioxidante em ambas as metodologias avaliadas. Quercetina (QT), usada como controle, exibiu valores de EC₅₀ de 2,49 µM e 0,38 µM, respectivamente.

Tabela 1. Avaliação do potencial antioxidante das SLN_CF (90:10 e 85:15) através das metodologias de DPPH e Xantina Oxidase (XOD).

Amostras	DPPH•	XO
	EC ₅₀ (µg/mL)	
NLS-CF 90:10	5,71 ± 0,37	4,20 ± 0,63
NLS-CF 85:15	5,93 ± 0,47	3,57 ± 0,35
QT	2,49 ± 0,04	0,36 ± 0,04

Dados experimentais: média ± desvio padrão, n=3. EC₅₀ = concentração de eficiência em 50%.

A inibição do radical DPPH pelas NLS-CF, em ambas as formulações, foi dose-dependente demonstrando que quanto maior a concentração dos compostos, maior é a porcentagem de inibição radicalar (Figura 1A e 1B).

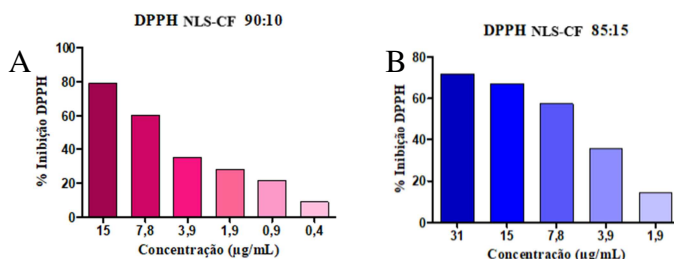


Figura 1. Avaliação da inibição do radical DPPH pela NLS-CF 90:10 (2.5%) (A) e 85:15 (5.0%) (B).

A Figura 2A mostra que as formulações foram significativamente tóxicas apenas na concentração de 25 µg/mL, diminuindo a viabilidade celular em aproximadamente 28% e 33%, respectivamente (Fig. 2A).

A Figura 2B mostra que os fibroblastos irradiados com UVB apresentaram uma diminuição de 55% na viabilidade em comparação com o controle negativo (CN). No entanto, o tratamento com SLN-CF em ambas as formulações restaurou a viabilidade celular em cerca de 25%.

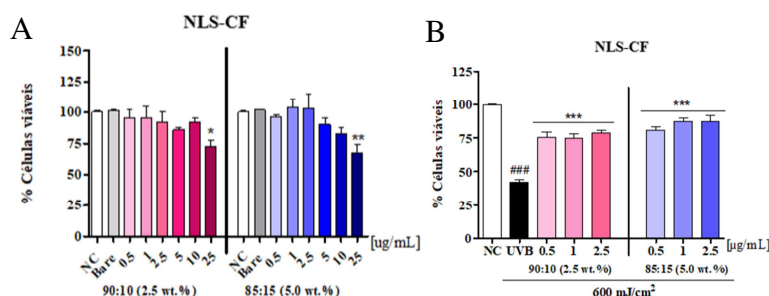


Figura 2. (A) Avaliação da citotoxicidade de NLS-CF em fibroblastos L-929 e (B) efeito na viabilidade celular em fibroblastos L-929 tratados e irradiados com UVB. CN: controle negativo; células não tratadas e não irradiadas. UVB: células não tratadas e irradiadas com UVB (600 mJ/cm²). 90:10: células tratadas com SLN-CF 90:10. 85:15: células tratadas com SLN-CF 85:15. ### p < 0,0001 diferença significativa em relação a NC. *** p < 0,0001 diferença significativa em relação a UVB.

A Figura 3 mostra que os fibroblastos irradiados com UVB apresentaram um aumento na intensidade da fluorescência, indicativo de aumento de produção de

ERO, em comparação ao controle negativo (CN). O tratamento com SLN-CF em ambas as formulações reduziu a produção de ERO significativamente em comparação ao grupo UVB.

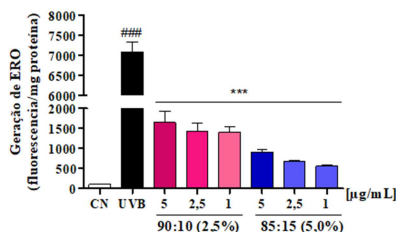


Figura 3. Avaliação da produção de ERO em fibroblastos L-929 tratados por 1 h com NLS-CF e irradiados com UVB. As células foram incubadas com H₂DCF-DA (5 µM) 24 h após a irradiação. A leitura foi feita em espectrofluorímetro. CN: controle negativo; células não tratadas e não irradiadas. UVB: células não tratadas e irradiadas com UVB (600 mJ/cm²). 90:10: células tratadas com SLN-CF 90:10. 85:15: células tratadas com SLN-CF 85:15. ### p < 0,0001 diferença significativa em relação a NC. *** p < 0,0001 diferença significativa em relação a UVB

CONCLUSÕES

NLS-CF em ambas as formulações exibiu potencial antioxidante e fotoprotetor. Esses resultados devem-se a capacidade de eliminar os radicais DPPH• e O₂• e ainda diminuir a produção de ERO em fibroblastos L-929 irradiados com UVB.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

DARÉ R. G. *et al.* Cerium Oxide Nanoparticles Conjugated with Tannic Acid Prevent UVB-Induced Oxidative Stress in Fibroblasts: Evidence of a Promising Anti-Photodamage Agent. *Antioxidants*. 12;12(1):190, Jan 2023. Disponível em: doi: 10.3390/antiox12010190

Ekeuku SO, Pang KL, Chin KY. Effects of Caffeic Acid and Its Derivatives on Bone: A Systematic Review. *Drug Des Devel Ther*. 15:259-275, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S287280>.

SANTOS, W. H. DOS *et al.* Development of a caffeic acid-phthalimide hybrid compound for NADPH oxidase inhibition. *RSC Advances*, v. 11, n. 29, p. 17880–17890, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D1RA01066B>.

SUBEDI, L. *et al.* Resveratrol-Enriched Rice Attenuates UVB-ROS-Induced Skin Aging via Downregulation of Inflammatory Cascades. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–15, 2017.