

Isabel Filipa Martins de Almeida

Desenvolvimento de um sistema semi-sólido contendo fitocompostos captadores de espécies reactivas

Tese de candidatura à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia Farmacêutica
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação de:

Orientador: Professora Doutora Maria Fernanda Coelho Guedes Bahia

Co-orientador: Professor Doutor Paulo Jorge Cardoso da Costa



Junho, 2009

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação
mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete

À memória do meu avô
Manoel António, sempre orgulhoso da sua
neta

Profundamente grata pelos contributos de todos quantos, directa ou indirectamente, tornaram possível a conclusão deste doutoramento, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Maria Fernanda Bahia, minha orientadora e minha professora, cuja profunda experiência e saber muito valorizaram esta tese, muito reconhecida pela confiança e amizade com que me honrou, pelo inestimável empenho no sucesso deste trabalho e cuidadosa supervisão científica.

Ao Professor Doutor Paulo Cardoso da Costa, co-orientador desta tese, muito reconhecida pela cuidadosa supervisão científica, pela empenhada e total disponibilidade e pelo valioso contributo para a minha formação científica. Agradeço também a preciosa ajuda na elaboração de material gráfico.

Ao Professor Doutor José Manuel Sousa Lobo, exemplo de capacidade pedagógica e científica, pelo contributo, enquanto Presidente do Conselho Directivo da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, para o sucesso desta tese.

Ao Professor Doutor José Luís Costa Lima, pela possibilidade de ter efectuado parte do trabalho experimental desta tese no laboratório do Serviço de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. À Professora Doutora Eduarda Fernandes pelo entusiasmado empenho com que acolheu este trabalho, pela revisão crítica de parte desta tese e pela amizade que me dedicou. Ao Doutor David Costa por todo o apoio na execução dos ensaios de avaliação do efeito captador de espécies reactivas.

Às Professoras Doutoras Maria Rosa Seabra, Paula Branquinho Andrade e Patrícia Valentão do Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela prestimosa colaboração na identificação dos compostos fenólicos dos extractos de plantas estudados.

À Professora Doutora Madalena Pinto e à Professora Doutora Honorina Cidade do Serviço de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo apoio nos primeiros passos na área dos ensaios de actividade biológica. À Professora Doutora Fátima Cerqueira pela transmissão de conhecimentos relativos à avaliação da actividade antioxidante.

Aos colaboradores do Serviço de Tecnologia Farmacêutica, Professores Doutores Domingos Ferreira, Maurício Barbosa, Delfim Santos, Paulo Lobão, Maria Helena Amaral e Dra. Rosa Pena Ferreira pelo apoio incondicional, pelo caloroso estímulo e total disponibilidade para participar nos estudos *in vivo*, e em particular ao Mestre José Paulo Sousa e Silva, pelo companheirismo neste percurso. À Professora Doutora Maria Helena Amaral os meus sinceros agradecimentos pelo incansável apoio nos ensaios realizados *in vivo*. Agradeço também à Dra. Rosa Pena Ferreira a colheita de folhas de carvalho.

Aos funcionários do Serviço de Tecnologia Farmacêutica, D. Adelina Fiel Resende, Sr. Basílio Costa. Sr. Joaquim Ribeiro, D. Maria da Conceição Pereira e Joel Fonseca por todo o apoio técnico, sempre solícito.

Ao Dr. José Madureira pela colheita de folhas de sete espécies vegetais estudadas nesta tese.

À Dra. Teresa Pereira do Serviço de Dermatologia e Venereologia do Hospital de S. Marcos pela empenhada colaboração na avaliação clínica dos voluntários.

A todos os que se voluntariaram para os ensaios *in vivo* pela total e empenhada disponibilidade.

Aos Laboratórios Bial, nas pessoas do Dr. Luís Sintra e da Dra. Paula Teixeira, pelas facilidades concedidas para a realização dos testes de fotoestabilidade e em particular ao Doutor Rui Cerdeira e à Eng.^a Lúgia Castro pelo apoio na execução dos testes.

À Professora Doutora Olga Nunes da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pelas facilidades concedidas para o uso do liofilizador e à Eng.^a Luísa Barreiros pelo apoio técnico na execução da liofilização.

Aos Professores Doutores Paulo Silva e Jorge Garrido do Instituto Superior de Engenharia do Porto pela execução dos ensaios de calorimetria diferencial de varrimento e de avaliação do potencial redox, e pela disponibilidade para estimulantes discussões científicas.

À Prof. Doutora Nazaré Pestana do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela realização do ensaio de avaliação da qualidade microbiológica.

À Jitka Maleckova e à Raquel Saffi pelo dedicado apoio na execução de alguns ensaios na parte experimental desta tese.

À Mestre Marta Ferreira pelo apoio no desenvolvimento das metodologias de avaliação do potencial irritante cutâneo e de avaliação do efeito captador do radical DPPH em amostras aquosas.

Aos meus colegas e amigos Maribel Teixeira, Nuno Milhazes, Carlos Gonçalves e Maria Emília Sousa, interlocutores de muitas incertezas e apaziguadores de inúmeros anseios, e Ana Teixeira, Edite Cunha, Cristina Couto, Madalena Pedro pelo incansável apoio e permanente e afectuoso incentivo.

À minha família e amigos pelos gestos, olhares e palavras de incentivo nos momentos de desânimo, de compreensão nos momentos de ausência e de orgulho nos momentos de sucesso. A todos a minha gratidão por estarem presentes em todos os momentos.

A presente tese inclui resultados que foram parcialmente usados nas seguintes publicações e comunicações (artigo 8º do Decreto-Lei 388/70, de 18 de Agosto):

Publicações

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. Food Chem 2008; 106: 1014-20.

Almeida IF, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Pereira TM, Amaral MH, Costa PC, Bahia MF. In vivo skin irritation potential of a *Castanea sativa* (chestnut) leaf extract, a putative natural antioxidant for topical application. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008; 103(5): 461-7.

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. J Photochem Photobiol B Biol 2008; 91 (2-3): 87-95.

Almeida IF, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Costa PC, Bahia MF. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. J Med Food 2009; 12: 175-83.

Almeida IF, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Pereira TM, Amaral MH, Costa PC, Bahia MF. Oak leaf extract as topical antioxidant: free radical scavenging and iron chelating activities and *in vivo* skin irritation potential. Biofactors 2009 *in press*

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. *In vitro* protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against oxygen and nitrogen reactive species. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2009 *in press*

Comunicações

Almeida IF, Valentão P, Seabra RM, Cidade HM, Pinto MMM, Bahia MF. Eucalyptus leaves extracts: phenolic composition, antioxidant activity and potential use in photoaging. XXI International Conference on Polyphenols, 26 – 28 de Agosto, 2004; Helsínquia, Finlândia. (comunicação em painel)

Almeida IF, Costa PC, Bahia MF. Optimization of the extraction of polyphenols from eucalyptus leaves. 2nd Congress of the Portuguese Society of Pharmaceutical Sciences; 6th Congress of the Portuguese-Spanish chapter of the Controlled Release Society, 31 de Março – 2 de Abril, 2005; Coimbra, Portugal. (comunicação em painel)

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Correlation among antioxidant effects and total phenolic content of plant extracts. 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress, 22 – 25 de Abril, 2007; Amesterdão, Holanda. (comunicação em painel)

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Protective effect of Eucalyptus globulus, Juglans regia and Hypericum androsaemum leaf extracts against reactive nitrogen species (RNS) and superoxide anion. European Meeting of the Society for Free Radical Research Europe 2007, 10 –13 de Outubro, 2007; Vilamoura, Portugal. (comunicação em painel)

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Amaral MH, Costa PC, Bahia MF. Fighting photoageing with botanicals: Antioxidant activity and skin irritation potential of a *Quercus robur* leaf extract. LINK-AGE Meeting, 28 de Novembro – 1 de Dezembro, 2007; Porto, Portugal. (comunicação em painel)

Almeida IF, Maleckova J, Costa PC, Bahia MF. Influence of pH and Carbopol concentration on the textural properties of hydroglyceric gels. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 6 – 7 de Abril, 2008; Barcelona, Espanha. (comunicação em painel)

Almeida IF, Abreu B, Morais L, Costa PC, Bahia MF. Evaluation of plants from the portuguese flora as putative topical antioxidants. 9th Annual Meeting of Skin Forum, 25 – 27 de Junho, 2008; Londres, Reino Unido. (comunicação em painel)

Almeida IF, Ferreira MO, Costa PC, Bahia MF. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of a semisolid formulation incorporating a plant extract. 9th Annual Meeting of Skin Forum, 25 – 27 de Junho, 2008; Londres, Reino Unido. (comunicação em painel)

Almeida IF, Costa PC, Bahia MF. Optimization of a semisolid formulation incorporating a plant extract using response surface methodology. 25th IFSCC Congress, 6 – 9 de Outubro 2008; Barcelona, Espanha. (comunicação em painel)

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Costa PC, Bahia MF. Protective effect of *Hypericum androsaemum* extract against reactive oxygen species. 1st National Meeting on Medicinal Chemistry, 13 – 15 de Novembro, 2008; Porto, Portugal. (comunicação em painel)

Almeida IF, Saffi RG, Amaral MH, Costa PC, Bahia MF. Evaluation of the moisturizing effect of a quasigel cream incorporating a plant extract. II Congresso Nacional de Ciências Dermatocósméticas, 27 de Março, 2009; Lisboa, Portugal. (comunicação em painel)

Almeida IF, Costa PC, Bahia MF. Evaluation of the photostability of a *Castanea sativa* leaf extract, a putative topical antioxidant. II Congresso Nacional de Ciências Dermatocósméticas, 27 de Março, 2009; Lisboa, Portugal. (comunicação em painel)

Resumo

O fotoenvelhecimento, as dermatoses e o cancro da pele são alguns dos efeitos associados à geração de espécies reactivas no tecido cutâneo. A exposição à radiação solar é um dos mais importantes factores que conduz ao stress oxidativo cutâneo, com repercussões nos parâmetros bioquímicos, funcionais e estruturais da pele. O uso de protectores solares constitui a mais relevante estratégia de prevenção dos efeitos agressivos da exposição ao sol. No entanto, vários protectores podem sofrer fotodegradação e conduzem eles próprios à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), resultando numa prevenção ineficaz do stress oxidativo cutâneo. Deste modo, o uso de antioxidantes administrados por via cutânea ou oral prefigura-se como uma possível estratégia de minimização da formação de ROS e de RNS induzida pela exposição solar.

Os objectivos da presente tese foram a obtenção e optimização de extractos vegetais (a partir de plantas da flora portuguesa) com actividade antioxidante, bem como o desenvolvimento galénico e caracterização de uma preparação de aplicação cutânea que constitua uma base adequada à incorporação do extracto seleccionado.

A flora portuguesa compreende inúmeras espécies vegetais em cuja composição foram identificados diferentes compostos fenólicos, amplamente reconhecidos como antioxidantes. No presente trabalho, foram seleccionadas nove plantas, maioritariamente árvores de fruto (*Juglans regia*, *Eucalyptus globulus*, *Castanea sativa*, *Quercus robur*, *Olea europaea*, *Ficus carica*, *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Hypericum androsaemum*), com vista à obtenção de extractos com actividade antioxidante. O método extractivo foi optimizado no que respeita ao solvente (sendo utilizados solventes de baixa toxicidade cutânea) e tempo de extracção, número de etapas extractivas e temperatura. Foi estabelecido um método extractivo comum conduzido a 40 °C que consistiu em cinco etapas, cada uma com a duração de 10 min. Os extractos que exibiram maior actividade antioxidante (IC_{50} no ensaio de avaliação do efeito captador do radical DPPH inferior a 50 µg/ml) e teores de compostos fenólicos mais elevados (superiores a 150 EAG mg/g de liofilizado, avaliados com o método de Folin Ciocalteu) foram os extractos hidroalcoólicos de *J. regia* (EtOH 40°), *C. sativa* (EtOH 70°), *Q. robur* (EtOH 40°) e *H. androsaemum* (EtOH 40°) e o extracto aquoso de *E. globulus*. A caracterização da actividade antioxidante foi efectuada com o estudo do efeito captador de diferentes ROS e RNS associadas ao stress oxidativo cutâneo, nomeadamente as espécies $HO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $^1O_2$, $ROO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$ e $ONOO^{\bullet}$. Os extractos de *C. sativa* e *Q. robur* exibiram actividade captadora para a totalidade das espécies reactivas estudadas e comparativamente aos outros

extractos apresentaram uma actividade mais elevada, sendo por isso considerados os mais promissores candidatos a antioxidantes de uso cutâneo. Ambos os extractos apresentaram ausência de efeito irritante cutâneo após aplicação única sob oclusão (5 % m/V) em voluntários humanos. Nestes extractos foram identificados e quantificados diferentes ácidos fenólicos e flavonóides, os quais poderão ser responsáveis pela actividade antioxidante demonstrada. Os dois extractos exibiram efeito quelante de ferro, ião metálico que contribui para a geração de ROS. O extracto seleccionado para incorporação num sistema semi-sólido foi o extracto hidroalcoólico (EtOH 70º) de folhas de *C. sativa*, devido ao seu maior efeito quelante de ferro e a uma mais completa caracterização da composição fenólica.

Os estudos de pré-formulação efectuados evidenciaram o papel benéfico da glicerina e a marcada influência do pH na estabilidade funcional do extracto. Procedeu-se ao desenvolvimento galénico de uma preparação semi-sólida com qualidade e, simultaneamente, com garantia de estabilidade e eficácia do extracto incorporado. A preparação desenvolvida foi um gel hidroglicérico de Carbopol[®], com uma fase lipófila incorporada, um conservante, um agente alcalinizante e um pigmento, mas sem qualquer agente tensioactivo. O sistema proposto apresentou boa estabilidade física e funcional além de qualidade microbiológica, após armazenamento a 20 °C durante seis meses. Esta preparação exibiu também um marcado efeito hidratante, avaliado *in vivo* após aplicação única, o qual contribui para contrariar a acção dessecante da radiação solar e favorece a aceitabilidade cosmética.

Este trabalho permitiu a obtenção e a optimização de um conjunto de extractos de plantas da flora portuguesa e a caracterização da sua actividade antioxidante. O extracto seleccionado (extracto de folhas de *C. sativa*) deu provas de qualidade, segurança e eficácia. Foi obtido um sistema semi-sólido que assegurou a estabilidade funcional do extracto de *C. sativa* incorporado e evidenciou, nas condições experimentais testadas, uma boa estabilidade.

Palavras-chave: *Castanea sativa*, desenvolvimento galénico, preparações antioxidantes cutâneas, stress oxidativo cutâneo.

Abstract

The skin represents a major target of oxidative stress since it is continuously exposed to external oxidant aggressions, such as solar radiation. This oxidative damage could be an initiator in the pathogenesis of photoaging, dermatoses and skin cancer.

Sunscreen use constitutes the major approach to prevent the deleterious effects of solar radiation on skin. However, some sunscreens are known to undergo photodegradation processes and induce generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) providing an incomplete protection against solar-mediated oxidative stress. In this regard, topical application of antioxidants, such as polyphenols may be a successful strategy for diminishing solar radiation-mediated oxidative damage in skin.

The aims of this dissertation were to obtain and optimize an extract with antioxidant activity prepared from plants of the Portuguese flora and to develop and characterize a formulation for application on the skin which incorporates the plant extract.

Several plants from the portuguese flora were selected (*Juglans regia*, *Eucalyptus globulus*, *Castanea sativa*, *Quercus robur*, *Olea europaea*, *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Hypericum androsaemum*) in order to obtain an antioxidant extract, using solvents with low skin toxicity. The extraction method was optimized with respect to solvent, extraction time and temperature, and number of extraction steps, and a method with five extraction steps (each taking 10 min), performed at 40 °C was selected. The extracts that exhibited the higher antioxidant activity (IC₅₀ on the DPPH scavenging activity assay lower than 50 µg/ml) and higher total phenolics content (higher than 150 EAG mg /g lyophilized extract, evaluated with Folin Ciocalteu method) were the hydroalcoholic extracts of *J. regia* (EtOH 40°); *C. sativa* (EtOH 70°), *Q. robur* (EtOH 40°) and *H. androsaemum* (EtOH 40°) and the water extract of *E. globulus*. Comprehensive characterization of the antioxidant activity against several ROS and RNS that have been implicated in solar-mediated oxidative stress (namely HO[•], O₂^{•-}, H₂O₂, ¹O₂, ROO[•] NO[•] and ONOO[•]) was carried out for the most active extracts. The overall results led to the selection of *C. sativa* and *Q. robur* extracts as the most promising candidates as topical antioxidants. Both extracts showed absence of cutaneous irritancy potential in human volunteers. *C. sativa* hydroalcoholic (EtOH 70°) leaf extract was the chosen extract due to its higher iron chelating ability and better characterization of its phenolic composition. Pre-formulation studies concluded that the pH and the solvent influenced the functional stability of the extract. A semisolid formulation was developed considering the requisites of functional and physical stability as well as microbiological quality. The developed semisolid formulation corresponded to a Carbopol© hydroglyceric gel with a lipophilic phase

incorporated, including a preservative, a base and a pigment, and being surfactant-free. It exhibited good physical, functional and microbiological stability after storage over a period of 6 months at 20 °C.

The formulation exhibited a moisturizing effect *in vivo* after single application, which is beneficial to counteract the dehydrating effect of solar exposure and to improve cosmetic acceptability,

In this work, the preparation and the optimization of a number of extracts obtained from plants of the portuguese flora and the characterization of their antioxidant activity were carried out. The selected extract (extract of *C. sativa* leaves) exhibited quality, safety and efficacy. A semisolid preparation that contributed to the functional stability of the incorporated extract of *C. sativa* was developed, which exhibited good stability in the experimental conditions tested.

Keywords: *Castanea sativa*, galenic development, skin antioxidant preparations, skin oxidative stress.

Índice geral

Resumo	xiii
Abstract	xv
Lista de abreviaturas e símbolos	xxxi
Objectivos e organização geral da tese	xxxv
1. Introdução geral.....	1
1.1 Espécies reactivas: relevância fisiológica e patofisiológica.....	1
1.2 Pele <i>versus</i> espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)	2
1.2.1 Estrutura da pele.....	2
1.2.2 Fontes endógenas de espécies reactivas	4
1.2.3 Fontes exógenas de espécies reactivas.....	6
1.2.3.1 Poluição ambiental.....	6
1.2.3.2 Radiação ionizante	8
1.2.3.3 Radiação solar	8
1.2.4 Sistemas cutâneos com acção preventiva do stress oxidativo	12
1.2.4.1 Sistema antioxidante enzimático	13
1.2.4.2 Sistema antioxidante não enzimático	16
1.2.5 Efeitos tóxicos das ROS e RNS na pele.....	22
1.2.5.1 Lesões no DNA	22
1.2.5.2 Peroxidação lipídica	23
1.2.5.3 Oxidação proteica	25
1.2.5.4 Indução das metaloproteases da matriz (MMP).....	25
1.2.5.5 Acção inflamatória e imunossupressora	27
1.2.6 Stress oxidativo e dermatoses	28
1.2.6.1 Psoríase	28
1.2.6.2 Dermatite atópica	29
1.2.6.3 Acne.....	30
1.2.6.4 Dermatite de contacto irritativa	30
1.2.6.5 Vitiligo	30
1.2.6.6 Erupção polimorfa solar.....	31

1.2.6.7	Carcinoma da pele	31
1.3	Estratégias de prevenção dos danos induzidos pela exposição ao sol.....	32
1.3.1	Protectores solares.....	32
1.3.2	Reforço do sistema enzimático antioxidante	34
1.3.3	Administração de antioxidantes	34
2.	Preparação, selecção e optimização de extractos de plantas da flora portuguesa	53
2.1	Seleccção das espécies vegetais.....	53
2.2	Caracterização das espécies vegetais	55
2.2.1	Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.).....	55
2.2.2	Castanheiro (<i>Castanea sativa</i> Mill.)	57
2.2.3	Carvalho (<i>Quercus robur</i> L.)	59
2.2.4	Nogueira (<i>Juglans regia</i> L.).....	60
2.2.5	Cerejeira (<i>Prunus avium</i> L.)	62
2.2.6	Figueira (<i>Ficus carica</i> L.)	63
2.2.7	Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).....	65
2.2.8	Pessegueiro (<i>Prunus persica</i> L. Batsch)	66
2.2.9	Hipericão do Gerês (<i>Hypericum androsaemum</i> L.)	67
2.3	Parte experimental	69
2.3.1	Colheita e secagem das plantas	69
2.3.2	Obtenção dos extractos	70
2.3.3	Seleccção do solvente extractivo.....	70
2.3.3.1	Quantificação dos compostos fenólicos totais	70
2.3.3.2	Avaliação da actividade captadora do radical DPPH.....	71
2.3.4	Optimização do método extractivo	72
2.3.4.1	Influência do nº de extracções e tempo de extracção	72
2.3.4.2	Influência da temperatura.....	73
2.4	Resultados	73

2.4.1	Seleccção do solvente extractivo	73
2.4.2	Optimização do método extractivo	74
2.5	Discussão	78
3.	Avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio e de azoto e estudo da composição fenólica	83
3.1	Parte experimental	83
3.1.1	Avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)	83
3.1.1.1	Radical superóxido	83
3.1.1.2	Peróxido de hidrogénio	85
3.1.1.3	Radical peroxilo	86
3.1.1.4	Radical hidroxilo	87
3.1.1.5	Oxigénio singuleto	88
3.1.1.6	Óxido nítrico	89
3.1.1.7	Anião peroxinitrito	91
3.1.2	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	92
3.1.2.1	Identificação dos compostos fenólicos	92
3.1.2.2	Validação do método de HPLC	93
3.1.2.3	Quantificação dos compostos fenólicos	93
3.2	Resultados	94
3.2.1	Avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio e de azoto	94
3.2.2	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	98
3.3	Discussão	102
4.	Avaliação complementar da actividade antioxidante e estudos de pré-formulação	111
4.1	Parte experimental	112
4.1.1	Avaliação do efeito quelante de ferro	112
4.1.2	Determinação do potencial redox (estudos electroquímicos)	112

4.1.3	Avaliação do potencial irritante cutâneo.....	113
4.1.3.1	Avaliação da perda transepidérmica de água (TEWL)	115
4.1.3.2	Avaliação instrumental do eritema	116
4.1.3.3	Avaliação clínica da reacção irritante	117
4.1.4	Estudo da reprodutibilidade do método extractivo.....	118
4.1.5	Avaliação da estabilidade do extracto de <i>C. sativa</i>	118
4.1.6	Avaliação da fotoestabilidade do extracto de <i>C. sativa</i>	118
4.1.7	Avaliação da estabilidade funcional do extracto de <i>C. sativa</i>	120
4.1.7.1	Avaliação da actividade captadora do radical DPPH.....	120
4.2	Resultados	121
4.2.1	Caracterização da capacidade antioxidante.....	121
4.2.2	Avaliação da reprodutibilidade do método extractivo e da estabilidade do extracto de <i>C. sativa</i>	126
4.2.3	Discussão	133
5.	Desenvolvimento, optimização e caracterização de um sistema semi-sólido com extracto de <i>C.sativa</i>	139
5.1	Parte experimental	142
5.1.1	Desenvolvimento galénico de um sistema semi-sólido	142
5.1.2	Optimização da formulação	143
5.1.2.1	Estudo da influência das quantidades de glicerina e de parafina líquida	144
5.1.2.2	Estudo da influência da incorporação de dióxido de titânio	148
5.1.2.3	Estudo da influência da concentração de Carbopol® e da influência do pH	149
5.1.3	Avaliação da estabilidade física e funcional.....	150
5.1.3.1	Estudos preliminares de estabilidade.....	151
5.1.3.2	Avaliação da estabilidade em tempo real e em condições aceleradas	152
5.1.4	Avaliação da qualidade microbiológica	153

5.1.5	Avaliação da acção preventiva da degradação oxidativa da preparação semi-sólida.....	153
5.1.6	Estudo do efeito hidratante cutâneo.....	154
5.1.7	Caracterização estrutural	156
5.2	Resultados	156
5.2.1	Optimização da formulação.....	156
5.2.2	Avaliação da estabilidade física, funcional e microbiológica.....	161
5.2.3	Avaliação da acção preventiva da degradação oxidativa do sistema semi-sólido.....	168
5.2.4	Avaliação do efeito hidratante cutâneo.....	170
5.2.5	Caracterização estrutural	172
5.3	Discussão.....	174
6.	Conclusões gerais e perspectivas futuras	183
Anexos		223

Índice de figuras

Figura 1.1. Estrutura do tecido cutâneo.....	2
Figura 1.2. Estrutura da epiderme.....	3
Figura 1.3. Espectro da radiação solar.....	9
Figura 1.4. Representação esquemática das vias de produção cutânea de ROS e de RNS e dos sistemas enzimáticos de protecção.....	20
Figura 1.5. Representação esquemática das vias de sinalização conducentes à expressão das MMPs.....	27
Figura 2.1. Filogenia das espécies vegetais estudadas.....	54
Figura 2.2. <i>Eucalyptus globulus</i> (árvore adulta; libertação do ritidoma externo; folhas adultas, flores e botões; frutos mostrando o opérculo com as valvas abertas).....	56
Figura 2.3. <i>Castanea sativa</i> (árvore adulta; folhas adultas com frutos, flores; frutos – castanha).....	58
Figura 2.4. <i>Quercus robur</i> (árvore adulta; casca; flores; folhas e frutos – bolotas).	59
Figura 2.5. <i>Juglans regia</i> (árvore adulta; folhas e frutos verdes; fruto – noz).....	61
Figura 2.6. <i>Prunus avium</i> (árvore adulta; folhas e frutos; flores; fruto – cereja).	63
Figura 2.7. <i>Ficus carica</i> (crescendo sobre o tronco de outra árvore; folhas e figos; sicónio; figos secos).....	64
Figura 2.8. <i>Olea europaea</i> (árvore adulta; folhas e frutos – azeitona; flores; nascimento dos frutos).....	65
Figura 2.9. <i>Prunus persica</i> (árvore adulta; flores; folhas e frutos – pêsego; frutos).....	67
Figura 2.10. <i>Hypericum androsaemum</i> (arbusto, folhas, flores).....	68
Figura 2.11. Localização geográfica dos pontos de colheita das plantas.....	69
Figura 2.12. Teor de compostos fenólicos totais, actividade captadora do radical DPPH e massa de extracto observados para os diferentes extractos.	73
Figura 2.13. Comparação da eficiência extractiva de dois métodos..	75
Figura 2.14. Efeito da temperatura na eficiência da extracção.	76
Figura 2.15. Actividade captadora de DPPH exercida pelos extractos em estudo.....	77
Figura 3.1. Capacidade captadora de HO [•] , O ₂ ^{•-} , ¹ O ₂ e H ₂ O ₂ exercida pelos extractos em estudo.....	95
Figura 3.2. Capacidade captadora de NO [•] e ONOO ⁻ na ausência e na presença de NaHCO ₃ exercida pelos extractos em estudo.....	97
Figura 3.3. Cromatograma do extracto de <i>C. sativa</i> . λ= 350 nm.....	99
Figura 3.4. Cromatograma do extracto de <i>Q. robur</i> . λ= 350 nm.	100

Figura 3.5. Estruturas químicas das subclasses mais comuns de flavonóides.....	106
Figura 4.1. Escala usada para classificação clínica das lesões cutâneas.	117
Figura 4.2. Descrição espacial da cor segundo o espaço de cor L*a*b*.....	119
Figura 4.3. Actividade quelante de ferro dos extractos de folhas de <i>C. sativa</i> e de <i>Q. robur</i>	121
Figura 4.4. Voltamogramas de impulso diferencial de soluções (0,6 %, m/V) de extractos de carvalho e de castanheiro em solução tampão de acetato de pH 5,5.....	122
Figura 4.5. Caixa de bigodes representativa da variação da perda de água transepidérmica após teste de aplicação única sob oclusão.	123
Figura 4.6. Caixa de bigodes representativa da variação do eritema após teste de aplicação única sob oclusão.	124
Figura 4.7. Imagem do antebraço de um voluntário 24 h após remoção das câmaras de oclusão.	125
Figura 4.8. Frequência das classificações clínicas das reacções cutâneas após aplicação sob oclusão dos extractos de <i>C. sativa</i> e de <i>Q. robur</i> , controlo positivo (SLS 2 % m/V) e controlo negativo (água desionizada).	126
Figura 4.9. Cromatogramas dos três lotes de <i>C. sativa</i> ($\lambda = 350$ nm).....	127
Figura 4.10. Modificação da cor do extracto após a execução do ensaio de fotoestabilidade.	130
Figura 4.11. Variação dos parâmetros de cor do extracto de <i>C. sativa</i> após execução do ensaio de fotoestabilidade..	130
Figura 4.12. Influência do tempo na actividade captadora de DPPH do extracto de <i>C. sativa</i> (0,025 % m/V) em solução tampão pH 5, solução tampão pH 7,1 e glicerina (85 % m/m).	131
Figura 4.13. Influência do tempo e da temperatura na actividade captadora de DPPH do extracto de <i>C. sativa</i> em solução tampão pH 5.....	132
Figura 4.14. Influência do tempo e da temperatura na actividade captadora de DPPH do extracto de <i>C. sativa</i> em glicerina (85 % m/m).	132
Figura 5.1. Estrutura química simplificada dos polímeros de ácido acrílico.	141
Figura 5.2. Representação de uma molécula de Carbopol® não neutralizada, neutralizada e com pontes de hidrogénio com polióis (propilenoglicol e polietilenoglicol)	142
Figura 5.3. Representação esquemática do desenho experimental (<i>Central composite design</i>) usado neste estudo.	144
Figura 5.4. Texturómetro com sonda acoplada utilizado no ensaio de avaliação da espalhabilidade.....	147

Figura 5.5. Texturograma tipo obtido com a execução do ensaio de avaliação da espalhabilidade.	147
Figura 5.6. Diagrama de Pareto representativo da estimativa dos efeitos dos factores em estudo na firmeza.....	157
Figura 5.7. Diagrama de Pareto representativo da estimativa dos efeitos dos factores em estudo na actividade captadora do radical DPPH.....	158
Figura 5.8. Superfície de resposta representativa da influência dos factores em estudo na firmeza.	158
Figura 5.9. Influência da concentração de dióxido de titânio na firmeza....	159
Figura 5.10. Influência do pH na firmeza....	160
Figura 5.11. Influência da concentração de Carbopol® na firmeza.....	161
Figura 5.12. Comparação dos valores de firmeza do sistema submetido a um teste cíclico (4 – 40 °C, 7 dias).	161
Figura 5.13. Evolução do pH após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR..	163
Figura 5.14. Evolução dos parâmetros de cor L*, a* e b* após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR.	164
Figura 5.15. Comparação do aspecto do sistema em estudo no início e após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR durante seis meses.	164
Figura 5.16. Evolução da firmeza após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR..	165
Figura 5.17. Evolução dos valores de IC ₅₀ calculados no ensaio de captação do radical DPPH após armazenamento a 20 °C e 40 °C e 75 % HR.....	165
Figura 5.18. Comparação das curvas de viscosidade no início do ensaio de estabilidade e após seis meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR..	166
Figura 5.19. Comparação dos reogramas no início do ensaio de estabilidade e após 6 meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR.....	167
Figura 5.20. Comparação dos termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varrimento em atmosfera de oxigénio e em atmosfera de azoto da base (preparação sem extracto).	169
Figura 5.21. Comparação dos termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varrimento em atmosfera de oxigénio da preparação e da base (preparação sem extracto).	170
Figura 5.22. Caixa de bigodes representativa da variação dos valores de hidratação cutânea observados para todos o produtos em estudo, 4 horas após a sua aplicação	171

Figura 5.23 Caixa de bigodes representativa da variação dos valores de TEWL observada para todos os produtos em estudo, 4 horas após a sua aplicação.	172
Figura 5.24. Imagens obtidas por microscopia óptica	172
Figura 5.25. Imagens obtidas por CryoSEM com diferentes ampliações.....	173
Figura 5.26. Imagem da estrutura tipo “favos de mel” característica dos polímeros do ácido acrílico, obtida por CryoSEM.	174

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Resumo dos constituintes do sistema antioxidante cutâneo	21
Tabela 1.2. Estudos in vivo demonstrativos do efeito de polifenóis na prevenção e/ou tratamento dos danos induzidos pela radiação solar	39
Tabela 2.1. Composição fenólica das folhas de <i>E. globulus</i> descrita na literatura	57
Tabela 2.2. Composição fenólica das folhas de <i>C. sativa</i> descrita na literatura	58
Tabela 2.3. Composição fenólica das folhas de <i>Q. robur</i> descrita na literatura	60
Tabela 2.4. Composição fenólica das folhas de <i>J. regia</i> descrita na literatura	62
Tabela 2.5. Composição fenólica das folhas de <i>P. avium</i> descrita na literatura	63
Tabela 2.6. Composição fenólica das folhas de <i>F. carica</i> descrita na literatura	64
Tabela 2.7. Composição fenólica das folhas de <i>O. europaea</i> descrita na literatura	66
Tabela 2.8. Composição fenólica das folhas de <i>P. persica</i> descrita na literatura	67
Tabela 2.9. Composição fenólica das folhas de <i>H. androsaemum</i> descrita na literatura	68
Tabela 2.10. Comparação entre a actividade captadora do radical DPPH e o teor de compostos fenólicos totais dos extractos obtidos com o método inicial e com o método optimizado	77
Tabela 3.1. Gradiente do eluente usado na metodologia de identificação e quantificação de compostos fenólicos	93
Tabela 3.2. Capacidade captadora das espécies reactivas de oxigénio	96
Tabela 3.3. Valor de ORAC	96
Tabela 3.4. Capacidade captadora de $\cdot\text{NO}$ e de ONOO^- na presença e na ausência de NaHCO_3	98
Tabela 3.5. Parâmetros de validação do método cromatográfico usado para quantificação dos compostos fenólicos	100
Tabela 3.6. Composição fenólica quantitativa dos extractos de <i>C. sativa</i> e <i>Q. robur</i> ...	101
Tabela 3.7. Capacidade captadora de ROS e de RNS descrita na literatura para os diferentes compostos fenólicos identificados nos extractos de <i>Q. robur</i> e de <i>C. sativa</i>	102
Tabela 4.1. Efeito quelante de ferro e potencial redox dos extractos de <i>C. sativa</i> e de <i>Q. robur</i>	121
Tabela 4.2. Parâmetros do teste de Wilcoxon (comparação do índice de eritema e TEWL com o controlo negativo, 2 e 24 h após remoção das câmaras de oclusão)	124

Tabela 4.3. Comparação do teor dos compostos fenólicos entre os três lotes de extracto de <i>C. sativa</i>	127
Tabela 4.4. Comparação da actividade captadora do DPPH, do teor de compostos fenólicos totais e da massa de extracto entre os três lotes do extracto de <i>C. sativa</i>	128
Tabela 4.5. Comparação da actividade captadora do DPPH e do teor de compostos fenólicos totais do extracto de <i>C. sativa</i> após preparação e após 12 meses e parâmetros do teste t de <i>student</i>	128
Tabela 4.6. Comparação do teor de compostos fenólicos do extracto de <i>C. sativa</i> após preparação e após 12 meses e parâmetros do teste t de <i>student</i> ..	129
Tabela 4.7. Actividade captadora de DPPH do extracto de <i>C. sativa</i> e parâmetros do teste t de <i>student</i> (comparação dos resultados obtidos antes e após a execução do ensaio de fotoestabilidade)	129
Tabela 4.8. Parâmetros de cor do extracto de <i>C. sativa</i> avaliados antes e após a execução do ensaio de fotoestabilidade	130
Tabela 5.1. Tipos de constituintes de preparações semi-sólidas.....	139
Tabela 5.2. Composição da formulação sujeita ao estudo de optimização	144
Tabela 5.3. Desenho experimental usado no estudo de optimização	145
Tabela 5.4. Níveis dos factores em estudo	145
Tabela 5.5. Composição das formulações com diferentes quantidades de TiO ₂	149
Tabela 5.6. Composição das formulações com 2 % de Carbopol® e com diferentes quantidades de trietanolamina	149
Tabela 5.7. Composição das formulações com diferentes quantidades de Carbopol® e de trietanolamina	150
Tabela 5.8. Composição da formulação testada no ensaio preliminar de avaliação da estabilidade	152
Tabela 5.9. Comparação dos valores de pH, de actividade captadora do radical DPPH e de firmeza avaliados antes e após execução do teste cíclico....	162
Tabela 5.10. Comparação da actividade captadora do DPPH do ácido ascórbico avaliada com diferentes metodologias	162
Tabela 5.11. Comparação dos parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley obtidos no início do ensaio de estabilidade e após 6 meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR.....	167
Tabela 5.12. Número de unidades formadoras de colónias (UFC) de microrganismos totais e bolores e leveduras existentes nos três lotes do sistema em estudo, após 6 meses de armazenamento a 20 °C.....	168

Tabela 5.13. Parâmetros do teste de Dunnett (comparação das variações de TEWL e de hidratação com o controlo negativo 1 e 4 h após aplicação dos produtos).....	171
---	-----

Lista de abreviaturas e símbolos

AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano
Abs	Absorvência
AGE _s	Produtos finais de glicação avançada (<i>Advanced glycation end products</i>)
AUC	Área sob a curva (<i>Area under the curve</i>)
BER	Reparação do DNA por excisão de bases (<i>Base excision repair</i>)
CIE	<i>Comission Internationale de l'Éclairage</i>
COX	Cicloxygenase
CryoSEM	Crio-microscopia electrónica de varrimento (<i>Cryo-scanning electronic microscopy</i>)
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de fotodíodos (<i>Diode array detector</i>)
DAF-2	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (<i>4,5-diaminofluorescein diacetate</i>)
DHR	Di-hidrorodamina 123
DME	Dose mínima de eritema
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dp	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
ECGC	Galhato de epigalhocatequina. (<i>Epigallocatechin gallate</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine tetra acetic acid</i>)
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (<i>Electron paramagnetic resonance</i>)
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América

FAD	Flavina adenina dinucleótido (<i>Flavin adenin nucleotide</i>)
FPS	Factor de protecção solar
GAGs	Glicosaminoglicanos
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
HO	Heme oxigenase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HR	Humidade relativa
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>Heat shock proteins</i>)
ICAM	Moléculas de adesão intercelular (<i>Intercellular adhesion molecules</i>)
IC ₅₀	Concentração que apresenta 50 % de efeito
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
MAPK	Cinases de proteínas activadas pelo mitogénio (<i>Mitogen activated protein kinases</i>)
MDA	Malonildialdeído
MMP	Metaloproteases da matriz (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NBT	Azul de nitrotetrazólio (<i>Nitro blue tetrazolium</i>)
NER	Reparação do DNA por excisão de nucleótidos (<i>Nucleotide excision repair</i>)

NF- κ B	Factor nuclear- κ B (<i>Nuclear factor- κB</i>)
NMF	Factor hidratante natural (<i>Natural moisturizing factor</i>)
NOC 5	3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno
NOS	Óxido nítrico sintetase (<i>Nitric oxide synthase</i>)
O/A	Óleo/água
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>)
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
PCV	Polifenóis do chá verde
PMS	Metossulfato de fenazina (<i>Phenazine metossulfate</i>)
PTP	Poros de transição da permeabilidade (<i>Permeability transition pore</i>)
q.b.p.	quanto baste para
RH	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNS	Espécies reactivas de azoto (<i>Reactive nitrogen species</i>)
RSM	Metodologia das superfícies de resposta (<i>Response surface methodology</i>)
RSS	Radiação solar simulada
RSUVS	Radiação solar ultravioleta simulada
SLS	Sulfato de laurilo e sódio
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)
TEWL	Perda de água transepidérmica (<i>Transepidermal water loss</i>)
TGF- β	Factor de crescimento transformador β (<i>Transforming growth factor- β</i>)
TiMMP	Inibidores das MMP (<i>Tissue inhibitor of MMP</i>)
TNF- α	Factor de necrose tumoral - α (<i>Tumor necrosis factor - α</i>)
tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Meio gelosado com peptonas de caseína e de soja (<i>Tryptic soy agar</i>)

UFC	Unidades formadoras de colónias
Trolox	Ácido ($\pm$)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UA	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta

Símbolos

E_p	Potencial redox
I_p	Corrente
$\dot{\gamma}$	Velocidade de deformação em corte
λ	Comprimento de onda
K	Coeficiente de consistência
n	Índice de escoamento
p	Valor da probabilidade de obter um resultado tão extremo como o observado, assumindo que a hipótese nula é verdadeira
τ_0	Tensão de corte
S	Área sob a curva anódica

Nota: para algumas abreviaturas foi mantida a notação anglo-saxónica dado o seu carácter universal, sendo a respectiva designação por extenso apresentada em itálico.

Objectivos e organização geral da tese

A presente tese teve como objectivos primordiais a obtenção e optimização de extractos vegetais (obtidos a partir de plantas da flora portuguesa) com actividade antioxidante e o desenvolvimento e caracterização de uma preparação de aplicação cutânea que constitua uma base adequada à incorporação do extracto seleccionado.

A tese está estruturada em seis capítulos, em que o primeiro consiste numa introdução geral e o último compreende as conclusões gerais dos estudos experimentais e as perspectivas de trabalho futuro. Os capítulos 2 a 5 correspondem aos estudos realizados no âmbito da parte experimental e incluem as secções referentes aos métodos, resultados e discussão.

O capítulo 1, respeitante à introdução geral, apresenta uma revisão actualizada acerca dos factores responsáveis pela formação de espécies reactivas na pele, com especial incidência na radiação solar, e dos efeitos do stress oxidativo no DNA, proteínas e lípidos. São também descritos os constituintes do sistema antioxidante endógeno e apresentam-se as estratégias vulgarmente adoptadas para combater os efeitos nocivos da radiação solar, com relevo para o uso de substâncias antioxidantes. Apresenta-se ainda uma revisão sistemática dos estudos *in vivo* descritos na literatura relativos ao uso de polifenóis na prevenção e/ou tratamento dos efeitos agressivos da radiação solar na pele.

O capítulo 2 descreve a preparação e selecção de um extracto com actividade antioxidante, tendo como ponto de partida nove plantas da flora portuguesa, e a optimização do método extractivo.

O capítulo 3 refere a caracterização da capacidade antioxidante de cinco extractos recorrendo a ensaios *in vitro* de avaliação da capacidade captadora de ROS e RNS e à identificação e quantificação da composição fenólica dos extractos seleccionados.

O capítulo 4 reporta estudos complementares de caracterização da acção antioxidante e a avaliação do potencial irritante cutâneo com vista à selecção do extracto que se afigure como o melhor candidato a antioxidante de aplicação cutânea. Engloba ainda estudos de pré-formulação relativos à estabilidade e fotoestabilidade do extracto seleccionado.

O capítulo 5 trata o desenvolvimento galénico e a optimização e caracterização de um sistema semi-sólido que incorpora um extracto com acção antioxidante, seleccionado com base nos resultados descritos nos capítulos 3 e 4.

No último capítulo, são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho e são apontadas perspectivas futuras.

Em anexo, apresenta-se uma listagem das matérias-primas e reagentes usados nos estudos experimentais, bem como os termos de aceitação de participação nos ensaios *in vivo* e o tratamento estatístico dos resultados experimentais.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ESPÉCIES REACTIVAS: RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA E PATOFISIOLÓGICA

A designação espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive oxygen species*) inclui radicais livres tais como o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) e radical peróxido ($ROO^{\cdot}$) e espécies não radicalares nomeadamente o oxigénio singuleto ($^1O_2$), ozono (O_3), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Um radical livre pode ser definido como molécula ou fragmento de molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados em orbitais moleculares ou atómicas e é capaz de existir de forma independente [1]. A designação espécies reactivas de azoto (RNS – *Reactive nitrogen species*) refere-se a todos os estados oxidativos e aductos reactivos dos produtos azotados da óxido nítrico sintetase (NOS – *Nitric oxide synthase*), desde o óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) até aos que surgem em situações fisiológicas, como o anião nitroxilo ($NO^{\cdot-}$) e o catião nitrosónio (NO^+), óxidos superiores do azoto (N_2O_3 ou N_2O_4) e anião peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). As suas propriedades distintas resultam das diferenças de reactividade, tempo de vida, permeabilidade e solubilidade nos lípidos.

A produção de espécies reactivas (em pequenas quantidades) nos organismos vivos decorre do normal metabolismo celular. A exposição a determinados factores nocivos tais como alguns xenobióticos, agentes infecciosos, poluição ambiental e radiação ultravioleta (UV) conduz a um aumento da sua produção [1, 2]. As espécies reactivas exibem um papel duplo, apresentando simultaneamente acção benéfica e tóxica [3]. A produção excessiva de espécies reactivas ou a diminuição dos níveis de antioxidantes conduzem ao stress oxidativo (alteração do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do primeiro [4]), o qual tem vindo a ser implicado na etiologia de várias doenças e no envelhecimento [5-8].

Um elevado número de funções fisiológicas é controlado por mecanismos de sinalização dependentes do estado redox das células [9]. Estas incluem por exemplo [3]:

- 1) Produção de ROS pela NADPH oxidase das células fagocíticas;
- 2) Produção de ROS pela NADPH oxidase em células não fagocíticas;
- 3) Controlo do tónus vascular e outras funções pelo $^{\cdot}NO$;
- 4) Produção de ROS em função da concentração de oxigénio;
- 5) Controlo da adesão celular;
- 6) Controlo das respostas imunes;
- 7) Controlo da apoptose.

Para além do papel como mensageiros em diversos processos fisiológicos, as espécies reactivas estão associadas à etiopatogenia de diferentes doenças. Inúmeros estudos demonstraram a participação de ROS e RNS em patologias tais como: cancro [10, 11], doenças cardiovasculares [12], doenças artríticas [13, 14], doença de Alzheimer [15], doença de Parkinson [16, 17], aterosclerose [18, 19] e diabetes mellitus [20, 21]. Valko *et al.* [3] agruparam as doenças associadas às ROS e RNS em: 1) doenças caracterizadas por uma alteração do estado redox tiol/dissulfeto e modificação da tolerância à glicose (stress oxidativo mitocondrial) e 2) doenças com actividade aumentada da produção de ROS pela NADPH oxidase ou xantina oxidase (stress oxidativo inflamatório).

1.2 PELE *VERSUS* ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO (ROS) E DE AZOTO (RNS)

1.2.1 Estrutura da pele

Histologicamente a pele é constituída por três camadas designadamente a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1.1).

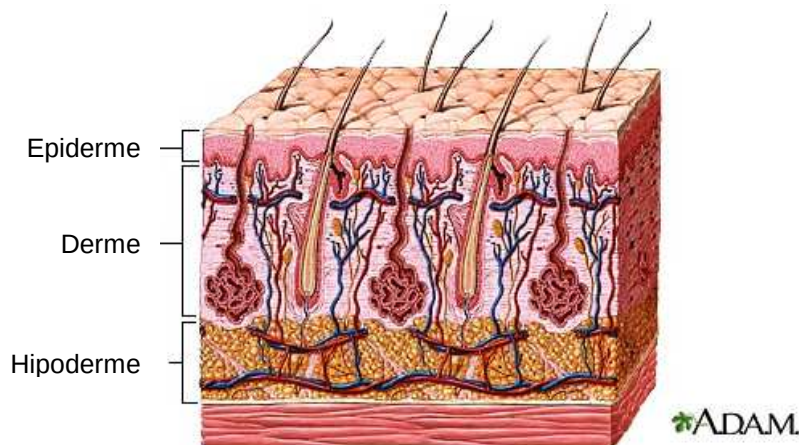


Figura 1.1. Estrutura do tecido cutâneo. Adaptado de [22].

A epiderme é um tecido epitelial pavimentoso, estratificado, queratinizado e avascular. A sua espessura é variável oscilando entre 0,06 mm e 0,8 mm. Possui diversas camadas que se organizam da superfície para o interior do seguinte modo: camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa (Figura 1.2). O estrato lúcido só é visível nas zonas onde a epiderme é mais espessa (palmas e plantas), situando-se imediatamente a seguir à camada córnea. À medida que se processa a migração dos queratinócitos desde a camada basal até à camada córnea

ocorre desidratação (o conteúdo hídrico médio da camada mais superficial é de cerca de 15 %) e queratinização. O ciclo de renovação do estrato córneo estima-se em 26 – 28 dias para um adulto normal [23]. Na constituição dos corneócitos têm relevo a queratina e os lípidos, sendo a α -queratina a principal proteína (cerca de 70 %). A região intercelular do estrato córneo consiste em ceramidas, ácidos gordos e derivados do colesterol, entre outros, e desmossomas, os quais asseguram a coesão dos corneócitos. Além dos queratinócitos que se transformam em corneócitos, a epiderme possui outros tipos de células: melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sendo 90 % das células queratinócitos. Os melanócitos estão presentes na camada basal e são responsáveis pela síntese de melanina. O papel imunitário é assegurado pelas células de Langerhans, enquanto as células de Merkel contêm receptores de estímulos sensoriais.

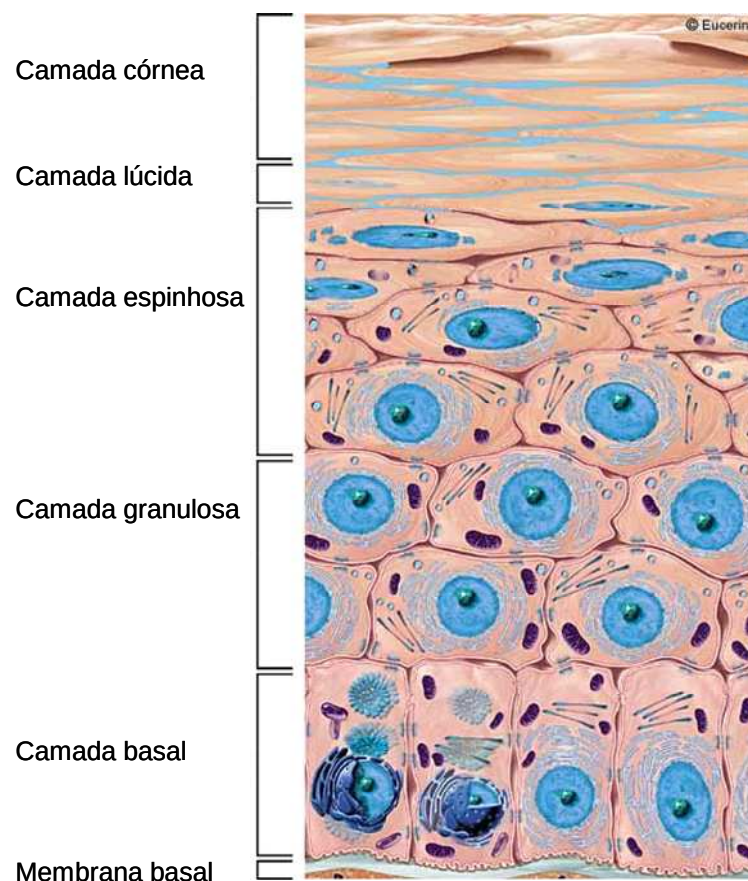


Figura 1.2. Estrutura da epiderme. Adaptado de [24].

A derme é constituída por tecido conjuntivo que compreende células, fibras, substância fundamental amorfa, vasos e nervos, e apresenta uma espessura variável entre 1 a 4 mm, dependendo da região anatômica [25]. Entre as células da derme incluem-se os fibroblastos, os mastócitos, os macrófagos e os linfócitos. Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular, tais como o colagénio, a laminina, a

fibronectina, a vitronectina e diversos glicosaminoglicanos. Uma extensa rede vascular assegura a nutrição da pele. A derme tem duas camadas distintas, a derme papilar adjacente à epiderme e a derme reticular [23]. As fibras da derme incluem as fibras elásticas e as de colagénio (correspondentes a 70 % do peso seco da pele, com uma estrutura tri-helicoidal). Os tipos de colagénio mais frequentes são do tipo I (80 %), presente na derme reticular, e tipo III (12 %) que se encontra na derme papilar. Na lâmina basal dermo-epidérmica surge o colagénio do tipo IV [23]. As fibrilhas de ancoragem, que unem a lâmina basal com as fibras de colagénio da derme papilar, são constituídas por colagénio do tipo VII. As fibras elásticas constituem 1 a 3 % do peso seco da pele. São finas, muito ramificadas e apresentam-se entrelaçadas. São constituídas por elastina (85 %) e um complexo glicoproteico microfibrilar: fibrilinas 1 e 2.

A substância fundamental amorfa inclui água, electrólitos, proteínas plasmáticas e glicosaminoglicanos (GAGs), como o ácido hialurónico e o sulfato de dermatano. Os proteoglicanos resultam da ligação covalente dos glicosaminoglicanos com polipéptidos. A substância fundamental desempenha um papel importante no equilíbrio homeostático de electrólitos e água, e actua também como humectante e lubrificante entre as redes de fibras de colagénio e elásticas durante os movimentos da pele [25].

A hipoderme tem como elemento constitutivo o adipócito, possuindo também fibroblastos e macrófagos. Esta camada também possui colagénio tipo I, III e V.

1.2.2 Fontes endógenas de espécies reactivas

O $O_2^{\bullet -}$ é uma ROS produzida essencialmente na mitocôndria celular, no processo de redução do oxigénio molecular mediado pelas NADPH oxidase e xantina oxidase. A produção de $O_2^{\bullet -}$ pela NADPH oxidase ocorre maioritariamente nas células fagocíticas, podendo também ocorrer noutras células como por exemplo fibroblastos, células endoteliais ou células da vasculatura lisa. O complexo enzimático presente nos neutrófilos consiste em subunidades ligadas à membrana ($gp91^{phox}$ /Nox 2 e $p22^{phox}$) e subunidades citosólicas ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e Rac 1). Os queratinócitos exprimem uma unidade catalítica da NADPH oxidase (Nox 1) distinta da encontrada nas células fagocíticas [26]. O $O_2^{\bullet -}$ também pode ser produzido de modo não enzimático por compostos redox-reactivos da cadeia de transporte de electrões mitocondrial [3, 9]. O $O_2^{\bullet -}$ é um oxidante moderado com limitada difusão através das membranas devido à sua carga eléctrica. É considerado uma ROS primária, com a capacidade de interagir com outras moléculas originando outras ROS ditas secundárias, que apresentam maior reactividade. O $O_2^{\bullet -}$ tem também a capacidade de reduzir metais de transição. A rápida dismutação a H_2O_2 pode ser espontânea ou catalisada pela enzima superóxido

dismutase (SOD). O H_2O_2 é degradado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase. Embora seja pouco reactivo, o H_2O_2 tem a capacidade de permear facilmente as membranas e, uma vez dentro da célula, reage com iões cobre (I) ou ferro (II). Desta reacção (designada reacção de Fenton) resulta a formação de $\text{HO}^\bullet$. A presença de ferro livre intracelular, condição necessária para que ocorra a reacção de Fenton, é possibilitada pela acção do $\text{O}_2^{\bullet-}$, quando produzido em excesso, dirigida às moléculas sequestradoras de ferro tais como a ferritina [3]. O $\text{HO}^\bullet$ pode ser ainda gerado através da reacção do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (reacção de Haber-Weiss) catalisada por iões metálicos, e também pela reacção do HOCl com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ [27]. O $\text{HO}^\bullet$ é altamente reactivo, o que o torna muito tóxico. Tem um tempo de vida muito curto, pelo que quando produzido *in vivo* reage na proximidade do local da sua produção. Este radical é pouco selectivo pelo que reage com várias biomoléculas, incluindo o ácido desoxirribonucleico (DNA – *Deoxyribonucleic acid*), enzimas e lípidos [27]. Este radical é responsável pela iniciação do processo de peroxidação lipídica na sequência do qual se produzem radicais $\text{ROO}^\bullet$. Este último radical pode remover hidrogénio de um ácido gordo, o que origina outro radical $\text{ROO}^\bullet$, propagando assim o processo oxidativo. O HOCl é produzido a partir da reacção do H_2O_2 com Cl^- por acção da mieloperoxidase (MPO) que se encontra nos grânulos primários dos neutrófilos. É um potente agente antimicrobiano que contribui para a defesa imunitária do organismo. Nos tecidos biológicos, o H_2O_2 pode reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl ou cloroaminas para produzir $^1\text{O}_2$ [9, 28]. O $^1\text{O}_2$ é um estado electronicamente excitado do oxigénio molecular com características moderadamente oxidantes e que tem a capacidade de iniciar a peroxidação lipídica [27, 28]. Esta espécie reactiva é muito electrofílica pelo que ataca as ligações π de compostos orgânicos, originando hidroperóxidos ou endoperóxidos. Nos sistemas biológicos, o $^1\text{O}_2$ pode também formar-se pela auto-reacção de radicais $\text{ROO}^\bullet$ envolvendo um mecanismo cíclico com um intermediário tetra-óxido linear ou através da fotossensibilização oxidativa, na qual um fotossensibilizador excitado transfere energia para o oxigénio molecular [29]. O $^\bullet\text{NO}$ é gerado pela NOS, responsável pela oxidação da L-arginina a L-citrulina [30]. Esta enzima situa-se em diversos tipos de células tais como macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, hepatócitos ou neurónios e apresenta três isoformas distintas: neuronal, endotelial e indutível. As duas primeiras têm uma acção constitutiva e produzem pequenas quantidades de $^\bullet\text{NO}$, sendo a sua actividade regulada pelos níveis intracelulares de iões cálcio. A NOS indutível (iNOS) é expressa em resposta à libertação de citocinas e produz maiores quantidades de $^\bullet\text{NO}$. Esta espécie reactiva é solúvel quer em meio aquoso, quer em meio lipídico, pelo que difunde rapidamente através das membranas citoplasmáticas. O $^\bullet\text{NO}$ é essencial em vários processos fisiológicos, contudo, quando presente em concentrações mais elevadas, pode apresentar toxicidade.

Após geração, o $\cdot\text{NO}$ participa em inúmeras reacções químicas que levam à formação de diferentes espécies reactivas. O $\cdot\text{NO}$ reage com o oxigénio e origina o radical mais activo, dióxido de azoto radicalar ($\cdot\text{NO}_2$). Da reacção do $\cdot\text{NO}$ com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ resulta o ONOO^- . Esta última reacção tem maior probabilidade de ocorrer quando a concentração de $\cdot\text{NO}$ é próxima da concentração de SOD, responsável pela dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 [30]. O ONOO^- tem propriedades químicas similares ao $\text{HO}^\cdot$ [27]. O ONOO^- a pH fisiológico origina a sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH). O ONOO^- e seus derivados participam em reacções de oxidação e nitração, provocando lesões a nível celular tais como a peroxidação lipídica, depleção dos grupos sulfidrílo, quebras da cadeia de DNA e nitração dos resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas [31]. Devido às elevadas concentrações de CO_2 em condições fisiológicas, é provável que muitas das reacções do ONOO^- *in vivo* sejam mediadas por intermediários reactivos resultantes da reacção entre o ONOO^- e o CO_2 , que são também potentes agentes nitrantes [32].

1.2.3 Fontes exógenas de espécies reactivas

Considerando a produção exógena de espécies reactivas, podemos distinguir três casos distintos: Tipo I – um agente externo entra no organismo de um modo activo ou passivo e gera ROS ou induz a sua produção; Tipo II – a produção de ROS decorre da excitação electrónica de uma substância endógena induzida pelo agente externo; Tipo III – o agente origina ROS externamente, que posteriormente penetram no organismo [2]. Um exemplo de geração de ROS Tipo I é a libertação de ROS pelos neutrófilos em resposta a um agente patogénico. A exposição à radiação solar constitui um exemplo característico Tipo II enquanto a exposição directa a produtos químicos geradores de ROS se enquadra num caso Tipo III. Entre as diversas fontes exógenas de espécies reactivas destacam-se a poluição ambiental, a radiação ionizante e a radiação solar, as quais serão discutidas com mais pormenor.

1.2.3.1 Poluição ambiental

A poluição ambiental compreende o ozono, o fumo de cigarro, os gases de combustão provenientes da actividade industrial e de veículos motorizados e os solventes orgânicos.

O estudo *in vitro* do efeito de uma atmosfera poluída artificial (contendo dióxido de enxofre, dióxido de azoto e ozono) numa mistura modelo de lípidos cutâneos revelou um forte efeito oxidante [33]. Um estudo conduzido no Japão demonstrou uma correlação entre os oxidantes ambientais e a oxidação proteica, associada à prevalência da

dermatite atópica [34]. Vários estudos apontaram o contributo de poluentes na geração de espécies reactivas. A irradiação UVA de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH – *Polycyclic aromatic hydrocarbons*) na presença de linoleato de metilo promoveu a peroxidação lipídica segundo um mecanismo que envolve ROS [35]. Vários solventes orgânicos, incluindo o tolueno e a acetona, induziram lesões na pele mediadas pelo stress oxidativo [36].

A avaliação de parâmetros do relevo cutâneo em indivíduos com história de consumo de tabaco confirmou o efeito do fumo de cigarro na promoção do envelhecimento cutâneo [37]. Outro estudo *in vivo* demonstrou também a presença de alterações faciais mais pronunciadas nos indivíduos tabagistas [38]. Yin *et al.* propuseram como mecanismo responsável pelo envelhecimento promovido pelo fumo do cigarro, a activação das metaloproteases da matriz (MMP – *Matrix metalloproteinases*), possivelmente associada à produção de ROS [39]. A acção fototóxica de um carcinogénico presente no fumo de cigarro, traduzida em um aumento de lesões no DNA e da peroxidação lipídica, foi também associada a um mecanismo que envolve a produção de ROS, em particular do $^1\text{O}_2$ [40].

Cerca de 90 % do ozono na atmosfera reside na estratosfera. O ozono absorve a maioria da radiação solar de comprimento de onda entre 290 e 320 nm. A depleção da camada de ozono leva a maiores efeitos biológicos da radiação UV. Observa-se um aumento da presença de ozono na troposfera, em particular nas grandes cidades e no Verão, formado pela acção combinada da radiação solar e poluentes primários como os óxidos de azoto e compostos orgânicos voláteis. Os valores normais de ozono estimam-se em cerca de 0,1 ppm, podendo exceder 0,8 ppm em casos de elevada poluição [41]. O sistema broncopulmonar e a pele são os alvos do ozono mais acessíveis, embora só recentemente esteja a ser investigada a toxicidade cutânea do ozono. Os efeitos tóxicos do ozono na pele são mediados por reacções que envolvem espécies reactivas. A especificidade de alvo e propriedades físico-químicas de baixa solubilidade e difusibilidade condicionam a interacção com a pele. O ozono não penetra na pele, pelo que se supõe que reage maioritariamente com o estrato córneo. A exposição ao ozono originou stress oxidativo num modelo de epiderme humana reconstruída [41]. Estudos *in vivo* constatarem a diminuição dos teores dos antioxidantes α -tocoferol e ácido ascórbico e a promoção da peroxidação lipídica em pele de ratinho, após exposição ao ozono, bem como o aumento dos níveis de MMP-9 e ciclooxigenase 2 (COX 2) e aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP – *Heat shock protein*) [42]. Dependendo da dose, o ozono pode ter uso terapêutico devido à sua acção bactericida e promotora da cicatrização, especialmente se a exposição for de curta duração [43].

1.2.3.2 Radiação ionizante

A radiação muito energética que liberta electrões para as superfícies de incidência formando iões é designada radiação ionizante e compreende partículas α , partículas β , raios γ , raios X e neutrões. No caso das três últimas, o poder de penetração é muito elevado. O corpo humano pode entrar em contacto com a radiação ionizante de duas formas: a radiação é emitida de uma fonte externa ao organismo (ex.: raios X e radioterapia) ou a fonte de radiação é interna (ex.: radioisótopos inalados ou ingeridos). A maioria dos efeitos biológicos desta radiação é mediada por ROS, que se podem gerar via radiólise da água (ex.: $\text{HO}^\bullet$) ou secundariamente a outras reacções ($\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) [2].

1.2.3.3 Radiação solar

A radiação solar inclui o espectro electromagnético de curta e elevada energia cósmica, raios γ , raios X, ultravioleta (UV), visível (VIS), infravermelho (IV), ondas eléctricas, ondas hertzianas e ondas de rádio (Figura 1.3). Cerca de 30 a 40 % da radiação solar é absorvida na atmosfera pela camada de ozono a uma distância de 15 – 30 km do nível do mar. Desta a radiação mais energética (comprimento de onda inferior a 10 nm) engloba os raios γ e raios X. As radiações UV, VIS e IV correspondem à radiação não ionizante. A radiação que atinge o globo terrestre inclui cerca de 50 % VIS, 40 % IV e 10 % UV [44]. A radiação com mais significado biológico situa-se na zona UV, encontrando-se dividida, por convenção, nas radiações: UV do vazio (10 – 100 nm), UVC (100 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm), UVA I (320 – 340 nm) e II (340 – 400 nm). A intensidade da radiação UVA mantém-se aproximadamente constante durante o dia enquanto a intensidade da UVB diminui com o afastamento do meio-dia.

Após exposição solar directa, os efeitos visíveis sobre a pele, a curto prazo, são manifestações eritematosas, mediadas por UVA numa primeira fase, detectadas passados 15 – 30 min mas que surgem só em alguns indivíduos e desaparecem facilmente. O eritema principal, devido à acção das radiações UVB, inicia-se 2 – 8 horas após a exposição solar e atinge o máximo nas 24 – 36 h seguintes, sendo frequentemente acompanhado por prurido e dor. Após 3 – 5 dias desaparece, iniciando-se o aumento da melanogénese que atinge o seu máximo duas a três semanas após. A dose de UVA requerida para provocar eritema é de 20 – 70 J/cm^2 , a qual é cerca de 600 – 1000 vezes superior à dose UVB eritematogénica (20 – 1000 mJ/cm^2). Embora a intensidade da radiação UVA a meio do dia seja sensivelmente 10 vezes superior à UVB, esta última é responsável por 98 – 99% do desenvolvimento dos eritemas [44].

A radiação IV pode ser dividida em IVA (760 – 1440 nm), IVB (1140 – 3000 nm) e IVC (3300 nm – 1 mm). O contributo da radiação IV, em particular da IVA (760 – 1440 nm) para o fotoenvelhecimento tem sido recentemente enfatizado [45].

A radiação visível (400 – 700 nm) também é responsável por efeitos biológicos tais como eritema, pigmentação e produção de espécies reactivas. Estão também documentadas lesões indirectas no DNA, mediadas por ROS [46]. O papel incompletamente elucidado desta radiação está reflectido no facto dos protectores solares comercialmente disponíveis apresentarem baixa protecção para a radiação visível. Esta protecção é essencialmente da responsabilidade dos filtros inorgânicos, sendo que a obtenção de partículas de reduzidas dimensões, motivada por uma melhoria da aceitabilidade cosmética, reduz a protecção face à radiação visível [46].

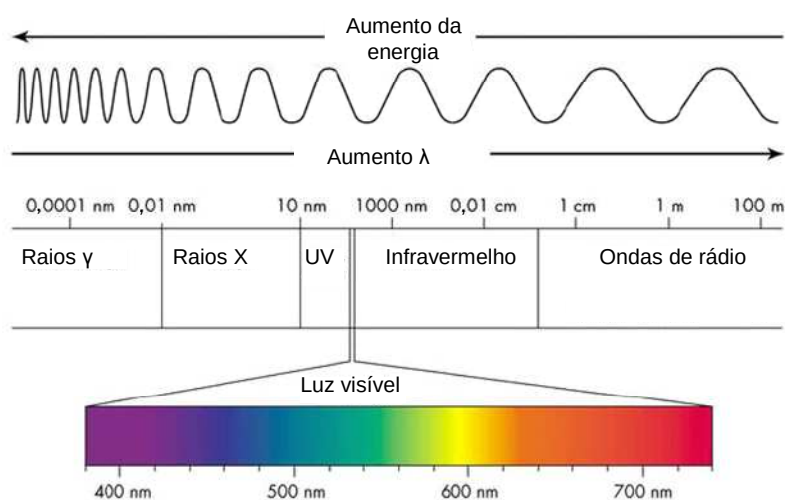


Figura 1.3. Espectro da radiação solar.

Vários estudos referem a produção de stress oxidativo na pele após exposição à radiação solar. Metodologias como a quimioluminescência [47] e a ressonância paramagnética electrónica (EPR – *Electronic paramagnetic resonance*) [48] permitiram comprovar *in vivo*, a existência de stress oxidativo após exposição à radiação UV, tendo-se constatado que a geração de espécies reactivas é maioritária ao nível do estrato córneo [47]. Quando os estudos foram conduzidos em simultâneo com radiação UVA e UVB, verificou-se que cerca de 80 % das espécies reactivas geradas se devia à acção da radiação UVA [48]. Num estudo conduzido em pele humana excisada, observou-se que a protecção conferida pelos filtros UVA contra a produção de espécies reactivas é muito superior à dos filtros UVB, o que corrobora o papel da radiação UVA como a principal geradora de espécies reactivas na pele [49].

A identificação das espécies reactivas produzidas no tecido cutâneo na pele após exposição à radiação UV pode efectuar-se utilizando substâncias com acção captadora selectiva. Esta abordagem permitiu a identificação da produção de $^1\text{O}_2$ e de radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ [50], $\text{ROO}^{\cdot}$ [51] e $\text{HO}^{\cdot}$ [52]. A produção de H_2O_2 na pele após exposição à radiação UV foi comprovada em diferentes ensaios [52]. A detecção de produtos de degradação oxidativa constitui uma evidência indirecta da produção de espécies reactivas. A produção de $^1\text{O}_2$ foi sugerida com base na detecção de produtos de degradação decorrentes exclusivamente de reacção com esta espécie reactiva [29]. Recentemente, o $^1\text{O}_2$ foi detectado directamente na pele humana exposta à radiação UVA, pela medição da sua quimiluminescência a 1270 nm [53]. Contrariamente às ROS, poucos estudos documentaram a detecção *in vivo* da produção de RNS após exposição à radiação solar, sendo que nenhum foi efectuado em pele humana. Estudos conduzidos em ratinhos revelaram o efeito da radiação UVB (200 mJ/cm^2) na expressão da iNOS citosólica (mais elevada 17 e 24 h após a irradiação) concomitantemente com um aumento da produção mitocondrial de $^{\cdot}\text{NO}$, que apresentou um máximo 17 h após a irradiação [54]. Outros estudos confirmaram este efeito, constatando que era dependente da dose de radiação [55, 56]. Em contraste com os estudos citados, Paz *et al.* verificaram, em queratinócitos, um efeito muito ligeiro da estimulação da produção de $^{\cdot}\text{NO}$ pela radiação UVB (50 mJ/cm^2) [57]. A ausência de efeito poderá estar relacionada com a baixa dose de UVB usada neste estudo, uma vez que está estabelecida a dependência da expressão da enzima da dose de radiação UVB [55]. Hanson e Clegg sugeriram a produção do $\text{ONOO}^{\cdot-}$ em pele humana excisada irradiada com radiação UVB, com base na sua capacidade de reagir com a di-hidrorodamina 123 (DHR), originando o composto fluorescente rodamina 123 (RH), utilizado como indicador de stress oxidativo [58]. O contributo da radiação UVA para a produção de $^{\cdot}\text{NO}$ parece dever-se à fotodecomposição do nitrito e S-nitrosotióis presentes na pele, constituindo assim um mecanismo não enzimático [59]. Novas abordagens experimentais são necessárias para clarificar o papel da radiação solar na geração de RNS, em particular estudos conduzidos em pele humana.

A origem das ROS e RNS geradas na pele pelas radiações UVA, UVB e IV não está completamente elucidada. Schroeder *et al.* propuseram que a produção de ROS mitocondriais (subprodutos da fosforilação oxidativa) subsequente à radiação IV seja distinta da promovida pelas radiações UV [60]. Estes autores verificaram, em culturas de fibroblastos humanos, um aumento do $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido na mitocôndria após exposição à radiação IV e constataram que um antioxidante com acção específica mitocondrial inibe a resposta mediada pela radiação IV (indução da MMP-1) mas não a induzida pelas radiações UVA e UVB [60]. Esta hipótese foi corroborada por outros autores que descreveram a não contribuição da cadeia respiratória mitocondrial para a geração de

ROS mediada pela radiação UVB, em culturas de queratinócitos e atribuíram um papel primordial à NADPH oxidase e à COX [61]. Conclusão semelhante foi obtida num estudo conduzido em fibroblastos e queratinócitos, usando como fonte de radiação a radiação UVA. Usando linhas celulares desprovidas da cadeia respiratória mitocondrial, os investigadores verificaram a ausência de efeito preventivo da morte celular mediada pela radiação UVA. Estes resultados foram confirmados em culturas de células humanas onde foi induzida a depleção da actividade da cadeia respiratória mitocondrial. No mesmo estudo, inibidores das NADPH oxidases e das NADPH oxidorreductases evidenciaram um efeito protector da morte celular [62]. A forte contribuição da NADPH oxidase (em particular da subunidade catalítica Nox 1) para a produção de ROS nos queratinócitos mediada pela radiação UVA foi também comprovada em cultura celular [63]. Paradoxalmente, outros estudos documentaram, em culturas de queratinócitos, a ocorrência de disfunção mitocondrial (perda do potencial de membrana) secundária à radiação UVB [57], e a participação dos complexos II e III da cadeia respiratória mitocondrial na acumulação intracelular de H_2O_2 mediada pela radiação UVA [64]. Em pele de ratinho observou-se concomitantemente uma redução da actividade mitocondrial e a produção mitocondrial de $O_2^{\cdot -}$ e $\cdot NO$, com expressão máxima 17 h após irradiação UVB [54]. Estes estudos, aparentemente contraditórios, constituem uma evidência de que permanecem por elucidar os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela produção de ROS e RNS na pele.

Um dos mecanismos da produção de ROS na pele, em particular mediada pela radiação UVA, envolve substâncias fotossensibilizadoras. A riboflavina, a protoporfirina, a nicotinamida e a bilirrubina são exemplos de fotossensibilizadores endógenos que, no estado oxidado motivado pela transferência de energia dos fotões UVA, têm a capacidade de reagir com um substrato (reação tipo I) ou com o oxigénio molecular (reação tipo II), originando neste último caso a formação de ROS, em particular do $^1O_2$, [65]. Outros potenciais fotossensibilizadores estão associados às proteínas estruturais tais como a queratina, o colagénio e a elastina. Os cromóforos presentes nas proteínas pertencem a uma das seguintes classes: 1) produtos finais de glicação avançada que constituem cromóforos reticulados formados por reacções não enzimáticas entre espécies reactivas de carbonilo e aminoácidos (AGE_s – *Advanced glycation end products*; 2) ligações cruzadas entre aminoácidos de origem enzimática e 3) produtos de fotoxidação de aminoácidos [66]. Os AGE_s acumulam-se durante os processos de envelhecimento intrínseco e extrínseco e em condições patológicas e foram identificados como fonte de ROS induzidas pela exposição solar [66]. Foi demonstrada a geração de ROS, em particular do H_2O_2 , do $HO^{\cdot}$ e do $O_2^{\cdot -}$, após irradiação UVA de AGE_s [67]. Wondrak *et al.* postularam que os danos celulares fotooxidativos ocorram através da

fotossensibilização de cromóforos das proteínas dérmicas, que geram ROS que difundem para o interior das células induzindo stress oxidativo intracelular, e não por uma acção directa da radiação UV nas células [66]. A filagrina (proteína rica em histidina) é produzida a partir da profilagrina após quebra pela caspase 14 e é posteriormente quebrada nos aminoácidos que figuram na sua composição. A enzima histidase, que apresenta elevada actividade na pele, sintetiza o isómero *trans* do ácido urocânico pela desaminação da histidina. O ácido urocânico acumula-se na pele em grande quantidade e constitui cerca de 0,7 % do peso seco da epiderme, visto que a enzima urocanase, responsável por catalisar o seu metabolismo, não está presente no tecido cutâneo [68]. Este composto é um cromóforo que se converte no isómero *cis* (Z) após absorção da radiação UV. Esta reacção é dependente da dose de radiação até ser atingido um estado fotoestacionário em que a concentração de *cis*-ácido urocânico é de 60 a 70 %. O espectro responsável pela isomerização apresenta um pico de absorção entre 300 e 315 nm em pele de rato e 280 – 310 nm em pele humana. No entanto, a fotoisomerização também pode ocorrer em resultado da radiação UVA [68]. Vários estudos confirmaram o papel do ácido urocânico na imunossupressão mediada pela radiação UV, segundo um mecanismo ainda não completamente elucidado [68]. A fotoquímica do ácido urocânico é complexa, formando-se após irradiação UV vários estados electrónicos. Estudos teóricos demonstraram que o ataque directo ao DNA não está favorecido do ponto de vista termodinâmico. Já a produção de ROS pode ocorrer, após excitação, por transferência de electrões para o oxigénio molecular formando-se o $^1\text{O}_2$. A formação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode teoricamente seguir dois mecanismos: transferência de electrões do ácido urocânico no estado tripleto para o oxigénio ou transferência de electrões do radical aniónico do ácido urocânico (gerado numa reacção de auto-ionização) para o oxigénio [69]. Foi descrito um aumento da concentração deste composto após exposição à radiação solar. Foi também proposto que o ácido *trans*-urocânico desempenhe um papel na captação de espécies reactivas na pele, em particular de $\text{ROO}^{\cdot}$ [70].

1.2.4 Sistemas cutâneos com acção preventiva do stress oxidativo

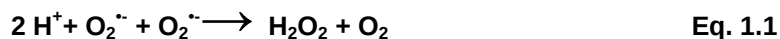
A fotoprotecção natural da pele está directamente relacionada com a espessura do estrato córneo e a pigmentação melânica. A protecção proporcionada pelo estrato córneo corresponde a 0,8 SED (*Standard erythema dose*), o qual pode aumentar em consequência do aumento da espessura da camada córnea observada após exposição à radiação UV [64]. A pele dispõe de vários sistemas protectores para contrabalançar a produção de espécies reactivas prejudiciais. Os mecanismos de defesa cutânea incluem sistemas de reparação dos danos oxidativos, mecanismos preventivos, defesas físicas e

defesas antioxidantes [71]. As enzimas reparadoras das lesões no DNA são um exemplo do primeiro sistema, enquanto os mecanismos preventivos incluem a quelatação de ferro, a qual evita o contributo deste metal na formação de ROS. Entre as defesas físicas inclui-se a interferência estérica, que evita que as espécies reactivas atinjam o alvo biológico. As defesas antioxidantes, enzimáticas ou não enzimáticas, assumem um papel preponderante e serão aqui descritas em pormenor. Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que quando presente em baixa concentração, comparativamente à de um substrato oxidável, evita ou retarda de uma forma significativa a oxidação desse substrato [72].

1.2.4.1 Sistema antioxidante enzimático

Superóxido dismutase (SOD)

A SOD apresenta, nos tecidos animais, duas formas imunologicamente distintas. A forma $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ contém enzimas diméricas, cuja massa molecular varia entre 31000 e 33000, localizadas principalmente no citoplasma, e que apresentam elevados níveis na camada basal da epiderme. A outra forma é tetramérica Mn^{2+} , com peso molecular entre 80000 e 90000, localizada na mitocôndria [73]. Esta enzima catalisa a seguinte reacção (Eq. 1.1):



O H_2O_2 formado nesta reacção tem também consequências tóxicas pelo que a acção desta enzima deve estar associada à acção das duas principais enzimas metabolizadoras do H_2O_2 , a catalase e a glutathione peroxidase.

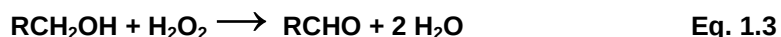
O grau de actividade desta enzima no tecido cutâneo é cerca de 5 – 10 vezes inferior ao verificado nos outros tecidos. A sua actividade é semelhante na epiderme e derme [74]. A SOD está aumentada nas zonas expostas comparativamente às zonas protegidas da exposição solar. Observa-se frequentemente um aumento compensatório da enzima em situações de stress oxidativo, tal como sucede em doenças inflamatórias [74]. Após intensa irradiação UVB de pele de ratinho não se observou alteração na actividade desta enzima [75]. Quando a fonte de irradiação foi UVA, observou-se uma redução da actividade em fibroblastos decorridos três dias, com recuperação ao fim do quinto dia [76]. Ambos os estudos documentam a ausência de efeito imediato da exposição à radiação UV na actividade da SOD.

Catalase

A maioria das células aeróbias possui catalase. A sua actividade localiza-se predominantemente no interior dos peroxissomas, não sendo expectável que a catalase contribua para o metabolismo do H_2O_2 extraperoxisomal, excepto quando as concentrações citoplasmáticas forem muito elevadas, o que sucede quando a glutathiona peroxidase está sobrecarregada. Esta enzima catalisa a seguinte reacção (Eq. 1.2):



Na presença de um nível adequado de H_2O_2 a enzima pode também catalisar a reacção abaixo descrita (Eq. 1.3).



A catalase encontra-se na pele de todos os animais. A sua actividade nesse órgão é significativamente inferior à encontrada no fígado, sendo próxima da actividade no coração e cérebro. Em culturas de células humanas observou-se que a actividade da catalase nos fibroblastos é o dobro da verificada nos queratinócitos, que por sua vez é o dobro da actividade nos melanócitos [74].

A actividade da catalase está profundamente reduzida nos casos de stress fotoxidativo [74]. Estudos *in vivo* comprovaram a diminuição da actividade da catalase após exposição a uma elevada intensidade de radiação UVB [75]. Em fibroblastos irradiados com radiação UVA também se verificou uma redução imediata da actividade da catalase, recuperada após cinco dias [76]. A actividade da catalase diminui com a idade em pele cronicamente exposta ao sol [77]. O papel protector da catalase foi elucidado num estudo em que se verificou uma maior protecção das lesões no DNA secundárias à radiação UVB, após o aumento da expressão da catalase em queratinócitos humanos [78].

Glutathiona peroxidase

Esta enzima é tetramérica e apresenta massa molecular de 84000. O átomo de selénio é incorporado como selenocisteína em cada uma das subunidades durante a síntese proteica. Esta enzima metaboliza quer o H_2O_2 (Eq. 1.4) quer hidroperóxidos orgânicos (Eq. 1.5).



A glutationa oxidada (GSSH) formada é novamente reduzida a glutationa de forma a assegurar uma disponibilidade constante. Esta regeneração é da responsabilidade da glutationa redutase. A actividade específica da glutationa peroxidase é inferior na pele em relação ao fígado, sendo contudo comparável à actividade observada no coração, no cérebro e no pulmão. A sua actividade na epiderme é cerca do dobro da observada na derme e é mais elevada nos fibroblastos e queratinócitos do que nos melanócitos [74]. A actividade da glutationa peroxidase é pouco afectada pela radiação UVB [75] ou UVA [76].

Tiorredoxina redutases

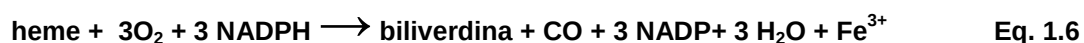
As tiorredoxina redutases são membros da família de proteínas homodiméricas em que cada monómero inclui um grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD – *Flavin adenin dinucleotide*) e um local de ligação para o NADPH. A tiorredoxina redutase reduz a tiorredoxina oxidada na presença de NADPH e reduz o H_2O_2 , peróxidos lipídicos e quinonas. A tiorredoxina reduzida actua como dador de electrões para a tiorredoxina peroxidase. A tiorredoxina redutase apresenta isoformas membranar e citosólica e está sujeita a um rigoroso controlo pelo H_2O_2 [79]. Esta enzima localiza-se apenas no estrato basal, melanócitos, células de Langerhans, folículos pilosos e glândulas sudoríparas [74]. A irradiação UVB de queratinócitos levou a um aumento dos níveis de tiorredoxina e tiorredoxina redutase. A actividade desta enzima está relacionada com o fototipo, aumentando linearmente do fototipo I ao VI (classificação de Fitzpatrick) [79].

NADPH quinona redutase

Esta enzima catalisa a redução bivalente de xenobióticos do tipo quinonas. A redução univalente traduz-se na formação de radicais semiquinonas que têm a capacidade de gerar $\text{O}_2^{\cdot -}$ e catalisar a oxidação dos grupos sulfidrilo das proteínas. A formação de hidroquinonas diminui o risco de ocorrência destas reacções tóxicas. A actividade desta enzima na epiderme é muito elevada, sendo comparável à actividade hepática [74]. A exposição de queratinócitos humanos à radiação solar ultravioleta simulada (RSUVS) ou apenas à radiação UVA traduziu-se em um aumento da expressão desta enzima [80].

Heme oxigenase

Existem 3 isoformas da heme-oxigenase, nomeadamente a HO-2 e a HO-3 que são constitutivas, e a HO-1 que é uma isoforma indutível. Esta enzima é responsável pela degradação do grupo heme, originando biliverdina (Eq. 1.6) que é posteriormente convertida em bilirrubina (Eq. 1.7), ambos potentes antioxidantes. Esta enzima estimula também a produção de ferritina, contribuindo para a redução do ferro livre [80]. A radiação UVA induz marcadamente esta enzima [81].



1.2.4.2 Sistema antioxidante não enzimático

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico tem um elevado potencial redutor, o que permite a sua participação em processos que envolvam um ou dois electrões. A sua capacidade de captar o $^1\text{O}_2$ e reagir rapidamente com o $\text{O}_2^{\cdot -}$, o $\text{HO}^{\cdot}$ e o H_2O_2 está extensamente documentada. Este composto tem também a capacidade de reduzir o radical livre tocoferilo a tocoferol [74].

A reacção do ácido ascórbico com espécies reactivas é a seguinte (Eq. 1.8):



O radical semi-de-hidroascorbato não é muito reactivo e possui um tempo de vida suficiente para ser novamente reduzido enzimaticamente a ascorbato. O semi-de-hidroascorbato pode também reagir consigo próprio de um modo não enzimático de acordo com a seguinte reacção [74] (Eq. 1.9):



O de-hidroascorbato é instável, podendo ser reduzido a ascorbato ou decompor-se. O ascorbato tem também acção pró-oxidante, a qual é dependente da presença de iões metálicos livres. O nível de iões metálicos é bastante baixo na maioria

das células pelo que a função antioxidante é predominante. A quantidade de ascorbato e de-hidroascorbato na pele é elevada, sendo de aproximadamente 6 nmol/mg de proteína [74]. Nas camadas mais internas do estrato córneo encontram-se teores mais elevados deste antioxidante, que diminuem no sentido das camadas mais externas [82].

A exposição intensa a radiação UVA+B provocou a redução dos níveis de ácido ascórbico num modelo de pele humana reconstruída [83].

Glutationa reduzida (GSH)

A GSH, um tripéptido (Glu-Cis-Gli), desempenha um papel fundamental na supressão do stress oxidativo sendo cofactor da enzima glutatona peroxidase. A GSH desempenha também um papel como antioxidante em que o grupo SH da cisteína é responsável pela sua acção antioxidante. A reacção pode ser assim descrita (Eq. 1.10):



A GSH reage com o $O_2^{\bullet-}$ mas é incapaz de inactivar o $^1O_2$. A sua concentração na pele é similar à encontrada noutros tecidos, sendo a sua concentração na epiderme cerca de duas vezes superior à da derme [74]. Foi descrita uma moderada redução dos níveis de GSH em pele de ratinho após intensa irradiação UVB [75].

Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final da degradação das purinas. Apresenta actividade captadora de $^1O_2$, ozono e radicais livres, sendo considerado por alguns autores o primordial captador de radicais livres presente no plasma. O ácido úrico exhibe também capacidade quelante de iões de ferro e de cobre [74]. Observou-se uma redução dos níveis de urato, num modelo de pele humana reconstruída, após intensa radiação UVA+B [83].

Tocoferóis

Os tocoferóis (vitamina E) são os principais antioxidantes ligados à membrana. São lipossolúveis e encontram-se na fase lipídica das membranas biológicas, orientando-se com o núcleo redox activo cromanol próximo da superfície da bicamada [74]. Como tal, os tocoferóis têm como principal função suprimir as espécies reactivas lipídicas pelo que são preponderantes na prevenção da peroxidação lipídica. O grupo hidroxilo associado ao anel aromático cede facilmente um átomo de hidrogénio a uma espécie radicalar (Eq. 1.11).



O radical tocoferilo formado é estável e pouco reactivo e apresenta duração suficiente para ser reduzido novamente a tocoferol. A sua regeneração sucede após reacção com o ácido ascórbico (Eq. 1.12).



O doseamento das diferentes isoformas da vitamina E na epiderme revelou que esta contém 1 % de α -tocotrienol, 3 % de γ -tocotrienol, 87 % de α -tocoferol e 9 % de γ tocoferol [84]. Os tocoferóis são particularmente abundantes no estrato córneo, provindo do sebo produzido nas glândulas sebáceas. Níveis mais elevados encontram-se nas camadas mais internas do estrato córneo e diminuem no sentido das camadas mais externas [82]. Os teores dos tocoferóis são rapidamente reduzidos após exposição à radiação UVB [74], tendo sido observada uma redução linear em função da dose de radiação UVA+B num modelo de pele humana reconstruída [83].

Coenzima Q

A coenzima Q (ubiquinona + ubiquinol) é uma molécula redox lipossolúvel cuja principal função está relacionada com os sistemas de transporte de electrões da membrana tais como a cadeia respiratória mitocondrial. A redução bivalente da ubiquinona origina o ubiquinol. Este último composto tem uma actividade similar ao α -tocoferol na prevenção da peroxidação lipídica, actuando sinergicamente com ele. A pele apresenta níveis elevados de ubiquinona e ubiquinol onde cerca de 70 % se encontra na forma de ubiquinona [74]. Após exposição à radiação UVB ocorre uma redução drástica dos seus níveis [74]. Estes antioxidantes foram os mais afectados pela exposição à radiação UVA+B num modelo de pele humana reconstruída [83]. A redução dos níveis de ubiquinol previamente ao tocoferol, sugere que o ubiquinol desempenha um papel protector do tocoferol através da regeneração da sua forma oxidada. Estudos *in vivo*, demonstraram também uma diminuição dos níveis da coenzima Q mais drástica do que dos níveis de tocoferóis após exposição a intensa radiação UVB [75]. Foi proposto que o efeito preventivo da apoptose (fenómeno de morte celular não seguida de autólise) exibido por este composto se relacionasse com a sua capacidade de prevenir a abertura do poro de transição da permeabilidade da mitocôndria (PTP – *Permeability transition pore*) e não com um efeito antioxidante [85].

β -caroteno

O β -caroteno é um pigmento carotenóide, lipófilo, bioprecursor da vitamina A. É um captador do $^1\text{O}_2$ e do $\text{ROO}^\bullet$ [86]. A interacção dos carotenóides com o $^1\text{O}_2$ depende em grande parte da transferência de energia entre as duas moléculas. A energia do $^1\text{O}_2$ é transferida para o carotenóide originando o oxigénio molecular e um estado excitado tripleto do carotenóide. Este estado retorna ao estado inicial dissipando a energia pela interacção com o solvente envolvente. A capacidade de desactivar o $\text{ROO}^\bullet$ depende provavelmente da formação de aductos radicais, originando um radical centrado no carbono estabilizado por ressonância. As suas propriedades antioxidantes são relevantes apenas para baixas tensões de oxigénio (inferior a 150 torr) [86]. É assim previsível que não seja muito eficaz nas camadas externas da epiderme, mas sim na proximidade da camada basal [74]. A exposição à radiação IV provoca a degradação deste carotenóide [87].

Melanina

A melanina está presente nas camadas basal e suprabasal na forma granular no interior dos melanossomas, que são produzidos nos melanócitos. Na camada espinhosa, os melanossomas desgranulam e a melanina deposita-se na forma coloidal [74]. Distinguem-se os tipos feomelanina e eumelanina. A feomelanina é um pigmento vermelho ou amarelo, solúvel em álcalis que se encontra nos indivíduos ruivos. A eumelanina tem cor castanha ou preta e é insolúvel. O papel fotoprotector da melanina é consensualmente reconhecido e apoiado em dados epidemiológicos que referem uma correlação inversa entre a pigmentação melânica e a incidência do cancro da pele. O seu efeito protector, em particular da eumelanina, está relacionado com a absorção da radiação e a sua capacidade de constituir uma barreira física, dispersando a radiação incidente. A eficácia da melanina como filtro solar proporciona um factor de protecção solar (FPS) próximo de 2. Em pele negra, a radiação que atinge a derme é cinco vezes inferior em comparação com a pele branca [88]. A protecção contra a geração de espécies reactivas foi confirmada em pele humana excisada, após comparação de pele de indivíduos de diferentes fototipos, concluindo-se que quanto maior a quantidade de melanina menor a quantidade de espécies reactivas geradas após exposição à radiação UV [49]. A sua eficácia está relacionada com a natureza reversível e não destrutiva da interacção com a radiação solar [74]. Contudo, a dicotomia fotoprotecção/fototoxicidade da melanina não está completamente esclarecida. A feomelanina sofre fotodegradação originando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 [74, 88]. Nofsinger *et al.* postularam que os estados de agregação da melanina podem ser determinantes na sua capacidade de geração de

ROS. A produção de H_2O_2 é atribuída à reacção do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com grupos hidroquinona dos oligómeros da melanina. A agregação dos oligómeros conduz à diminuição da concentração de locais de hidroquinona à superfície [89]. Estudos conduzidos em fibroblastos humanos confirmaram o efeito captador de ROS de uma melanina de origem bacteriana bem como um efeito preventivo da pigmentação e citotoxicidade mediadas pela radiação UVA, postulando assim a possibilidade de uso desta substância como filtro solar [90].

Os mecanismos responsáveis pela geração de espécies reactivas na pele após exposição solar e os sistemas antioxidantes cutâneos estão esquematicamente representados na Figura 1.4.

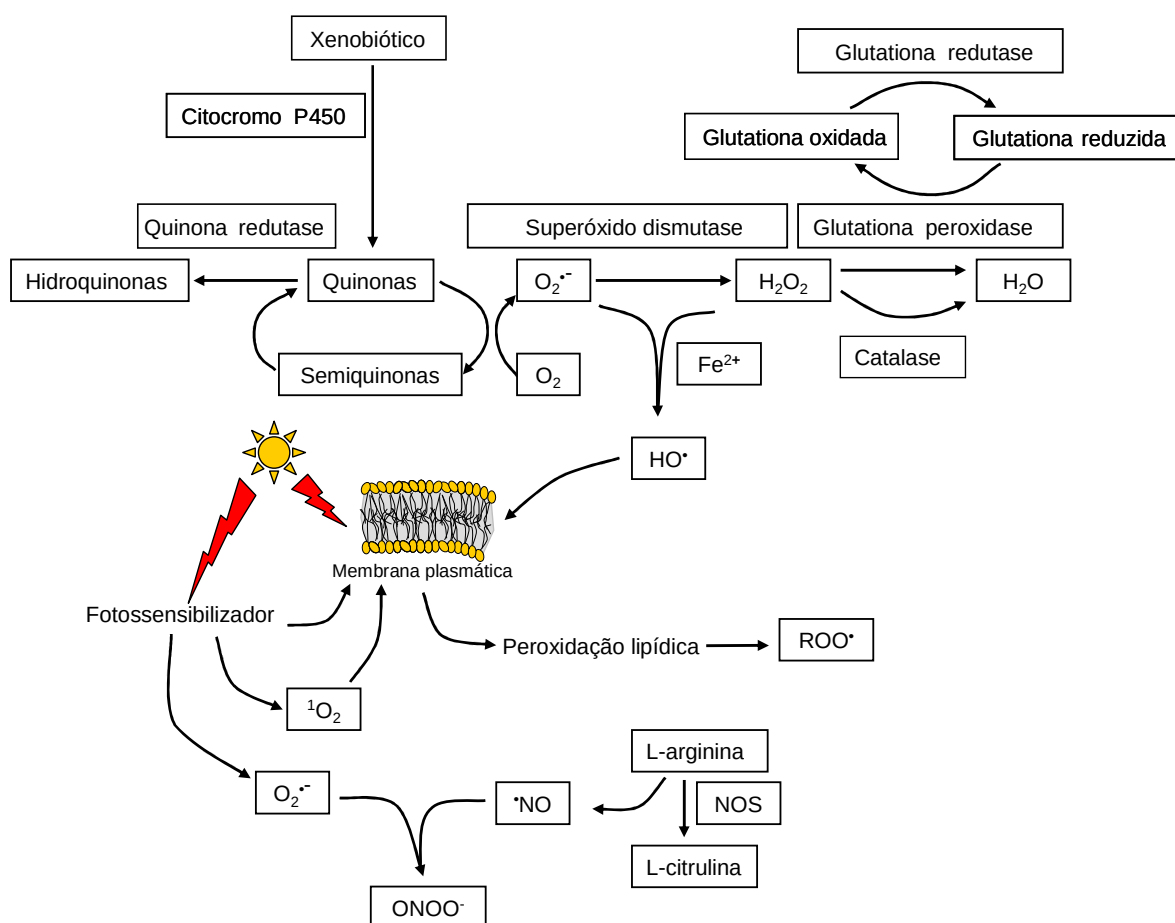


Figura 1.4. Representação esquemática das vias de produção cutânea de ROS e de RNS e dos sistemas enzimáticos de protecção. Adaptado de [91].

A Tabela 1.1 resume os constituintes do sistema antioxidante cutâneo, as suas principais acções e o efeito da exposição solar, e foi elaborada com base nas referências bibliográficas citadas anteriormente.

Tabela 1.1. Resumo dos constituintes do sistema antioxidante cutâneo

Sistema antioxidante cutâneo	Acção	Efeito da exposição solar
Sistema enzimático		
Superóxido dismutase	Catalisação da reacção: $2\text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	↓
Catalase	Catalisação da reacção: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	↓↓
Glutationa peroxidase	Catalisação das reacções: $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSH}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GSSH}$	Sem alteração
Tiorredoxina redutases	Redução da tiorredoxina oxidada na presença de NADPH e redução do H_2O_2 , peróxidos lipídicos e quinonas	↑
NADPH quinona redutase	Catalisação da redução bivalente de xenobióticos quinonas	↑
Heme oxigenase	Degradação do heme, originando biliverdina que é posteriormente convertida em bilirrubina	↑↑↑
Sistema não enzimático		
Ácido ascórbico	Captação de espécies reactivas	↓
Glutationa reduzida	Co-factor da glutathione peroxidase Captação de espécies reactivas	↓
Ácido úrico	Captação de espécies reactivas Quelatação de metais	↓
Tocoferóis	Captação de espécies reactivas lipídicas	↓↓
Coenzima Q	Prevenção da peroxidação lipídica	↓↓↓
β-caroteno	Captação de $\text{ROO}^{\cdot}$ e $^1\text{O}_2$	↓↓
Melanina	Captação de espécies reactivas e absorção da radiação UV	↑↑

↓ Redução dos níveis ou actividade do antioxidante

↑ Aumento dos níveis ou actividade do antioxidante

Intensidade do efeito crescente de ↓ a ↓↓↓ ou ↑ a ↑↑↑

1.2.5 Efeitos tóxicos das ROS e RNS na pele

As espécies reactivas geradas na pele exibem vários efeitos tóxicos tais como lesões no DNA, oxidação de lípidos e proteínas, indução da síntese e activação de mediadores inflamatórios e indução das MMP.

1.2.5.1 Lesões no DNA

Os efeitos genotóxicos da radiação UVB são essencialmente mediados pela absorção directa de fotões pelo DNA, sendo a formação de dímeros pirimidínicos a lesão mais representativa. Para radiações de comprimento de onda mais elevado assumem maior relevo os efeitos indirectos, mediados por espécies reactivas que originam quebras do DNA e modificações oxidativas dos ácidos nucleicos (ex.: 8-oxo-deoxiguanosina) [92], as quais são reparadas pelo sistema de reparação por excisão de bases (BER – *Base excision repair system*) [93]. A formação de dímeros pirimidínicos pode também ocorrer por acção da radiação UVA, necessitando esta de três a seis vezes mais energia do que a requerida pela radiação UVB [94]. As lesões no DNA incluem ainda quebras simples e ligações cruzadas com proteínas [95]. Os dímeros pirimidínicos mais descritos são os dímeros de ciclobutil pirimidina e fotoproducto 6-4. Estas lesões são normalmente reparadas pelo sistema de reparação por excisão de nucleótidos (NER – *Nucleotide excision repair*) [93]. Estes dímeros podem bloquear a replicação e transcrição do DNA e a divisão celular, resultando em toxicidade, mutagenicidade e indução de vias de sinalização celular. Os efeitos biológicos das mutações genómicas são diversos. A capacidade de reparação do DNA (sistemas BER, NER e outros) diminui em função da idade, contribuindo para uma acumulação de lesões no DNA mediadas pela radiação UV [93]. Os tumores epidérmicos relacionam-se com mutações no gene supressor tumoral p53. A proteína p53 localiza-se no núcleo das células e acumula-se após lesões no DNA, activando uma cadeia de eventos que culmina com a indução da apoptose ou a interrupção do ciclo celular. Quando ocorre mutação do gene p53, a capacidade de reparar as lesões do DNA e eliminar células altamente lesadas é reduzida [92]. A radiação UVA induz menor activação da proteína p53 do que a radiação UVB, o que poderá implicar que a exposição exclusiva a este tipo de radiação incorra em maior probabilidade de uma célula com lesões no DNA sobreviver (devido à menor resposta protectora) e originar cancro cutâneo [94]. As lesões no DNA podem também estar relacionadas com o eritema actínico, a fotoimunossupressão e a melanogénese [92] e podem também ocorrer devido à acção de produtos formados no processo de peroxidação lipídica tais como o malonildialdeído [96].

O DNA mitocondrial (mtDNA), que inclui genes que codificam a fosforilação oxidativa, também é afectado pela exposição solar. Grandes deleções do mtDNA estão presentes na pele fotoenvelhecida em comparação com a pele protegida da exposição solar. Estas deleções estão exclusivamente presentes na derme, o que sugere o contributo da radiação UVA [97]. Estudos conduzidos em humanos confirmam o efeito da radiação UVA na indução de lesões no mtDNA após exposição repetida [98]. A contribuição do $^1\text{O}_2$ nas lesões no mtDNA foi verificada em fibroblastos humanos [99].

1.2.5.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é a degradação oxidativa dos ácidos gordos (poli) insaturados. Os lípidos mais abundantes nos queratinócitos epidérmicos são o ácido esteárico (16 %), o ácido oleico (16 %), o ácido palmítico (17,5 %) e o ácido linoleico (27,4 %) pelo que é de esperar que os biomarcadores da peroxidação lipídica mais importantes sejam os produtos de degradação do ácido linoleico e oleico, uma vez que são os únicos ácidos gordos insaturados. Os lípidos biomembranares tais como os fosfolípidos e o colesterol são também alvos de ROS. Ensaio conduzidos em humanos revelaram a presença de acetaldeído e propanal após irradiação UV (maioritariamente UVA). Este processo é praticamente instantâneo, detectando-se os produtos voláteis alguns segundos após o início da irradiação [100]. A peroxidação lipídica decorre em três fases de um processo de reacção em cadeia: iniciação, propagação e finalização. A fase de iniciação assume uma importância crucial na correlação com patologias, uma vez que se ela é prevenida, teoricamente, previne-se a doença. A iniciação decorre da reacção de um agente oxidante com um lípido (LH) ou um hidroperóxido lipídico pré-existente (LOOH) originando um radical lipídico ($\text{L}^\bullet$) (Eq. 1.13), que reage rapidamente com o oxigénio formando-se um radical lipídico peróxido ($\text{LOO}^\bullet$) (Eq. 1.14) [101].



A propagação prossegue com a subtracção de um átomo de hidrogénio de uma cadeia de ácido gordo polinsaturado (Eq. 1.15), formando-se um novo radical lipídico que reage com o oxigénio e origina um novo radical $\text{LOO}^\bullet$.



O hidroperóxido lipídico (LOOH) é o primeiro produto relativamente estável da reacção de peroxidação lipídica. A finalização da peroxidação lipídica envolve a reacção de dois $\text{LOO}^{\bullet}$ que originam produtos não radiculares (Eq. 1.16) ou a reacção de $\text{LOO}^{\bullet}$ com outra espécie radicalar ou um captador de radicais livres.



Os hidroperóxidos lipídicos originam uma grande variedade de produtos incluindo aldeídos de cadeia curta e longa e aldeídos de núcleo fosfolipídico ou de éster de colesterol [102]. Várias espécies oxidantes podem participar na peroxidação lipídica. A participação do $^1\text{O}_2$ foi avaliada *in vivo*. A exposição de pele de ratinho à radiação UVA proporcionou um aumento de isómeros hidroxiocetadecadienoatos conjugados (provenientes da oxidação do ácido linoleico pelo $^1\text{O}_2$). Ensaio *in vitro* evidenciaram, também a formação de isómeros provenientes da oxidação do ácido oleico pelo $^1\text{O}_2$ e alterações mais pronunciadas do que as verificadas *in vivo* [29]. Estudos *in vitro* conduzidos com fibroblastos dérmicos demonstraram a forte contribuição do ferro, $\text{HO}^{\bullet}$, H_2O_2 e LOOH no processo de peroxidação lipídica [103]. Minami *et al.* relataram o aumento dos níveis cutâneos (em pele de ratinho) de hidroperóxidos do colesterol após irradiação UVA, em particular de um composto resultante da oxidação pelo $^1\text{O}_2$, os quais estão envolvidos na promoção da actividade da MMP-9 [104]. O $^{\bullet}\text{NO}$ tem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, captando os radicais $\text{ROO}^{\bullet}$. O $^{\bullet}\text{NO}$ evidenciou um efeito protector da apoptose mediada pela radiação UVA, efeito este observado quando a adição do radical se faz previamente ao tratamento ou após a irradiação. Este efeito foi correlacionado com a acção captadora de espécies reactivas e interrupção da propagação do fenómeno de peroxidação lipídica [105]. Estudos conduzidos *in vivo*, após irradiação UVB, verificaram uma redução da peroxidação lipídica intimamente relacionada com um aumento da expressão de iNOS, reforçando o papel protector do $^{\bullet}\text{NO}$ [54]. Lee *et al.* verificaram, em ratinhos, um aumento da peroxidação lipídica após adição de um inibidor da geração de $^{\bullet}\text{NO}$, enquanto a adição de nitroprussiato de sódio, um gerador de $^{\bullet}\text{NO}$ levou à sua supressão. Esse estudo também demonstrou que o $^{\bullet}\text{NO}$ modula *in vivo* a reacção inflamatória induzida pela radiação UVB, via uma acção vasodilatadora [55]. O mecanismo proposto para a supressão da peroxidação lipídica envolve o aumento da perfusão sanguínea mediada pelo $^{\bullet}\text{NO}$, o qual pode levar a um aumento da capacidade de eliminação dos LOOH. O aumento do volume tecidual

provocado pela reacção inflamatória poderá também exercer um efeito de diluição dos LOOH [55]. Um mecanismo alternativo poderá estar relacionado com a acção antioxidante do $\cdot\text{NO}$, tal como sugerido noutros estudos [105]. No entanto, na presença do $\text{O}_2^{\cdot-}$, o $\cdot\text{NO}$ origina o ONOO^- que é um oxidante potente capaz de iniciar a peroxidação lipídica e oxidar os antioxidantes lipófilos [106].

1.2.5.3 Oxidação proteica

A quebra oxidativa de proteínas ou a oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina ou treonina podem originar grupos carbonilo nas proteínas. É também possível que os grupos carbonilo sejam introduzidos nas proteínas por reacção de aldeídos produzidos na peroxidação lipídica (ex.: malonildialdeído) com resíduos de lisina [96]. Estas modificações oxidativas resultam em alterações funcionais das proteínas estruturais ou enzimáticas cutâneas [107]. Na pele fotoenvelhecida, estão presentes elevadas quantidades de proteínas oxidadas na derme papilar, contrastando com o que sucede na epiderme, o que poderá justificar-se pela maior capacidade antioxidante da epiderme [107]. Para além da exposição crónica, a exposição aguda à radiação UV leva também à formação de grupos carbonilo nas proteínas das camadas mais superficiais da epiderme e da derme papilar [107]. As proteínas envolvidas podem incluir a queratina, o colagénio e a elastina. A presença das proteínas oxidadas na pele cronicamente exposta ao sol pode constituir um indicador de ausência da sua degradação por proteases (em particular pelo proteossoma), possivelmente devido à sua elevada agregação e reticulação [108]. É também sabido que durante o envelhecimento ocorre redução da actividade proteolítica do proteossoma [108]. Bulteau *et al.* reportaram também o efeito das radiações UVA e UVB na redução da actividade do proteossoma em queratinócitos humanos [109], o qual pode contribuir para a acumulação de proteínas oxidadas, conduzindo à elastose solar (acumulação dérmica de material amorfo maioritariamente constituído por elastina) associada em particular a alterações da elastina) e envelhecimento prematuro. Quer a radiação UVA quer a UVB são responsáveis pela oxidação das proteínas. As espécies reactivas envolvidas podem incluir o H_2O_2 que demonstrou capacidade de oxidar as proteínas quer em fibroblastos quer em queratinócitos humanos [107], e o $^1\text{O}_2$, que é capaz de oxidar a histidina originando produtos reticulados [110].

1.2.5.4 Indução das metaloproteases da matriz (MMP)

As ROS induzem a síntese e activação das MMP e inactivam os seus inibidores (TIMP – *Tissue inhibitor of metalloproteinases*). A família das MMP está continuamente a

aumentar, tendo sido até à data identificadas 28 enzimas. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de vários componentes do tecido conjuntivo, sabendo-se que as radiações UVA e UVB induzem a sua expressão de um modo dependente da dose [111]. A MMP 1 (colagenase intersticial) quebra preferencialmente o colagénio tipo I, enquanto a MMP 2 degrada a elastina bem como componentes da membrana basal, tais como os colagénios tipo IV e tipo VII. A MMP 3 apresenta uma ampla especificidade de substrato, que inclui o colagénio tipo IV, proteoglicanos, fibronectina e laminina. A fibrilina é um alvo do ataque proteolítico das MMP e de proteinases independentes das MMP tais como a elastase dos neutrófilos. Com a excepção das MMP 8 e MMP 9, originadas nos neutrófilos, que são armazenadas prontas para serem libertadas, a síntese e secreção das MMP resultam de passos de transdução de sinal rigorosamente controlados [112]. Uma das hipóteses proposta para a activação de receptores mediada pela radiação UV envolve as ROS, que poderão oxidar (e consequentemente inibir) as fosfatases da tirosina de proteínas específicas. Ao serem inibidas levam à fosforilação dos receptores e consequentemente à sua activação, levando por meio de uma cascata de transdução de sinal, (onde estão envolvidas cinases de proteínas activadas pelo mitogénio, MAPK – *Mitogen activated protein kinases*), à activação do factor de transcrição nuclear AP-1 (*Activator protein-1*). Este estimula a transcrição de genes das MMP 1, 3 e 9. Nos fibroblastos dérmicos também interfere com a expressão do gene que codifica para o colagénio, levando à redução da sua síntese (Figura 1.5) [113].

Evidências indirectas sugerem que o $^1\text{O}_2$ e o H_2O_2 são os principais responsáveis pela indução dependente da radiação UVA das MMP 1, 2, 3 enquanto o $\text{HO}^\bullet$ e intermediários da peroxidação lipídica desempenham um papel relevante na indução pela radiação UVB das MMP 1 e 3 [112]. A radiação IV tem a capacidade de penetrar na pele, atingindo inclusive o tecido subcutâneo, e promover a expressão dos genes MMP-1. ROS de origem mitocondrial foram descritas como as responsáveis pela indução da transcrição e tradução dos genes que codificam a MMP-1, mediada pela radiação IV [60]. Rijken *et al.* propuseram que os neutrófilos, que infiltram a pele após exposição à radiação solar, possam desempenhar um importante contributo no fotoenvelhecimento pela libertação de MMP-1, MMP-9 e elastase [114].

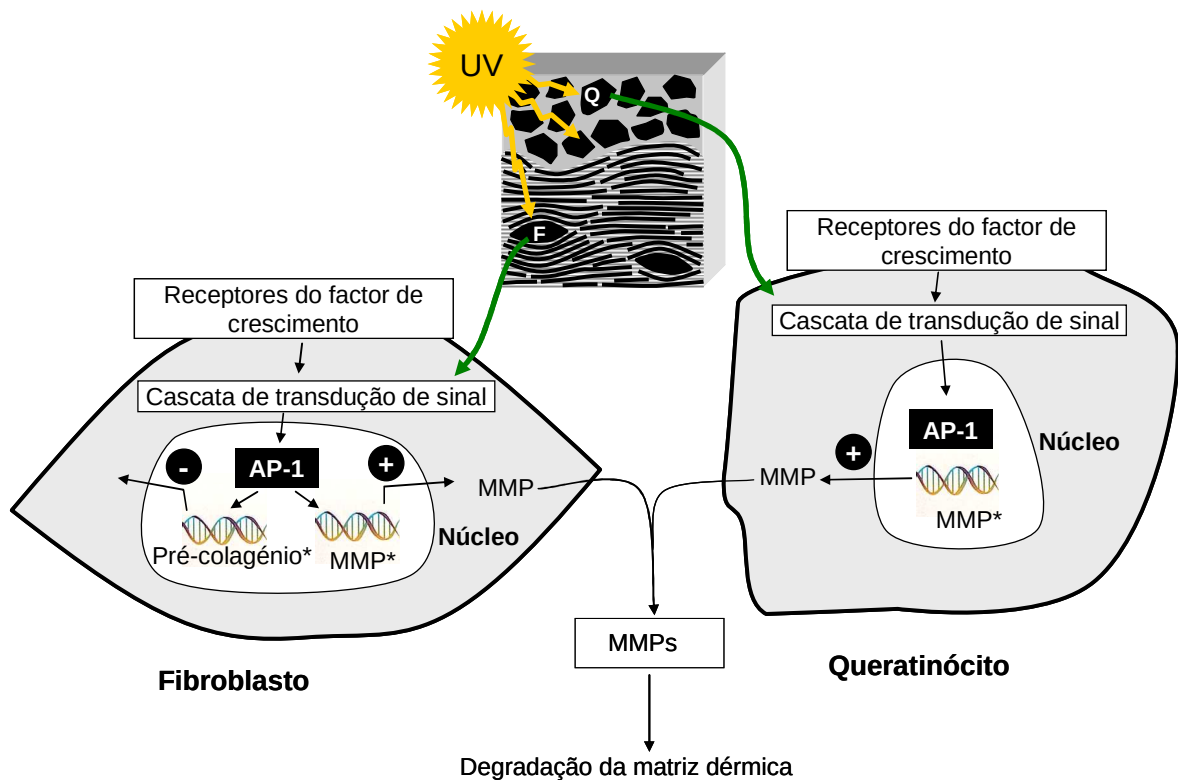


Figura 1.5. Representação esquemática das vias de sinalização conducentes à expressão das MMPs. Adaptado de [113].

A acção das MMP, ao provocar a degradação do colagénio e de outros constituintes da matriz dérmica, origina alterações características do fenótipo da pele fotoenvelhecida tais como rugas, perda da elasticidade e da firmeza cutâneas.

1.2.5.5 Acção inflamatória e imunossupressora

A reacção inflamatória subsequente à exposição solar compreende a vasodilatação e o eritema. Estes efeitos inflamatórios não se devem à produção de uma única substância mas são o reflexo de um processo multifactorial em que o $^*NO$ e as prostaglandinas desempenham um papel relevante [115]. Observa-se edema intra e inter-celular e formação de células apoptóticas (células *sunburn*) [115]. Após exposição à radiação UV verifica-se a presença de um infiltrado inflamatório que contém diferentes tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos T [114]. Os mecanismos moleculares e celulares que conduzem a estas respostas não estão totalmente elucidados.

A radiação UV activa o factor de transcrição NF- κB (*Nuclear factor κB*), o qual estimula a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (ICAM – *Intercellular adhesion molecules*) [116]. Foi demonstrado que após exposição da

pele humana a radiação solar simulada (RSS) são induzidas as interleucinas 10 (IL-10), IL-1 β e o factor de necrose tumoral (TNF- α) [117]. Este último promove a indução de outras citocinas e contribui para o recrutamento de células via alteração da expressão de ICAM [115].

A radiação UVB induz em pele humana aumentos dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 [118], IL-4, IL-2, IL-12 e do factor de crescimento 1 β (TGF- β 1 – *Transforming growth factor* β 1) [119] e a radiação UVA promove uma forte expressão da IL-8 demonstrada em queratinócitos humanos, mediada pela acção de ROS e associada à activação da NADPH oxidase [120]. Esta radiação induziu também a expressão de IL-1 β e TNF- α em queratinócitos humanos [121]. A produção de interleucinas após exposição à radiação solar, em particular a IL-10, parece envolver as células que infiltram a pele tais como neutrófilos, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas [122].

A promoção da expressão das ICAM pela radiação UVA envolve, aparentemente, a geração de $^1\text{O}_2$. As ceramidas também contribuem para a expressão das ICAM nos queratinócitos. O aumento da produção de ceramidas observada após irradiação UVA também é putativamente mediado pelo $^1\text{O}_2$, por meio de um mecanismo não enzimático [97].

A acção imunossupressora da radiação UV, em particular da radiação UVB está associada à geração de células T supressoras que inibem células efectoras do tipo Th1 [115]. Para o efeito imunossupressor parecem contribuir lesões no DNA e a fotoisomerização do ácido *trans*-urocânico. É interessante referir que foi proposto que a radiação UVA, se administrada previamente à radiação UVB, desempenhe uma acção fotoimunoprotectora [123], putativamente mediada pela HO [124].

1.2.6 Stress oxidativo e dermatoses

O papel das ROS e RNS em estados patológicos está amplamente documentado [3], sendo vários os exemplos de dermatoses intimamente ligadas ao stress oxidativo [91, 125, 126]. Serão referidos com maior detalhe alguns exemplos mais representativos.

1.2.6.1 Psoríase

A psoríase é uma dermatose crónica eritematodescamativa que se caracteriza por hiperproliferação celular associada a uma incompleta diferenciação. Esta dermatose está também associada a um marcado estado inflamatório ao nível da derme e epiderme, com o recrutamento de células T, monócitos/macrófagos e de leucócitos polimorfonucleares nas lesões psoriáticas ou na sua proximidade [127]. As ROS, como por exemplo o $\text{O}_2^{\cdot-}$,

desempenham um papel controlador, o qual é evidenciado pela elevada produção deste radical pelos fibroblastos em lesões psoriáticas [128]. Os neutrófilos activados contribuem também para um aumento da produção do $O_2^{\cdot-}$ via NADPH oxidase.

Vários estudos apontam para a relevância da expressão da HO nos processos inflamatórios, a qual exerce a sua acção antioxidante por meio da degradação do grupo heme em monóxido de carbono, ferro e biliverdina, esta última subsequentemente reduzida ao potente antioxidante bilirrubina. Foi demonstrado um marcado aumento da expressão desta enzima na pele psoriática [129]. As ROS poderão ser os indutores do aumento da expressão da HO, tendo sido demonstrado que a adição de menadiona a queratinócitos, que leva à produção contínua de $O_2^{\cdot-}$, provoca um intenso e prolongado aumento da expressão do mRNA da HO [130]. O $^{\cdot}NO$ poderá também contribuir para a sua indução nos estados inflamatórios cutâneos. O papel da enzima na patologia da psoríase não está totalmente elucidado, tendo sido proposto que contribua para a hiperproliferação dos queratinócitos [129]. Vários estudos referem a produção do $^{\cdot}NO$ na psoríase, tendo-se verificado um aumento da expressão da iNOS em queratinócitos da epiderme de lesões psoriáticas [131]. Diversos fármacos antipsoriáticos, tais como o metotrexato e a ciclosporina, têm a capacidade de inibir a produção do $^{\cdot}NO$, o que reforça o papel deste radical na etiopatogenia desta dermatose. Foi também proposto que a exacerbação da psoríase em consequência de infecção e trauma possa envolver o $^{\cdot}NO$ [130]. A produção simultânea de $O_2^{\cdot-}$ e $^{\cdot}NO$ nas lesões psoriáticas sugere a putativa produção do $ONOO^{\cdot-}$, decorrente da sua reacção.

A eficácia terapêutica do ditranol, agente antipsoriático, poderá estar relacionada com a sua capacidade de gerar ROS e radicais antrona na pele. O stress oxidativo pode apresentar simultaneamente um efeito nos mecanismos terapêuticos e nos efeitos secundários de diversos fármacos antipsoriáticos [130].

1.2.6.2 Dermatite atópica

A dermatite atópica é uma inflamação crónica pruriginosa das camadas superficiais da pele. É a doença crónica da pele mais comum na criança e caracteristicamente possui uma evolução cíclica com períodos de remissão e exacerbação. A dermatite atópica ocorre geralmente em crianças que têm doenças alérgicas, como asma e rinite alérgica, ou em crianças que têm uma história de alergias na família. A inflamação cutânea na dermatite atópica é caracterizada histologicamente pela intensa infiltração de linfócitos, monócitos e eosinófilos. Estas células libertam substâncias bioactivas tais como citocinas pró-inflamatórias e ROS, como o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 e o $ONOO^{\cdot-}$ em função da estimulação imunológica e não imunológica. Os leucócitos

polimorfonucleares circulantes nos pacientes com dermatite atópica são hiper-reactivos, apresentando uma produção aumentada de ROS, mesmo em estado de repouso [130]. O papel das ROS na dermatite atópica foi revisto por Okayama (2005), que descreve o aumento de vários marcadores de lesões oxidativas em pacientes com dermatite atópica [125].

1.2.6.3 Acne

A acne é uma dermatose inflamatória dos folículos pilossebáceos. A produção de ROS pelos neutrófilos está implicada na destruição da parede folicular, responsável pelo processo inflamatório acneico. O ácido linoleico inibe a produção do $\text{HO}^\bullet$, do H_2O_2 e do $\text{O}_2^\bullet$ pelos neutrófilos. Nas lesões comedónicas a proporção de ácido linoleico está significativamente diminuída pelo que a produção excessiva de ROS se deve à redução do inibidor. A eficácia de alguns antibióticos, tais como o metronidazol, na terapêutica da acne parece estar, em certa medida, relacionada com a sua capacidade antioxidante [130].

1.2.6.4 Dermatite de contacto irritativa

A dermatite de contacto irritativa é uma reacção cutânea, local, inflamatória e não imunológica à exposição a substâncias irritantes. Algumas destas substâncias, tais como hidroperóxidos, sais metálicos e aminas primárias têm a capacidade de gerar espécies reactivas. Os queratinócitos desempenham um papel primordial na patofisiologia da dermatite de contacto irritativa, via geração de citocinas pró-inflamatórias como a $\text{IL-1 } \alpha$ e o $\text{TNF-}\alpha$. Os compostos irritantes também induzem a produção de NO pelos queratinócitos. Corroborando o papel do stress oxidativo nesta patologia, verificou-se que a aplicação tópica de antioxidantes preveniu a irritação cutânea [130].

1.2.6.5 Vitiligo

O vitiligo é uma dermatose adquirida caracterizada pela perda da funcionalidade dos melanócitos epidérmicos, manifestando-se por máculas hipopigmentadas. A etiologia do vitiligo relaciona-se com um processo auto-imune, existindo contudo dados experimentais que corroboram um mecanismo não imunológico envolvendo a produção de espécies reactivas [132]. O stress oxidativo foi proposto como o evento inicial na degeneração dos melanócitos [130]. Níveis reduzidos de catalase, ubiquinol, vitamina E e glutathione foram descritos na epiderme de doentes com vitiligo [133] Corroborando a tese do envolvimento de espécies reactivas na patofisiologia do vitiligo, a administração de

antioxidantes em associação com a fototerapia demonstrou ser eficaz no seu tratamento [134].

1.2.6.6 Erupção polimorfa solar

A erupção polimorfa solar é uma fotodermatose muito comum caracterizada maioritariamente por pequenas pápulas pruriginosas, que surgem horas ou dias após exposição ao sol, podendo apresentar outras manifestações clínicas.

O efeito de antioxidantes na prevenção desta dermatose [135, 136] pode ser interpretado como uma contribuição das espécies reactivas para a sua etiologia.

1.2.6.7 Carcinoma da pele

Os tumores cutâneos compreendem o carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e o melanoma. O carcinoma de células basais ocorre quase exclusivamente nas áreas da pele que possuem folículos pilosos. O carcinoma das células escamosas é uma proliferação maligna dos queratinócitos da epiderme e o melanoma tem origem nos melanócitos e apresenta maior índice de mortalidade. O principal factor de risco para o cancro da pele é a exposição à luz solar. O número acumulado de horas de exposição à luz parece correlacionar-se positivamente com o aumento do risco do carcinoma das células escamosas. Para os outros tumores, parece ser mais importante o padrão e a intensidade da exposição [137]. Lund *et al.* propuseram que após exposição solar intensa poderá ser atingido um limiar a partir do qual a melanina pode desempenhar um efeito fotossensibilizador [138]. Esta proposta corrobora os dados epidemiológicos que demonstram que os melanomas parecem ser mais frequentes em situações de exposição solar intensa intermitente. Não está perfeitamente elucidado o mecanismo pelo qual a exposição ao sol conduz ao desenvolvimento de tumores na pele. Os tumores não-melanoma parecem relacionar-se mais directamente com a radiação UVB. O papel das UVA no melanoma foi sugerido como muito relevante, com base na caracterização das mutações genómicas. Mutações do DNA características do stress oxidativo foram identificadas em melanomas, o que aponta para acção da radiação UVA. O facto desta radiação possuir maior poder de penetração na pele, alcançando assim os melanócitos localizados na camada basal, reforça a sua importante contribuição para o desenvolvimento do melanoma [138].

O desenvolvimento do cancro cutâneo é um processo complexo que inclui um sistema com três etapas – iniciação-promoção-progressão – mediado via modificações de natureza celular, bioquímica e molecular. Nas três etapas foi demonstrado o envolvimento de ROS. A primeira etapa, iniciação, constitui uma alteração do genótipo

celular. No decurso do stress oxidativo ocorrem lesões no DNA devidas à acção directa das espécies reactivas, ocorrendo a activação de endonucleases dependentes do Ca^{2+} que produzem quebras nas cadeias de DNA. Lesões extensas no DNA originam mutações, alterações da expressão fenotípica e morte celular. A fase de promoção, processo de amplificação das células com genótipo alterado, inclui duas etapas: conversão e propagação. Os promotores de tumores podem exercer o seu efeito na diferenciação e proliferação celular por meio de ROS. A progressão dos tumores envolve a expansão clonal de células “iniciadas” como resposta a promotores de tumores, levando à malignidade [139]. O contributo de espécies reactivas para a etiopatogenia do cancro da pele é também fundamentado na evidência de efeitos preventivos da administração de antioxidantes [140].

1.3 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DOS DANOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO SOL

1.3.1 Protectores solares

A fotoprotecção é assegurada em primeira linha pelo uso de filtros solares, frequentemente em associação, com o objectivo de se obter um elevado FPS. Os filtros solares subdividem-se em inorgânicos ou físicos e orgânicos, químicos ou selectivos. O princípio da fotoprotecção dos filtros solares orgânicos é a absorção da radiação UV. A estrutura responsável pela absorção designa-se cromóforo e na sua generalidade compreende compostos aromáticos e dois grupos funcionais, dadores e receptores de electrões. Após irradiação UV, ocorre deslocalização de electrões obtendo-se um estado excitado de maior energia [141]. Os filtros químicos pertencem às seguintes famílias químicas: salicilatos, ácido *p*-aminobenzóico, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos, cânforas e outros [44]. As desvantagens destes filtros relacionam-se com reacções fotoalérgicas e baixa fotoestabilidade [141]. Os filtros inorgânicos reflectem e dispersam a radiação incidente em vez de a absorver. No entanto, também reflectem a luz visível do espectro solar, o que resulta numa pigmentação branca da pele. O facto de se encontrarem em dispersão origina formulações de elevada viscosidade, com o consequente compromisso da espalhabilidade. Alterações tecnológicas tais como a micronização e nanoencapsulação melhoram estes efeitos embora possam modificar as propriedades de protecção solar. A micronização conduz a um efeito de absorção da radiação, para além da dispersão e reflexão, e desvia a acção protectora para a gama UVB [141, 142]. Óxido de zinco, dióxido de titânio, óxido de ferro, caulino, talco e calamina são exemplos de filtros inorgânicos.

O papel dos protectores solares na prevenção do cancro da pele não está suficientemente elucidado. A incidência do melanoma é mais elevada na Europa, América do Norte e Oceânia e tem aumentado em populações caucasianas em todo o mundo [143]. A mortalidade demonstra uma tendência semelhante, designadamente em Portugal [137], mas aparentemente a um ritmo menor, provavelmente devido a uma detecção e tratamento mais precoces [137]. Postulou-se que a utilização de protectores solares previne provavelmente o carcinoma cutâneo de células escamosas, especialmente no caso de exposições solares não intencionais. No entanto, não é conclusivo o seu efeito preventivo do carcinoma das células basais e do melanoma cutâneo. Propôs-se que a utilização de protectores solares contribua para o prolongamento da duração da exposição solar intencional ao sol, o que poderia conduzir a um maior risco de ocorrência do melanoma cutâneo [144]. Este tema é contudo pouco consensual e permanece em discussão. Factores como a quantidade de protector solar aplicada, a heterogeneidade da aplicação cutânea e o comprometimento da aderência do protector à pele por factores como a imersão em água ou a abrasão na areia da praia ou toalhas poderão ser decisivos [137]. Os dados inconclusivos do efeito preventivo dos protectores solares no melanoma poderão estar relacionados com o facto dos estudos terem sido conduzidos num espaço temporal em que os protectores solares e padrões da sua utilização apresentavam características bem distintas dos actuais. A evolução dos protectores solares decorreu no sentido de obter valores de FPS mais elevados e com maior efeito preventivo das radiações UVA. Em 1984 os protectores mais usados tinham valores de FPS entre 4 e 5, em 1987 entre 6 e 10 e em 1997 aproximavam-se do factor 15. Actualmente, a União Europeia estipula 8 categorias de FPS, em que a de protecção mais baixa corresponde a um FPS de 6 e a de protecção mais elevada apresenta FPS superior a 50. Para além disso, a divulgação dos cuidados de exposição ao sol incluindo o uso de vestuário protector e a aplicação de quantidades adequadas de protector solar permitem especular que, no futuro, o efeito do uso de protectores poderá ter um impacto significativo na redução da incidência do melanoma [145].

Alguns estudos documentaram também que a fotoprotecção conferida pelo uso de filtros solares não proporciona uma prevenção eficaz dos efeitos mediados por ROS ou RNS. Estudos conduzidos em queratinócitos demonstraram a ausência de efeito preventivo, exercido pelo filtro 4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (filtro UVA), do stress oxidativo, peroxidação lipídica e morte celular induzidos pela radiação UVA [146]. Estudos conduzidos em pele humana verificaram uma baixa eficácia de três protectores solares na diminuição da geração de espécies reactivas após irradiação UVA [147]. Foi descrito por vários autores o envolvimento dos filtros solares na produção de espécies reactivas, em consequência da sua fotodegradação. Este efeito foi verificado para os

filtros octocrileno, octilmetoxicinamato, benzofenona-3, ácido sulfónico fenilbenzilimidazol e 4-*tert*-butil-4'-metoxidibenzoilmetano [148-150]. O tempo de permanência do filtro solar é determinante na produção de ROS [151]. Os filtros inorgânicos também estão envolvidos na fotogeração de espécies reactivas [152]. O recurso à optimização tecnológica e a estratégias diversas, como a complexação com ciclodextrinas [148, 149] ou a microencapsulação [153], foi estudado com sucesso na minimização da fotodegradação dos filtros solares. Neste contexto, a associação de filtros solares e antioxidantes afigura-se como mais eficaz na fotoprotecção [150, 154-157]. A síntese de filtros solares com actividade antioxidante [158, 159] e a associação de filtros solares com agentes quelantes de ferro foram outras estratégias investigadas [160].

1.3.2 Reforço do sistema enzimático antioxidante

Uma das estratégias descrita para prevenir os efeitos da sobreexposição à radiação solar é o reforço do sistema enzimático, por via da aplicação cutânea de enzimas presentes no tecido cutâneo e cuja actividade é reduzida pela exposição solar.

A aplicação cutânea de um creme com SOD apresentou a capacidade de inibir *in vivo* a acção eritematogénica da radiação UVB [161]. A administração desta enzima na forma de lipossomas também apresentou eficácia na prevenção dos danos mediados pela radiação UV [162]. O uso de uma substância com actividade mimética da SOD e da catalase, previamente à irradiação UVA, originou uma redução do nível de lipoperóxidos cutâneos. Este efeito foi também observado quando a aplicação se efectuou após o período de irradiação [163]. A terapia génica com vista a uma maior expressão da catalase foi também proposta, com base em estudos que documentam a protecção da apoptose induzida pela radiação UVB, observada após indução da expressão da catalase em queratinócitos humanos [78].

1.3.3 Administração de antioxidantes

Face ao envolvimento de espécies reactivas nos efeitos cutâneos induzidos pela exposição solar, tem sido amplamente estudada a utilização de substâncias antioxidantes, quer naturais quer sintéticas, para prevenir ou minimizar essas agressões. Serão agora referidas as substâncias antioxidantes mais estudadas.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um potente antioxidante, sendo contudo muito instável do ponto de vista químico. Estudos *in vitro* confirmam a sua actividade sequestradora de espécies reactivas tais como o $^1\text{O}_2$ [164], o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o $\text{HO}^{\cdot}$ [165], o H_2O_2 [166] e o ONOO^-

[167] e a eficácia na prevenção da produção de ROS em culturas celulares, quando adicionado antes da exposição à radiação solar [168]. Contudo, estudos conduzidos em humanos, na concentração de 5 %, revelaram efeitos modestos [169], ou mesmo ineficácia na prevenção da reacção eritematosa quando a aplicação se efectuou após o período de irradiação [170]. Os autores postularam que os antioxidantes apresentam eficácia apenas se estiverem presentes, em concentração adequada, nas camadas superficiais da pele nas fases iniciais de geração do stress oxidativo [170].

Lin *et al.* verificaram que absorção percutânea de ácido ascórbico era máxima após três dias de aplicação e para baixos valores de pH [171]. A sua eficácia em formulações tópicas está também dependente da presença do isómero L, de concentrações elevadas, de um pH abaixo do pKa e de condições que assegurem a sua estabilidade [172]. O não cumprimento dos requisitos referidos pode justificar o reduzido efeito verificado em alguns estudos. A aplicação durante quatro dias em pele de porco de uma preparação aquosa com pH 3,2 (15 %) conduziu a uma significativa redução do eritema e das células *sunburn*, mediados pela radiação UVA+B [171]. Além da sua eficácia antioxidante, o ácido ascórbico também apresenta efeitos pró-oxidantes, na presença de metais [173, 174], cuja importância biológica não está completamente esclarecida. Vários derivados mais estáveis do ácido ascórbico, quer hidrófilos quer lipófilos, foram estudados na prevenção dos efeitos mediados pela radiação solar. O fosfato de ascorbilo e sódio apresentou uma maior eficácia na captação de espécies reactivas, *in vivo*, em comparação com o derivado lipófilo palmitato de ascorbilo [175]. Este derivado lipófilo do ácido ascórbico apresenta uma eficácia controversa, uma vez que, a par da redução da produção de ROS [176], promove a peroxidação lipídica e apresenta um efeito citotóxico. Estes efeitos foram atribuídos à porção lipófila da molécula e ao seu papel na geração de metabolitos lipídicos oxidados com acção tóxica [177]. Um outro derivado lipófilo, o ácido tetra-isopalmitoil ascórbico, origina o ácido ascórbico em condições fisiológicas e demonstrou capacidade supressora da pigmentação cutânea mediada pela radiação UVB num modelo de pele reconstruída [178].

Para além dos efeitos preventivos, alguns antioxidantes foram também estudados no tratamento da pele fotoenvelhecida. O tratamento prolongado (6 meses) com um creme com ácido ascórbico (5 %) foi eficaz na redução das rugas e na melhoria da firmeza cutânea [179]. A sua acção estimuladora da síntese de colagénio [180] poderá ter sido determinante para a eficácia observada, sendo a contribuição do efeito antioxidante questionável. O ácido ascórbico tem também acção despigmentante, via inibição da tirosinase, a enzima responsável pela síntese de melanina, exibindo eficácia no tratamento do melasma e do lentigo solar [181].

Tocoferóis

Os tocoferóis apresentam *in vitro* actividade captadora de espécies reactivas. A sua lipofilia contribui para uma localização membranar e para uma acção preventiva da peroxidação lipídica. Os tocoferóis apresentaram também uma acção preventiva da produção de ROS induzida pela radiação UVB em queratinócitos [168]. Um estudo conduzido em ratinhos demonstrou a eficácia da aplicação tópica de α -tocoferol na prevenção das lesões no DNA induzidas pela radiação UVB. Este efeito foi muito superior ao verificado com outros tocoferóis [182]. As suas propriedades de absorção da radiação UVB, para além da actividade antioxidante, podem ter contribuído para a eficácia observada. Após aplicação durante quatro dias em pele de porco, observou-se uma redução das células *sunburn* mas um efeito pouco relevante na redução do eritema mediado pela radiação UVA+B [171]. Estudos em humanos demonstraram uma eficácia modesta na prevenção do eritema induzido pela radiação UVB [156], em concordância com o estudo anterior. Quando a aplicação se efectuou após a exposição solar o α -tocoferol foi ineficaz quer em aplicação única ou aplicação repetida [170]. Derivados da vitamina E, particularmente ésteres como os acetatos e os succinatos, são usados comercialmente devido à sua maior estabilidade. No entanto, estes ésteres têm que ser hidrolisados *in vivo* para exibir actividade e a pele possui uma capacidade limitada para quebrar as ligações éster [172]. O uso de um derivado hidrófilo do γ -tocoferol, o cloridrato de γ -tocoferol-N,N-dimetilglicinato, que se converte *in vivo* em γ -tocoferol, reduziu o edema e o aumento da síntese de prostaglandina E_2 catalisada pela COX 2, induzidos pela irradiação UVA de pele de ratinho. Este efeito verificou-se com pré ou pós-tratamento e foi atribuído à supressão da expressão da iNOS, à acção antioxidante e à acção inibitória directa da actividade da COX 2 [183].

Coenzima Q

A coenzima Q (ubiquinona + ubiquinol), um antioxidante presente na pele, demonstrou capacidade de suprimir o aumento de vários mediadores inflamatórios e da MMP-1 decorrente da exposição à radiação UV de fibroblastos humanos [184]. Para além da influência da actividade antioxidante, a sua actividade anti-apoptótica está também relacionada com a capacidade inibitória da despolarização da membrana mitocondrial, constatada em cultura de células [85]. A idebanona é um derivado sintético da ubiquinona, com a vantagem de ser mais solúvel, que apresenta uma forte acção antioxidante [185]. Um efeito anti-ruga foi reportado em humanos após aplicação tópica durante quatro semanas [186]. Outro estudo concluiu que a aplicação tópica durante

quatro dias de ubiquinona ou de idebanona apresenta uma protecção ineficaz face à radiação UVA+B [187].

Carotenóides

O β -caroteno, precursor da vitamina A, apresenta efeito captador de ROS em particular do $^1\text{O}_2$ e $\text{ROO}^\bullet$ [86]. O seu papel como antioxidante cutâneo não está suficientemente esclarecido. Estudos efectuados em fibroblastos humanos demonstraram um efeito indutor da IL-6 [188] e da HO-1 [189] mediado pela radiação UVA, o qual pode traduzir-se num efeito pró-inflamatório e pró-oxidante.

A aplicação cutânea de licopeno, um carotenóide insaturado responsável pela cor vermelha de diferentes frutos, apresentou uma capacidade protectora do eritema induzido por radiação solar simulada (RSS) em pele humana superior à verificada com uma associação de vitamina C e vitamina E [190]. Carotenóides incolores, o fitoeno e o fitoflueno, inibiram mediadores inflamatórios produzidos pelos fibroblastos após exposição à radiação UV, além de actuarem sinergicamente com a coenzima Q10 [191].

Polifenóis

O termo polifenóis compreende aproximadamente 8000 compostos naturais, que possuem uma característica estrutural comum: um anel aromático com pelo menos um substituinte hidroxilo (fenol). De especial relevo são os grupos dos ácidos fenólicos, dos flavonóides e dos polifenóis de elevado peso molecular. Os ácidos fenólicos contêm dois esqueletos carbonados distintos: estrutura do ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico. Os flavonóides são um grande grupo de substâncias polifenólicas de baixo peso molecular que têm por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzopirona). Os flavonóides podem ocorrer na forma de genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados [192]. Os polifenóis de elevado peso molecular são compostos poliméricos conhecidos como taninos. Subdividem-se genericamente em condensados (polímeros de catequinas e epicatequinas) e hidrolisáveis (polímeros dos ácidos elágico e gálgico) [193]. Atendendo às características estruturais conhecidas na actualidade os taninos podem ser classificados como galhotaninos, elagitaninos, taninos condensados e taninos complexos (ligados a flavanóis) [192].

Os polifenóis apresentam diversas actividades biológicas, incluindo acção antivírica, antialérgica, anti-hipertensora, anti-inflamatória, anticarcinogénica e hipocolesterolémica, sendo potentes antioxidantes [194, 195]. Em contraste com os referidos benéficos, também foram documentados efeitos tóxicos [196, 197].

Com base nas suas propriedades antioxidantes, tem sido estudada a sua utilização na prevenção dos danos cutâneos adstritos à exposição solar. Os estudos que

referem a sua utilização incluem o uso de polifenóis isolados ou incluídos em extractos, onde a ocorrência de efeitos sinérgicos é possibilitada. A Tabela 1.2 reúne os estudos *in vivo* que versam sobre a aplicação de polifenóis na prevenção e/ou tratamento dos efeitos cutâneos da exposição solar, mediados por espécies reactivas. A parte experimental desta tese é dedicada à preparação de extractos que contêm polifenóis na sua composição e à sua incorporação em preparações de administração cutânea, razão pela qual aqui se atribui especial destaque aos estudos levados a cabo com este tipo de compostos.

Tabela 1.2. Estudos *in vivo* demonstrativos do efeito de polifenóis na prevenção e/ou tratamento dos danos induzidos pela radiação solar

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Polifenóis do chá verde (PCV) (<i>Camellia sinensis</i>)	Prevenção da oxidação proteica e inibição da expressão das MMP 2, 3, 7 e 9 após irradiação UVB durante 2 meses [198]	Administração oral na água (0,2 % m/V) durante 10 dias previamente à irradiação e até 24 após	Ratinho n= 5
	Redução do eritema induzido pela exposição à radiação solar simulada (RSS) e radiação UVA, e redução de células <i>sunburn</i> e lesões no DNA após RSS [199]	Aplicação cutânea de 200 µl de solução hidroalcoólica de PCV e compostos isolados (1 - 10 %) 30 min previamente à irradiação	Homem n= 5-6
	Prevenção da redução de enzimas antioxidantes e inibição do stress oxidativo induzidos por dose única ou múltipla (10 dias) de radiação UVB, sendo o efeito após aplicação cutânea superior ao observado com a administração oral e semelhante entre PCV e EGCG [200]	Aplicação cutânea de PCV e EGCG em pomada hidrófila (10% m/m, 1mg/cm ²) 20 – 25 min previamente à irradiação ou administração oral na água (0,2 % m/V) 10 dias antes e durante período de irradiação	Ratinho n= 3
	Melhorias histológicas ao nível do tecido elástico no tratamento da pele fotoenvelhecida, mas ausência de efeitos macroscópicos [201]	Associação de administração oral bdiária (300 mg) e cutânea de creme (10 % m/m) durante 8 semanas	Homem n= 18

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Extracto de chá preto (<i>Camellia sinensis</i>)	Redução do eritema induzido pela irradiação UVA+B [202]	Aplicação cutânea de gel de Carbopol® (extracto aquoso 96,53 % m/m) previamente à irradiação	Homem n= 6
Epigallocatequina-3-galhato (EGCG) (<i>Camellia sinensis</i>)	Redução de células <i>sunburn</i> e da desintegração da junção dermoepidérmica apenas quando a administração é efectuada previamente à irradiação UVA [203]	Aplicação cutânea de pomada hidrófila (2 % m/m) antes e após irradiação	Ratinho n= 6
(+)-catequina	Modulação da actividade das enzimas catalase, SOD e glutathione peroxidase após irradiação UVB [204]	Administração oral durante 2 ou 4 semanas com dieta enriquecida a 2 % (m/m) previamente à irradiação	Ratinho n= 3-4
Silimarina e silibinina (<i>Sylibum marianum</i> L.)	Inibição da imunossupressão induzida pela radiação UVB, em ambos os tratamentos [205]	Aplicação cutânea de 200 µl de solução em acetona (0,2, 0,5 e 1 mg/cm ²) previamente (25 – 30 min) ou imediatamente após irradiação	Ratinho n= 5
Silibinina (<i>Sylibum marianum</i> L.)	Prevenção de lesões no DNA induzidas pela radiação UVB, em ambos os tratamentos [206]	Aplicação cutânea de 200 µl de solução em acetona (9 mg) previamente (30 min) ou após irradiação	Ratinho n= 5
Extracto de folhas de <i>Sedum telephium</i> L.	Redução do eritema induzido pela irradiação UVB [207]	Aplicação cutânea (100 mg/ cm ²) sob oclusão (3 h) de hidrogel (2 % em ingredientes activos) após irradiação.	Homem n= 6

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Extracto de folhas de salva concentrado em diterpenos fenólicos (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Redução do eritema induzido pela radiação UVB [208]	Aplicação cutânea sob oclusão (48 h) de pomada hidrófila (2% m/m) após irradiação	Homem n= 40
Extracto de vinho da cultivar Jacquez (<i>Vitis aestivalis-cinerea</i> * <i>Vitis vinifera</i>)	Redução do eritema induzido pela radiação UVB [209]	Aplicação cutânea (100 mg/cm ²) sob oclusão (3 h) de gel de Carbopol® (2% m/m) após irradiação	Homem n= 6
Extracto de broto de <i>Vitis vinifera</i>	Redução da produção de ROS e melhoria de vários sinais de fotoenvelhecimento, mais notória para a associação [210]	Aplicação cutânea (2 µl/cm ²) de emulsão O/A (1 % de solução hidroglicólica) 4 vezes num dia ou aplicação cutânea de creme (solução hidroglicólica 1 % em associação com um extracto biotecnológico 1%) durante 4 semanas	Homem n= 60 ou 27
Extracto de grainhas de uvas concentrado em proantocianidinas (<i>Vitis vinifera</i>)	Redução da pigmentação cutânea induzida por dose múltipla de radiação UVA+B (2 vezes por semana, 3 semanas) [211]	Administração oral de dieta a 1 % durante 8 semanas após período de irradiação	Porquinho-da-índia n= 5
Resveratrol	Inibição da promoção da proliferação celular, da expressão de proteínas promotoras de tumores e da sobrevivência e estimulação da apoptose induzidas por dose múltipla de radiação UVB (em dias alternados durante 14 dias) [212]	Aplicação cutânea de 200 µl de solução (10 µmoles) em acetona previamente à irradiação	Ratinho n= 12

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Extracto de raiz de <i>Polygonum multiflorum</i>	Inibição da inactivação da SOD induzida por dose múltipla de radiação UVB (14 dias) de um modo dependente da dose [213]	Aplicação cutânea de solução aquosa (1 a 16 % m/V) após irradiação, diariamente durante 14 dias	Ratinho n= 10
Extracto de flores de <i>Prunus persica</i>	Redução da incidência de tumores (apenas para a concentração de 25 %) e da multiplicidade de tumores (para ambas as concentrações) induzidas pela radiação UVB [214]	Aplicação cutânea de 120 mg de creme (12,5 e 25 % m/m) durante 14 dias previamente à irradiação (com a duração de 10 dias). 7 dias após a última irradiação, reiniciou-se a aplicação do creme imediatamente após irradiação (2 vezes por semana até às 28 semanas)	Ratinho n= 18
Extracto de folhas de <i>Rosmarinus officinalis</i> concentrado em ácido rosmarínico	Redução do eritema induzido pela radiação UVB de um modo dependente da dose [215]	Aplicação cutânea de extracto (0,2 a 5 mg/cm ²) em veículo oleoso previamente (5 h) à irradiação	Porquinho-da-índia n= 4
	Redução da displasia celular induzida por dose múltipla de radiação UVA (3 vezes semana, 33 semanas)[216]	Administração oral de dieta (2 %) durante período de irradiação	Ratinho n= 10

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Isoflavonas de soja	Aumento do número de papilas dérmicas [217]	Aplicação cutânea bidária de um creme O/A (2 %) durante 15 dias	Homem n= 21
	Redução da incidência de carcinoma de células escamosas induzido pela radiação UVB, de um modo dependente da dose [218]	Aplicação cutânea de 200 µl de solução de apigenina (5 e 10 µmoles) em DMSO:acetona (1:9) previamente (2,5 a 3 h) à irradiação, durante 11 semanas	Ratinho n= 31
	Prevenção da formação de células <i>sunburn</i> e redução do eritema induzido pela RSS [219]	Aplicação cutânea de 250 µl de soluções (0,5 % de cada isoflavona: genisteína, equol, daidzeína, biochanina A e formononetina) em (Transcutol®, 1,2-propanediol, Brij® 35 e fenoxietanol) durante 4 dias previamente à irradiação	Porco n= 3-6
	Redução da produção de H ₂ O ₂ , da peroxidação lipídica e de lesões no DNA induzidos por dose múltipla de radiação UVB (3 vezes por semana durante 1 ou 2 semanas –sub-aguda– ou 20 semanas – crónica) [220]	Aplicação cutânea de solução de genisteína (10 µmol) em etanol:propilenoglicol (1:1) previamente (1 h) à irradiação	Ratinho n= 3-5
Extracto de folhas de <i>Polypodium leucotomos</i>	Redução do eritema, lesões no DNA, hiperproliferação epidérmica, infiltração de mastócitos na derme e formação de células <i>sunburn</i> induzidos pela RSUVS [221]	Administração oral (7,5 mg/kg) repartida em duas doses diárias, previamente à irradiação	Homem n= 9
	Inibição da imunossupressão induzida por dose múltipla de radiação UVB, durante 4 dias [222]	Administração oral na água (1,6 µg/ml) durante 3 semanas previamente à irradiação	Ratinho n= 15

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Extracto de noz de cola (<i>Cola acuminata</i>) e de grãos de cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	Prevenção da formação de rugas e alterações histológicas induzidas por dose múltipla de radiação UVA (5 vezes por semana durante 15 semanas) [223]	Aplicação cutânea de 100 µl de solução de extracto (3 % m/V) em PEG 1000:propilenoglicol:etanol (1:1:1) após (90 min) irradiação	Ratinho n= 8
Flavanóis do cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	Redução do eritema induzido por RSS, redução da rugosidade, descamação e da TEWL e aumento da hidratação cutânea apenas para administração de bebida com elevado teor de flavanóis [224]	Administração oral de bebida com flavanóis (329 mg/dia ou 27 mg/dia) durante 12 semanas	Homem n= 12
Extracto de folhas de <i>Ginkgo biloba</i>	Atenuação da redução da actividade da SOD induzida pela radiação UVB, em ambos os tratamentos [225]	Administração oral (100 mg/kg/dia) durante 5 dias previamente à irradiação ou dose única após irradiação	Ratinho n= 6
Extracto de acerola concentrado em polifenóis (<i>Malpighia emarginata</i>)	Redução da pigmentação cutânea induzida por dose múltipla de radiação UVB (3 dias alternados)[226]	Administração oral de solução aquosa (400 mg/kg/dia) durante 8 semanas	Porquinho-da-índia n= 6

Tabela 1.2. (continuação)

Composto fenólico ou extracto (Planta)	Efeito	Modo de administração	Modelo
Ácido ferúlico e ácido cafeico	Redução do eritema induzido pela radiação UVB [228].	Aplicação cutânea de 200 µl de solução aquosa saturada imediatamente após irradiação	Homem n= 6
Ácido cafeico	Redução da produção de ROS induzida pela radiação UVA em ambos os tratamentos [229]	Aplicação cutânea de solução (1 – 10 mM) previamente (30 min) à irradiação ou administração oral (200 mg/kg/dia durante 3 dias)	Ratinho n= 3-4
Extracto de folhas de <i>Culcitium reflexum</i>	Redução do eritema induzido pela radiação UVB [230]	Aplicação cutânea de gel de Carbopol ® (2 % m/m) imediatamente após irradiação	Homem n= 6
Extracto de <i>Achyrocline satureioides</i>	Redução da produção de HO [•] induzida pela radiação UVA+B [231]	Aplicação cutânea de creme (2 % m/m, 1g/25 cm ²) previamente (10 min) à irradiação	Coelhos n= 3
Picnogenol (extracto de casca de <i>Pinus marítima</i> concentrado em procianidinas)	Aumento da DME induzida por RSUVS [232] Redução da imunossupressão, da inflamação e da carcinogénese induzidas por dose múltipla de RSUVS (3 dias ou 5 vezes por semana durante 10 semanas) [233]	Administração oral (1,10mg/Kg/dia) durante 4 semanas seguido da administração de 1,66 mg/Kg/dia durante 4 semanas Aplicação cutânea de emulsão O/A (0,05, 0,1 e 0,2 %) após irradiação	Homem n= 21 Ratinho n= 6 ou 20

n representa o número de animais ou indivíduos aos quais foi administrado o(s) composto(s) em estudo

RSS Radiação solar simulada

RSUVS radiação solar ultravioleta simulada

Os estudos apresentados na Tabela 1.2 merecem contudo algumas considerações. Os efeitos preventivos da acção da radiação solar referidos foram quase exclusivamente direccionados para os efeitos da radiação UV e em particular UVB. A radiação UVA e inclusive IV estão também implicadas nas lesões mediadas pela exposição ao sol, pelo que o uso de RSS seria mais relevante [233]. A aplicação cutânea dos compostos fenólicos efectuou-se em alguns casos na forma de solução, frequentemente usando solventes orgânicos, o que constitui uma abordagem pouco realista. Alguns estudos referem também a via sistémica. Os polifenóis mais estudados são osobtidos do chá verde. Embora alguns estudos foquem a administração de polifenóis isolados, a maioria utiliza extractos ou fracções de extractos, o que pode sugerir que nessas condições ocorrem efeitos sinérgicos que não se verificam durante a administração isolada. Parte dos estudos citados, em particular os ensaios em humanos, incidiram nos efeitos indirectos mediados por ROS, nomeadamente o eritema cutâneo, provavelmente pelo facto de só recentemente estarem disponíveis tecnologias pouco invasivas de quantificação *in vivo* dos efeitos oxidativos, tais como as espectroscopias de Raman e de ressonância paramagnética electrónica (EPR). Mais de metade dos ensaios foram efectuados em animais pelo que novos estudos clínicos, conduzidos com um número elevado de voluntários humanos, são necessários para melhor fundamentar a eficácia dos polifenóis.

Quelantes de ferro

Considerando o papel do ferro nos efeitos lesivos mediados pela radiação solar, em particular a sua participação na geração do HO[•] (via reacção de Fenton) e no processo de peroxidação lipídica, o uso tópico de quelantes de ferro apresenta uma putativa eficácia protectora. O uso de um derivado de aminoácidos, o *N*-(2-hidroxibenzil)-L-serina) com propriedades quelantes de ferro, proporcionou um efeito protector da peroxidação lipídica, da produção do HO[•] e da citotoxicidade de fibroblastos, mediados pela radiação UV [234]. Bissett *et al.*, observaram também efeitos sinérgicos da associação de um filtro solar com um quelante de ferro (2-furildioxima) traduzidos no aumento do FPS, determinado *in vivo* [235].

Outros

Uma grande diversidade de compostos foi proposta como potenciais agentes protectores das agressões mediadas pela radiação solar na pele. A administração por via cutânea durante 15 semanas de xantinas, tais como a cafeína, a teobromina e a teofilina, bem como extractos de plantas que possuem derivados xantínicos, previamente à irradiação com RSS, traduziu-se na prevenção do aparecimento de rugas e de alterações

histológicas cutâneas [223]. A aplicação cutânea de cafeína após exposição à radiação UVB diminuiu o relevo cutâneo, embora não tenha alterado a hiperplasia epidérmica e a angiogénese [236].

A melatonina, que possui propriedades antioxidantes, revelou acção preventiva do eritema induzido pela radiação UV *in vivo* [169]. A aplicação cutânea de frutose 1,6-difosfato em ratinhos preveniu a depleção de antioxidantes endógenos verificada após exposição à radiação UVB [237] e a creatina preveniu o stress oxidativo celular em culturas de queratinócitos, bem como inibiu a redução do potencial da membrana mitocondrial em humanos, induzidos pela radiação UVA [238]. O uso de óleos vegetais como agentes protectores dos efeitos da radiação solar foi investigado em vários estudos. A aplicação cutânea de azeite extra virgem imediatamente após exposição à radiação UVB reduziu o número de cancros cutâneos em ratos [239]. O óleo de soja exibiu actividade protectora da inflamação cutânea mediada pela radiação UVB [240]. Um estudo de vários compostos antioxidantes, recorrendo a um modelo de lípidos cutâneos onde foi avaliada a acção preventiva da peroxidação lipídica, revelou a elevada actividade de um grande número de moléculas, incluindo fármacos, tais como amantadina, bufemaxac, triptofano, melatonina, propranolol e ácido hialurónico, incluindo também flavonóides como a quercetina e silibinina e extractos de plantas. É interessante referir que o ácido ascórbico apresentou efeitos pró-oxidantes neste estudo [241]. As propriedades pró-oxidantes deste composto parecem estar relacionadas com a sua elevada capacidade redutora [242].

Associações de compostos

A associação do ácido ascórbico e tocoferóis é a mais investigada dado que constituem antioxidantes com diferentes hidrofílias e que actuam em diferentes compartimentos celulares e por diferentes mecanismos. A aplicação cutânea de ácido ascórbico e α -tocoferol demonstrou ser eficaz na prevenção dos efeitos da exposição à radiação UV tais como lesões no DNA [182] e eritema [243]. Neste último estudo, efectuado em pele de porco, o efeito da associação dos antioxidantes foi superior ao obtido com cada antioxidante isolado [244]. O papel do ácido ascórbico na regeneração do radical tocoferilo terá certamente um importante contributo para o efeito sinérgico, bem como a estabilização mútua [171]. A associação de vitamina C (15 %), E (1 %) e ácido ferúlico (0,5 %) apresentou elevada eficácia protectora do eritema cutâneo induzido por radiação UVA+B. Neste caso, o ácido fenólico apresentou uma acção estabilizadora das duas vitaminas [245].

Outras associações de antioxidantes lipófilos e hidrófilos foram testadas tais como a associação de linoleato de vitamina E, butil-hidroxitolueno, ácido norhidroguaradínico,

fosfato de ascorbilo e magnésio, que demonstrou eficácia *in vivo* na prevenção de efeitos mediados pelas radiações UVA, UVB e IV [246]. Na perspectiva de associar diferentes mecanismos (tais como protecção solar e efeito antioxidante) e obter efeitos sinérgicos, foi estudada a associação de substâncias tais como o palmitato de retinilo, o acetato de tocoferilo, o tetraisopalmitato de ascorbilo e flavonóides [247]. Esta associação foi eficaz na prevenção da formação de células *sunburn* em ratos embora se tenha revelado ineficaz na prevenção do eritema induzido pela radiação UV. O facto de terem sido usados ésteres do ácido ascórbico e do α -tocoferol, reconhecidamente menos eficazes do que as formas livres, pode ter influenciado a ineficácia observada na prevenção da reacção eritematosa.

Administração de antioxidantes por via oral

A administração cutânea proporciona elevadas concentrações tecidulares embora as substâncias possam exibir baixa estabilidade e o modo da aplicação possa ser crítico. A influência do veículo das substâncias antioxidantes é também determinante da sua eficácia [176]. Novos sistemas de libertação têm sido testados com o objectivo de melhorar a estabilidade, reduzir a toxicidade, melhorar a aceitabilidade cosmética e otimizar a libertação para as camadas superficiais do tecido cutâneo [248]. Para além da optimização tecnológica, outra estratégia para ultrapassar as desvantagens da administração por via cutânea é a administração por via oral, que tem como vantagens ser independente da adequação da aplicação cutânea, a simplicidade e o baixo custo, sendo uma perspectiva amplamente estudada [249]. Carotenóides, vitaminas C e E, selénio e ácidos gordos polinsaturados ómega 3 são alguns exemplos de substâncias antioxidantes testadas por via oral [249, 250]. Alguns estudos apresentam resultados pouco expressivos do efeito fotoprotector, em particular com antioxidantes em monoterapia [251-253]. No caso do β -caroteno, os estudos efectuados em humanos apresentam conclusões contraditórias, quer demonstrando um efeito reduzido na prevenção do eritema induzido pela exposição solar [253], quer evidenciando efeitos estatisticamente significativos na redução do eritema actínico [254]. As baixas concentrações cutâneas obtidas após suplementação oral são uma justificação plausível para a reduzida eficácia. Baixas doses de α -tocoferol administradas oralmente durante seis meses não produziram aumento dos níveis cutâneos deste antioxidante [252]. A administração oral de ácido ascórbico em humanos é considerada, na generalidade, ineficaz na protecção da reacção inflamatória induzida pela exposição ao sol, mesmo para doses elevadas [251, 255], e mesmo quando ocorre um aumento da sua concentração nos queratinócitos [256]. No caso do α -tocoferol, as conclusões dividem-se em ineficácia [253, 256] ou efeitos modestos [255]. Um aumento dos níveis deste

antioxidante nos queratinócitos, observado após administração de doses elevadas, não foi acompanhado por eficácia biológica [256]. Pode inferir-se destes estudos que a ineficácia da administração oral não está unicamente relacionada com baixas concentrações tecidulares. A administração oral de associações de antioxidantes foi também objecto de investigação, sendo disso exemplo a administração durante sete semanas de licopeno, β -caroteno, α -tocoferol e selénio que resultou numa redução do eritema actínico, das células *sunburn* e dos lipoperóxidos, induzidos pela exposição a RSS [257]. O sucesso da administração cutânea da associação do ácido ascórbico e do α -tocoferol encontrou paralelo na administração oral em humanos, usando doses elevadas administradas durante 50 dias [256] ou mesmo no período de uma semana [255]. Num dos estudos, a administração dos antioxidantes em monoterapia não produziu efeitos, embora as concentrações de ambos tenham aumentado em queratinócitos da mucosa bucal [256]. O aumento verificado nos teores dos antioxidantes após administração individual foi comparável ao observado com a associação, o que sugere que o efeito biológico da associação dos dois antioxidantes decorre de uma acção sinérgica. Verificou-se uma protecção das lesões no DNA, induzidas pela radiação UVB, em humanos após administração oral da associação dos dois antioxidantes durante três meses [258, 259].

Administração de antioxidantes associando as vias oral e cutânea

A associação das duas vias de administração foi proposta na perspectiva de optimização dos efeitos individuais. A associação de tratamento tópico de pele fotoenvelhecida com ácido α -lipóico e melatonina/emblica e tratamento oral (ácido ascórbico, α -tocoferol, luteína e ácido α -lipóico) foi eficaz, após tratamento durante dois meses, na redução das ROS presentes no sangue e na redução da peroxidação lipídica [227]. A associação do tratamento tópico proporcionou um aumento da hidratação cutânea e do teor de lípidos da pele, não influenciando significativamente as medições do stress oxidativo, em comparação com o tratamento exclusivamente sistémico. O benefício da associação da aplicação tópica à administração sistémica não foi perfeitamente esclarecido neste estudo com excepção da influência nos parâmetros biométricos. O facto do estudo ter incluído na formulação cutânea um antioxidante (ácido α -lipóico) que está descrito como ineficaz por essa via [231] pode ter influenciado os resultados.

**2. PREPARAÇÃO, SELECÇÃO E
OPTIMIZAÇÃO DE EXTRACTOS DE PLANTAS
DA FLORA PORTUGUESA**

2. PREPARAÇÃO, SELECÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DE EXTRACTOS DE PLANTAS DA FLORA PORTUGUESA

2.1 SELECÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

As espécies vegetais seleccionadas para este trabalho são árvores da flora portuguesa, na sua grande maioria árvores de fruto. A selecção incidiu particularmente nas plantas para as quais está descrita, na literatura, a presença de compostos fenólicos na composição das suas folhas. Esta classe de compostos é sobejamente reconhecida como possuidora de propriedades antioxidantes, muito relevantes na prevenção dos efeitos associados ao stress oxidativo cutâneo (como o fotoenvelhecimento), tal como discutido no capítulo anterior. Incluiu-se também o hipericão do Gerês, mesmo não sendo uma árvore de fruto, dado que é uma planta que foi amplamente estudada pelo Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, para a qual está definida a composição fenólica e que possui a actividade antioxidante. A filogenia das espécies vegetais usadas está ilustrada na Figura 2.1.

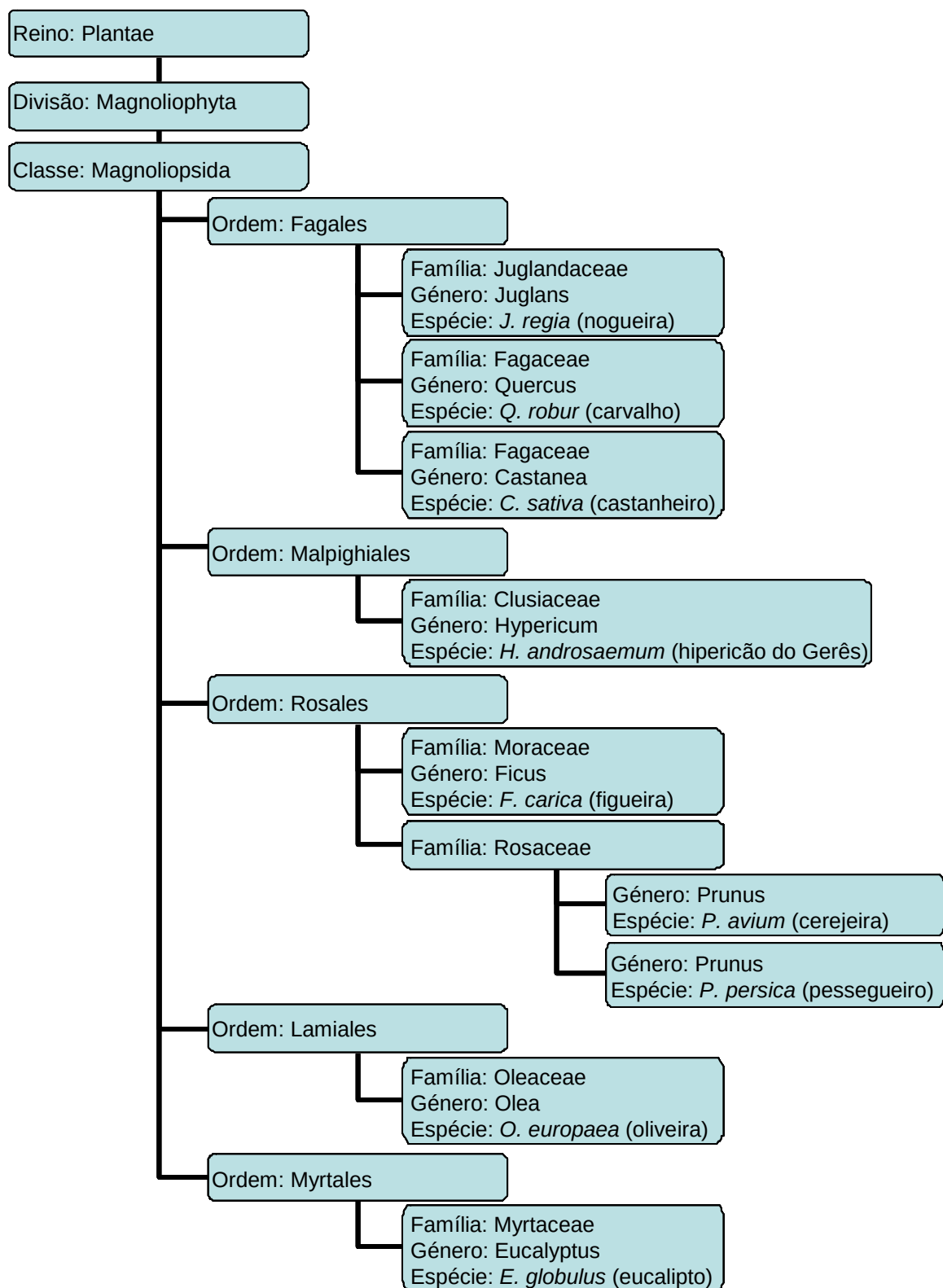


Figura 2.1. Filogenia das espécies vegetais estudadas.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

2.2.1 Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.)

Esta planta, também conhecida como eucalipto-comum ou eucalipto-da-Tasmânia, pertence à família Myrtaceae. Existem no mundo cerca de 600 espécies de eucalipto, das quais 50 se aclimataram na bacia mediterrânica. Originário da Tasmânia o *E. globulus* (do latim *globulus*, um pequeno botão, referência à forma do opérculo do fruto) foi introduzido na Europa nos meados do século XIX com vista ao saneamento das regiões pantanosas. A bacia mediterrânica é o habitat desta planta, cultivando-se em Portugal numerosas espécies, até 1000 m de altitude. Esta árvore de folha perene pode atingir uma altura entre 25 – 35 m, apresentando tronco direito, casca lisa acinzentada e lenho avermelhado. As folhas das árvores mais velhas são alternas, falciformes, pecioladas, planas, pendentes e brilhantes (Figura 2.2) [260].

O uso medicinal das folhas adultas (colhidas entre Junho e Setembro) deve-se às suas propriedades adstringentes, anti-sépticas, bactericidas, estimulantes e febrífugas. Encontram aplicação nos casos de asma, bronquite, gripe e sinusite, entre outras doenças [260]. O óleo essencial tem indicação para uso em afecções reumáticas [261]. As folhas contêm na sua composição óleo essencial, flavonas derivadas do ácido ursólico e outros flavonóides, taninos e resina [262]. Esta planta (folha e óleo essencial) possui monografia inscrita na Farmacopeia Portuguesa VIII [263].

O óleo essencial obtido a partir das folhas frescas é utilizado na indústria cosmética como tónico, desodorizante, perfume e aromatizante em produtos para massagem, produtos de higiene corporal e pastas dentífricas [264].



Figura 2.2. *Eucalyptus globulus* (árvore adulta; libertação do ritidoma externo; folhas adultas, flores e botões; frutos mostrando o opérculo com as valvas abertas).

A composição fenólica das folhas de eucalipto descrita na literatura consta da Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Composição fenólica das folhas de *E. globulus* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos benzóicos e seus derivados	Ácido gálgico	[265]
	Ácido elágico	
Ácidos cinâmicos	Ácido cafeico	[266]
	Ácido ferúlico	
Flavanonas	Luteolina	[265]
Flavonas	Apigenina	
Flavonóis	Quercetina 3-O-ramnósido (Quercitrina)	[265]
	Kaempferol 3-O-arabinósido	[267]
	Quercetina 3-O-rutinósido (Rutina)	[266]
Flavanóis	Quercetina	
	Catequina	[268]
Taninos hidrolisáveis	Telimagrandina I	
	Eucalbanina C	
	2-O-digalhoil-1,3,4-tri-O-galhoil-β-D-glicose	
	6-O-digalhoil-1,3,4-tri-O-galhoil-β-D-glicose	
	Eucaglobulina	

2.2.2 Castanheiro (*Castanea sativa* Mill.)

O castanheiro pertence à família Fagaceae. Supõe-se que o castanheiro tenha sido importado do Irão no século V a.C., tendo-se propagado por meio de cultura por toda a Europa, aclimatando-se principalmente nas montanhas siliciosas. O habitat desta árvore é a Europa meridional, encontrando-se em bosques e montanhas. Encontra-se em quase todo o nosso país até uma altitude de 1300 m. A árvore apresenta de 25 a 35 m de altura e exibe tronco maciço, madeira dura, casca jovem lisa e cinzenta e mais tarde castanha e gretada. As folhas são pecioladas, compridas (de 10 a 25 cm), glabras, brilhantes, com nervação paralela (Figura 2.3). Apresenta propriedades adstringentes, estomáquicas, remineralizantes, sedativas e tónicas. O seu uso terapêutico (casca, folhas, amentilhos e frutos) tem interesse nos casos de astenia, diarreia, faringite, tosse, entre outros. Na composição das diferentes partes figuram taninos, glícidos, lípidos, proteínas, sais minerais, vitaminas B 1, B 2 e C [260].



Figura 2.3. *Castanea sativa* (árvore adulta; folhas adultas com frutos, flores; frutos – castanha).

Os compostos fenólicos identificados nas folhas de castanheiro estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Composição fenólica das folhas de *C. sativa* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Flavonóis	Quercetina 3-O-glicósido (Isoquercitrina)	[269]
	Quercetina 3-O-rutinósido (Rutina)	
	Quercetina	
	Kaempferol	
	Galangina	[270]
	Morina	
Flavonas	Apigenina	
Flavanonas	Hesperidina	
	Naringina	

2.2.3 Carvalho (*Quercus robur* L.)

Esta árvore, da família Fagaceae, tem o seu habitat na Europa, com excepção do Norte e região mediterrânica, e vegeta em solos frescos e húmidos. Encontra-se no Norte e Centro do Continente, principalmente nas províncias do litoral [262]. Apresenta 35 a 40 m de altura, tronco grosso, casca cinzento-acastanhada, escurecendo com a idade. As folhas são glabras, verde-escuras, brilhantes na página superior e mais claras na inferior. São duras, obovadas com lóbulos arredondados e caducas (Figura 2.4) [260].

Esta planta apresenta propriedades adstringentes, anti-sépticas, febrífugas e tónicas, devido à presença de taninos. Tradicionalmente, é utilizada (casca dos ramos jovens, folhas e glandes) em casos de diarreia, epistaxe, hemorróidas, anginas, sudação, entre outros [260]. Possui na sua composição taninos, ácido gálico, quercitrina, procianidinas oligoméricas e sais minerais [262]. A casca de carvalho possui monografia inscrita na Farmacopeia Portuguesa VIII [263].



Figura 2.4. *Quercus robur* (árvore adulta; casca; flores; folhas e frutos – bolotas).

A Tabela 2.3 descreve a composição fenólica das folhas de carvalho enumerada na literatura.

Tabela 2.3. Composição fenólica das folhas de *Q. robur* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos benzóicos	Ácido gálgico	[271]
	Glicósidos da quercetina	
Flavonóis	Glicósidos do kaempferol	
	Telimagrandina II	
Taninos hidrolisáveis	Vescalagina	
	Castalagina	
	Pedunculagina	
	Casuarictina	

2.2.4 Nogueira (*Juglans regia* L.)

A noqueira, família Juglandaceae (Figura 2.5), é uma árvore do Sudeste Europeu e Asiático, cujo vasto habitat se estende dos Balcãs e de Creta até ao Norte da China. A noqueira foi extinta na Europa ocidental pela última glaciação quaternária reaparecendo no fim da Idade do Bronze. É muito cultivada em Portugal [260]. As folhas e o pericarpo são as partes com interesse medicinal. Apresenta propriedades adstringentes, anti-sépticas, cicatrizantes, depurativas, tónicas, vermífugas e tónicas. Tem uso terapêutico na anemia, diarreia, feridas, hemorróidas, úlceras cutâneas, caspa, entre outros [260]. As folhas apresentam na sua constituição naftoquinonas, derivados flavónicos, ácidos fenólicos e seus ésteres e vestígios de óleo essencial [262]. Preparações obtidas das folhas têm aplicação em inflamações cutâneas, na psoríase, doenças fúngicas e na diaforese excessiva dos pés e das mãos. Por via oral, tem interesse como anti-helmíntico [261]. A noqueira tem aplicação nos produtos cosméticos como adstringente, purificante, anti-irritante, aromatizante e corante e está incluída na composição de produtos bronzeadores, tintas capilares, champôs e tónicos capilares [264].



Figura 2.5. *Juglans regia* (árvore adulta; folhas e frutos verdes; fruto – noz).

Os compostos fenólicos identificados nas folhas de noqueira estão descritas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Composição fenólica das folhas de *J. regia* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido 3-cafeioloquínico (Ácido clorogénico)	[272]
	Ácido 5-cafeioloquínico	[273]
	Ácido 3- <i>p</i> -coumaroilquínico	[272]
	Ácido 4- <i>p</i> -coumaroilquínico	[272]
	Ácido <i>p</i> -cumárico	[273]
Flavonóis	Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido (Hiperósido)	[272]
	Quercetina 3- <i>O</i> -xilósido	
	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinósido	
	Quercetina 3- <i>O</i> -ramnósido (Quercitrina)	
	Quercetina 3- <i>O</i> -pentósido	
	Kaempferol 3- <i>O</i> -pentósido	

2.2.5 Cerejeira (*Prunus avium* L.)

A cerejeira é uma árvore de folha caduca pertencente à família Rosaceae, nativa do Sudoeste da Ásia, naturalizada na Europa, sendo também cultivada em Portugal [261]. É uma árvore pequena, cujos frutos são refrescantes e laxativos e ricos em vitaminas A, B 1 e C (Figura 2.6). O cozimento da casca dos ramos é adstringente e febrífugo, e a infusão das flores é calmante [274]. Os pedúnculos dos frutos e os frutos têm aplicação no tratamento de infecções das vias urinárias e edemas [261].



Figura 2.6. *Prunus avium* (árvore adulta; folhas e frutos; flores; fruto – cereja).

A Tabela 2.5 descreve a composição fenólica das folhas de cerejeira descrita na literatura.

Tabela 2.5. Composição fenólica das folhas de *P. avium* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Flavonóis	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinosil-7,3'- <i>O</i> -bisglicósido	[275]
	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinosil-4'-di- <i>O</i> -glicósido	
	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosil-4'-di- <i>O</i> -glicósido	

2.2.6 Figueira (*Ficus carica* L.)

A figueira, pertencente à família Moraceae, existe nos locais rochosos virados ao sol de toda a bacia mediterrânea. A figueira é uma das mais antigas árvores de fruto [260], sendo indígena da Ásia Menor, Síria e Irão [276]. É uma árvore de folha caduca, de altura média e com folhas grossas e pecioladas (Figura 2.7) [277]. As sementes exercem uma acção laxativa enquanto a decocção do figo seco tem acção emoliente. O látex

branco que brota dos ramos ou do pecíolo das folhas tem propriedades calicidas [260]. O infuso da casca tem propriedades adstringentes enquanto o xarope de figos tem aplicação em pediatria como laxante [274].



Figura 2.7. *Ficus carica* (crescendo sobre o tronco de outra árvore; folhas e figos; sicónio; figos secos).

A Tabela 2.6 descreve a composição fenólica das folhas de figueira enumerada na literatura.

Tabela 2.6. Composição fenólica das folhas de *F. carica* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido 3-cafeioloquínico (Ácido clorogénico)	[278]
	Ácido ferúlico	
	Quercetina 3-O-rutinósido (Rutina)	
Cumarinas	Psoraleno	
	Bergapteno	

2.2.7 Oliveira (*Olea europaea* L.)

É uma árvore da região mediterrânea, cultivada em países dessa zona e em zonas americanas de clima semelhante e pertence à família Oleaceae (Figura 2.8). Esta planta é cultivada praticamente em todo o nosso país. As folhas apresentam na sua composição derivados da colina, flavonóides derivados do luteol e olivol, ácidos fenólicos, iridóides, derivados triterpénicos, saponósidos, sais minerais, manitol, taninos, ceras e etólidos [262]. A descrição pormenorizada da composição fenólica consta da Tabela 2.7. Esta planta apresenta propriedades anti-hipertensoras devido ao seu conteúdo em flavonóis que têm a capacidade de induzir vasodilatação. A Farmacopeia Portuguesa VIII inscreve monografias para a folha de oliveira e para o azeite virgem e refinado [263]. O extracto obtido das folhas tem propriedades tonificantes, adstringentes e anti-irritantes, sendo por isso usado em cremes e loções cutâneas [264].



Figura 2.8. *Olea europaea* (árvore adulta; folhas e frutos – azeitona; flores; nascimento dos frutos).

Tabela 2.7. Composição fenólica das folhas de *O. europaea* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos benzóicos	Ácido vanílico	[279]
Ácidos cinâmicos	Ácido cafeico	[280]
	Verbascósido	
Flavonas	Apigenina	[281]
	Luteolina	
	Apigenina-4'-O-ramnosilglicósido	
	Luteolina-4'-glicósido	
	Apigenina-7-O-glicósido	
	Luteolina-7-O-glicósido	[282]
	Luteolina 7,4'-O-diglicósido	
	Apigenina 7-O-rutinósido	
	Diosmetina	[279]
	Diosmetina 7-O-glicósido	
	Crisoeriol-7-O-glicósido	[281]
	Crisoeriol	
Flavonóis	Quercetina-3-O-ramnósido (Quercitrina)	[281]
	Kaempferol	[283]
	Quercetina 3-O-rutinósido (Rutina)	
	Quercetina	
Flavanonas	Hesperidina	
Secoiridóides	Oleuropeína	[280]
Álcoois fenólicos	Hidroxitirosol	[279]
	Tirosol	
Aldeídos fenólicos	Vanilina	
Flavanóis	Catequina	

2.2.8 Pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch)

Esta planta de pequeno porte (Figura 2.9), pertencente à família Rosaceae, é cultivada na China desde tempos imemoriais [260]. Os seus frutos aromáticos, ricos em vitamina A, B 1, B 2 e C, são diuréticos e ligeiramente laxativos. O cozimento das folhas tem propriedades purgativas e sedativas [274]. O xarope de flores de pessegueiro tem

uso em pediatria como laxante e sedativo [260]. O pêsego pode ser incluído na composição de máscaras faciais com acção refrescante e hidratante da pele [262].



Figura 2.9. *Prunus persica* (árvore adulta; flores; folhas e frutos – pêsego; frutos).

A Tabela 2.8 descreve a composição fenólica das folhas de pessegueiro descrita na literatura.

Tabela 2.8. Composição fenólica das folhas de *P. persica* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido ferúlico	[284]
	Ácido <i>p</i> -cumárico	

2.2.9 Hipericão do Gerês (*Hypericum androsaemum* L.)

O hipericão do Gerês é um arbusto pertencente à família Hypericaceae (Figura 2.10). Em Portugal, pode ser encontrada essencialmente no Minho, Beiras e Estremadura (Sintra), nos locais húmidos e sombrios e nas margens dos rios [260]. Possui na sua composição cera, resina, óleo essencial e compostos fenólicos. A infusão das partes aéreas utiliza-se na medicina popular como diurético e em doenças hepáticas [285].



Figura 2.10. *Hypericum androsaemum* (arbusto, folhas, flores).

A Figura 2.10 descreve a composição fenólica das folhas de hipericão do Gerês descrita na literatura.

Tabela 2.9. Composição fenólica das folhas de *H. androsaemum* descrita na literatura

Classe	Composto fenólico	Referência
Ácidos cinâmicos	Ácido 5-O-cafeoilquínico	[286]
	Ácido 3-O-cafeoilquínico (Ácido clorogénico)	
	Ácido cafeico	[287]
Flavonóis	Quercetina	[286]
	Quercetina 3-O-sulfato	
	Quercetina 3-O-galactósido (Hiperósido)	
	Quercetina 3-O-glicósido (Isoquercitrina)	
	Quercetina 3-O-arabinósido	
	Quercetina 3-O-ramnósido (Quercitrina)	[287]
	Kaempferol	

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Colheita e secagem das plantas

As folhas de pessegueiro, castanheiro, eucalipto, noqueira, figueira, oliveira e cerejeira foram colhidas durante o mês de Julho de 2003 em Mirandela e as folhas de carvalho foram colhidas em Setembro de 2003 em Paredes de Coura. A localização geográfica dos pontos de colheita está evidenciada na Figura 2.11. As folhas e ramos de hipericão foram adquiridos comercialmente no estado seco.



Figura 2.11. Localização geográfica dos pontos de colheita das plantas.

A secagem das folhas efectuou-se ao ar, dispostas em camada fina e ao abrigo da luz, e prolongou-se no mínimo durante 3 semanas, até obtenção de um teor de humidade inferior a 10 %, determinado com uma balança de determinação da humidade (ANS, modelo AD-4713, Japão). Este ensaio foi efectuado com 2 g de folhas seccionadas. Após 60 min a uma temperatura de 105 °C, registou-se a perda percentual de massa. Este ensaio foi executado em triplicado. Quando se verificou um teor de humidade superior a 10 %, as folhas foram sujeitas a um período adicional de secagem numa estufa de leito flutuante (Glatt, modelo TR-2, Alemanha).

Os elementos estranhos foram eliminados e as folhas secas foram seccionadas e pulverizadas em moinho de café (Moulinex, França) e tamisadas (Retch, Alemanha) por tamis com abertura de malha 500 µm.

2.3.2 Obtenção dos extractos

Os extractos foram obtidos com os seguintes solventes: água desionizada (preparada no desmineralizador Seral, modelo Seradest, Alemanha, por resinas de troca-iónica), etanol 40° (EtOH 40°), etanol 70° (EtOH 70°) e etanol. A escolha destes solventes baseou-se nos critérios de segurança e compatibilidade com o tecido cutâneo. Em cada caso, o pó (2 g) obtido da pulverização das folhas (500 µm) foi misturado com o solvente (3 x 50 ml) e as misturas foram sujeitas a um período de agitação de 20 min (Placa de agitação magnética Velp Scientifica, modelo Multistirrer 15, Itália). Os extractos foram reunidos e filtrados por cadinho filtrante G4 e o etanol foi evaporado a 40 °C sob vácuo (Rotavapor Büchi, modelo RE 111, Suíça). As misturas aquosas foram posteriormente liofilizadas (Liofilizador Labconco, modelo Freezone 4.5, EUA) por um período nunca inferior a 48 horas.

2.3.3 Selecção do solvente extractivo

A selecção do solvente extractivo foi orientada pela actividade captadora do radical DPPH e também pelo teor de compostos fenólicos totais.

2.3.3.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais baseou-se na reacção dos grupos hidroxilo fenólicos com o reagente de Folin Ciocalteu. Este método envolve uma reacção de oxidação-redução, em meio alcalino, na qual o ião fenolato é oxidado e o composto fosfotúngstico-fosfomolibdico existente no reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com cor azul e máximo de absorção entre 725 e 750 nm.

Adicionou-se 300 µl de cada solução hidroalcoólica (EtOH 70°) dos extractos (500 µg/ml) a 1 ml de reagente de Folin Ciocalteu e em seguida 5 ml de solução de carbonato de sódio a 20 %, agitando-se vigorosamente. Completou-se o volume de 10 ml com água desionizada e, após 20 min, a absorvência foi lida em 735 nm contra a água desionizada.

O teor de compostos fenólicos totais exprimiou-se em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) presentes em 1 g de extracto liofilizado, calculado através de uma curva de calibração elaborada para o ácido gálico. Prepararam-se três soluções-mãe de ácido

gálico em EtOH 70°, a partir das quais se efectuou uma série de cinco diluições (60, 80, 100, 125, 150, e 175 µg/ml). A equação da recta obtida foi $y = 0,0036x - 0,0078$; $R = 0,9986$. Cada ensaio foi efectuado em duplicado e repetido no mínimo três vezes.

2.3.3.2 Avaliação da actividade captadora do radical DPPH

O DPPH (2,2'-difeníl-2-picrilhidrazilo) é um radical estável, centrado no átomo de azoto, cujo pico de absorvência máximo se situa nos 517 nm. Na presença de antioxidantes dadores de átomos de hidrogénio ou de electrões, o radical DPPH é reduzido originando um produto incolor, a hidrazina, com o conseqüente decréscimo da absorvência. O grau de descoloração do radical DPPH constitui assim uma medida da capacidade antioxidante. Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida por Blois [288], tendo sido posteriormente adaptada à avaliação da actividade antioxidante de um maior número de amostras em simultâneo, recorrendo a microplacas [289].

Adicionaram-se soluções hidroalcoólicas (EtOH 70°) dos extractos (1,56 - 100 µg/ml) a uma solução hidroalcoólica (EtOH 70°) de DPPH (190 µM) preparada extemporaneamente e a absorvência foi lida em 515 nm após 20 min (Leitor de microplacas, BIOTEK, modelo ELX 808, EUA). O ácido ascórbico e a rutina foram usados como controlos positivos. O ensaio efectuou-se em duplicado e foi repetido no mínimo três vezes.

O efeito captador de DPPH foi expresso sob a forma de percentagem de redução do DPPH, de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de DPPH (\%)} = 100 - \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco1}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco2}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 2.1}$$

sendo A_{amostra} o valor de absorvência do ensaio realizado na presença do extracto em estudo, A_{controlo} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto, A_{branco1} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de DPPH e A_{branco2} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto e de DPPH.

A concentração capaz de produzir 50 % do efeito (IC_{50}) foi calculada a partir do gráfico que representa a concentração *versus* o efeito, por regressão linear (MS Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, EUA).

2.3.4 Optimização do método extractivo

A optimização do método extractivo baseou-se na avaliação da absorvência da solução do extracto em 280 e em 350 nm após testar a influência do número de extracções, tempo de extracção e temperatura. O espectro ultravioleta de um flavonóide consiste tipicamente em dois picos de absorção máxima entre 240 e 285 nm (Banda II, devida à absorção do anel A) e 300 – 550 nm (Banda I, devida ao anel B). As flavonas e em particular os flavanóis apresentam picos na região 240 – 280 nm (Banda II) e 300 – 380 nm (Banda I). Os ácidos benzóicos apresentam um máximo de absorção próximo de 280 nm [290]. A absorvência a 280 e 350 nm foi então considerada um indicador da eficácia extractiva de compostos fenólicos, em particular de flavonóides e de ácidos benzóicos.

Após definição do método optimizado procedeu-se à avaliação do teor de compostos fenólicos totais (executado tal como descrito em 2.3.3.1) e da actividade captadora do DPPH (executado tal como descrito em 2.3.3.2). A comparação dos resultados obtidos nestes ensaios para os extractos preparados com o método inicial e com o método optimizado efectuou-se com o teste t de *student* ($p \leq 0,05$), após verificação da normalidade das distribuições e homocedasticidade (Anexo III) (programa SPSS Statistics 16, SPSS Inc, Chicago, EUA). A razão planta:solvente, a granulometria do pó obtido após pulverização das plantas e a agitação são outros parâmetros que influenciam o processo extractivo, e que foram mantidos constantes neste estudo.

2.3.4.1 Influência do nº de extracções e tempo de extracção

O pó (4 g) obtido da pulverização das folhas (500 µm) foi misturado com o solvente e as misturas foram sujeitas a um período de agitação (500 rpm, agitação magnética) durante 10 min com 12 x 100 ml do solvente seleccionado (Método 1). No fim de cada etapa extractiva e após filtração, mediu-se a absorvência em 280 e em 350 nm. A absorvência cumulativa verificada ao fim das 12 extracções foi considerada como 100 %.

Para avaliar o efeito do tempo de extracção, efectuou-se a extracção em três passos (500 rpm, agitação magnética), em que o primeiro teve a duração de 15 min e os dois seguintes de 90 min (Método 2). Em intervalos de tempo definidos, retiraram-se amostras e mediu-se a absorvência em 280 e em 350 nm. Sempre que a absorvência ultrapassou o valor de 1 UA (unidade arbitrária) efectuou-se uma diluição apropriada da amostra, corrigindo-se posteriormente o valor da absorvência com o factor de diluição.

2.3.4.2 Influência da temperatura

Para avaliação do efeito da temperatura, o processo extractivo foi executado em cinco etapas extractivas, cada com a duração de 10 min, sob agitação magnética (500 rpm), efectuado em banho de água a 40 °C (Banho de água circulante Grant, modelo W6, Reino Unido).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Selecção do solvente extractivo

O rendimento do processo extractivo foi variável em função do solvente utilizado. Com a excepção do eucalipto, a extracção conduzida com etanol originou sempre o rendimento extractivo mais baixo (Figura 2.12).

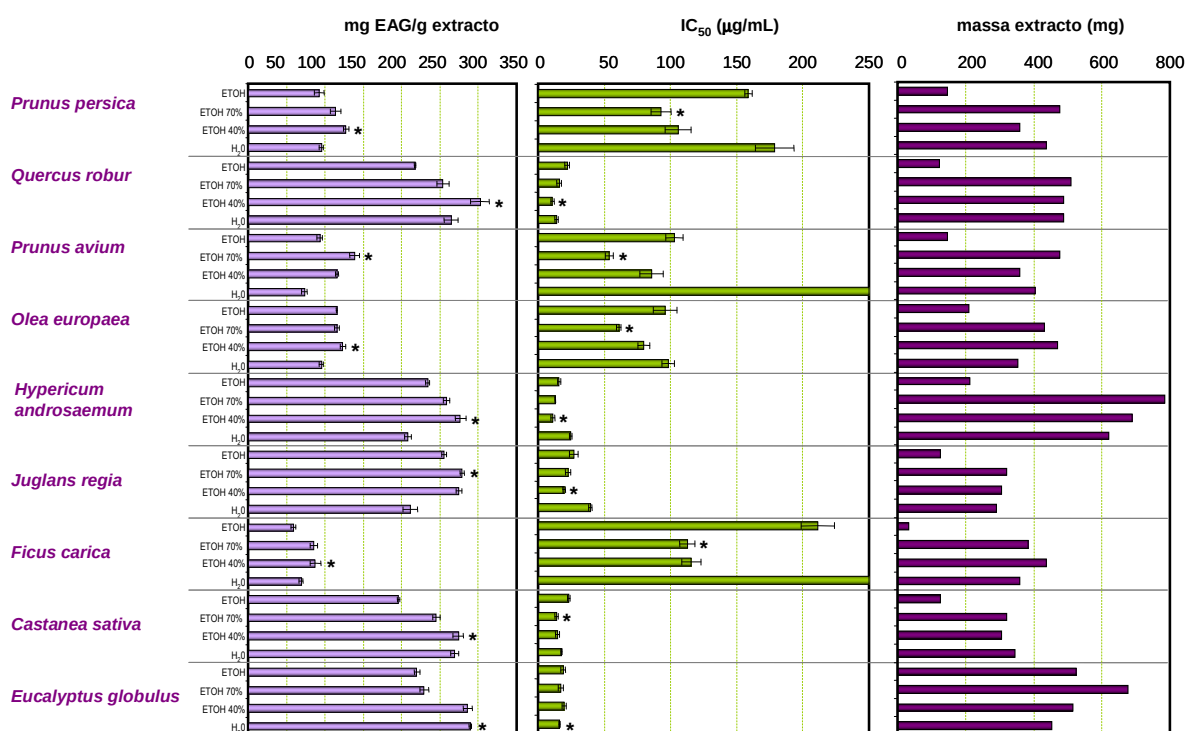


Figura 2.12. Teor de compostos fenólicos totais (média ± dp, n= 3), actividade captadora do radical DPPH (média ± dp, n= 3) e massa de extracto observados para os diferentes extractos. O extracto de cada planta que apresentou maior teor de compostos fenólicos e uma actividade antioxidante mais elevada está identificado com *.

O solvente que originou o extracto com maior actividade variou em função da planta. Em todos os casos, excepto para o eucalipto, foi um solvente hidroalcoólico o que

permitiu a obtenção de extractos com maior actividade captadora do radical DPPH. Nem sempre o solvente que originou o extracto com maior actividade antioxidante coincidiu com o solvente capaz de extrair maior quantidade de compostos fenólicos. É de considerar a possibilidade de existirem outros compostos, para além dos compostos fenólicos, responsáveis pela actividade antioxidante. Poderá também ser relevante a presença de interferentes no ensaio de quantificação dos compostos fenólicos totais, tal como o ácido ascórbico [291].

As plantas com menor actividade antioxidante e simultaneamente com menor teor de compostos fenólicos totais foram a figueira, a cerejeira, o pessegueiro e a oliveira, que apresentaram valores de IC_{50} superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ e teores de compostos fenólicos inferiores a 150 mg EAG /g de liofilizado.

Com base nestes resultados, foram seleccionados para a continuação do estudo os extractos das plantas de eucalipto, castanheiro, carvalho e nogueira, uma vez que apresentaram valores mais baixos de IC_{50} (isto é, revelaram uma maior eficácia no ensaio de captação do radical DPPH) e simultaneamente apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos totais. Para cada uma das plantas referidas foi utilizado o extracto obtido com o solvente que originou a actividade antioxidante mais elevada.

2.4.2 Optimização do método extractivo

A Figura 2.13 representa o processo extractivo obtido por dois métodos, sendo o valor da absorvência medida em 350 nm considerado o indicador da eficácia da extracção. Foram comparados um método constituído por 12 etapas extractivas (10 min) com renovação do solvente em cada nova etapa (Método 1) e outro constituído apenas por 3 etapas extractivas, em que a primeira apresenta a duração de 15 min, e as seguintes 90 min (Método 2). Este último método consumiu 195 min enquanto o primeiro método teve a duração total de 120 min. Para todos os extractos, o método 1 originou, ao fim de 120 min, uma maior eficiência da extracção (expressa em percentagem da absorvência cumulativa em 350 nm obtida no final do processo extractivo conduzido de acordo com o método 1).

O prolongamento da extracção não se apresentou vantajoso, tal como se pode observar na Figura 2.13, conduzindo a aumentos muito reduzidos da absorvência. Os resultados obtidos favorecem um processo extractivo constituído por etapas de curta duração. É também evidente que as primeiras etapas conduziram a incrementos mais importantes, enquanto as últimas etapas conduziram a pequenos aumentos da absorvência. Estas conclusões são válidas para todos os extractos em estudo. É assim possível concluir que o número de extracções não necessita ser superior a cinco

(eficiência extractiva que variou entre 86 e 95 %, dependendo da planta). Os resultados obtidos em 280 nm foram similares aos observados em 350 nm.

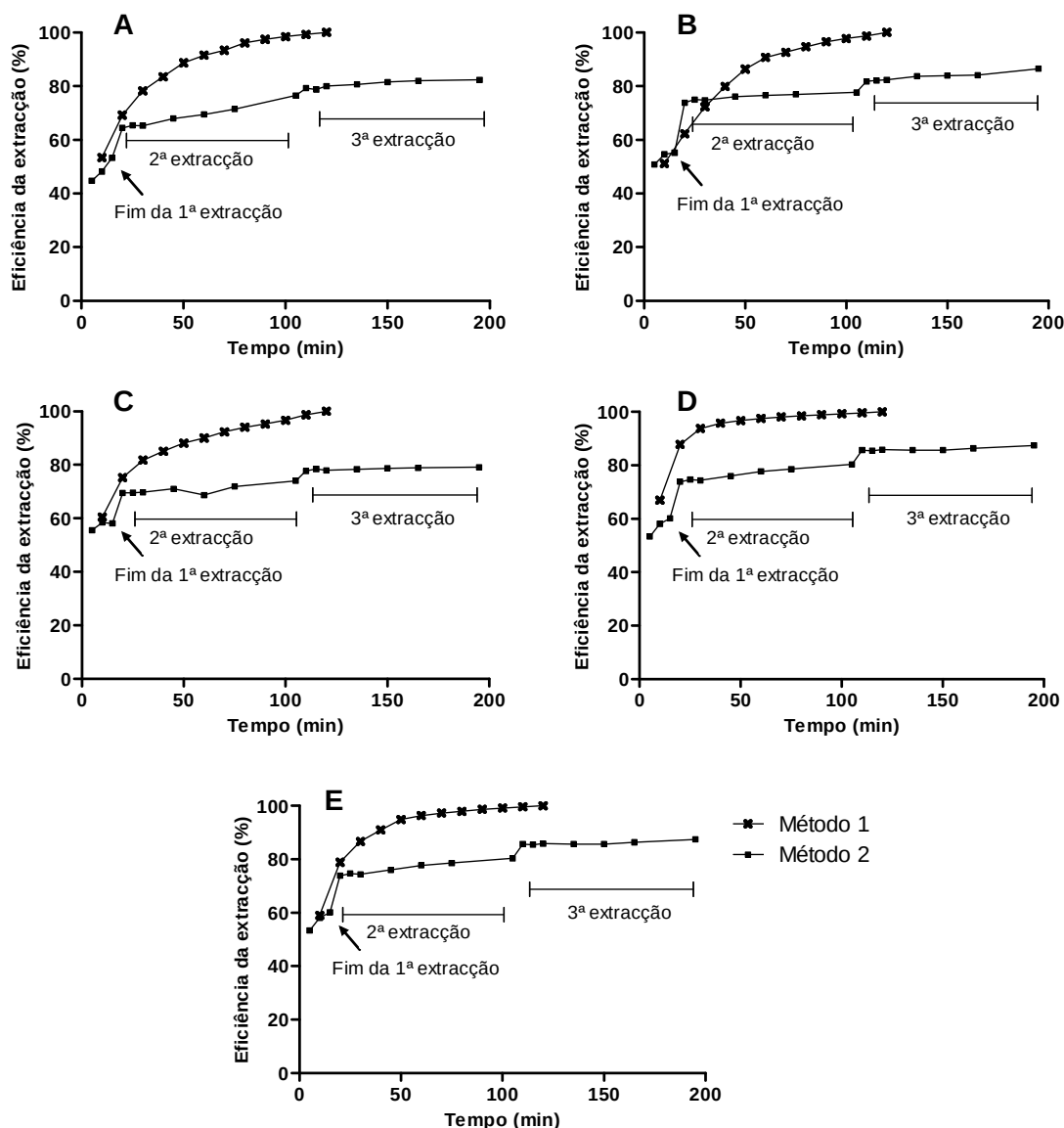


Figura 2.13. Comparação da eficiência extractiva de dois métodos. A – Carvalho; B – Castanheiro; C – Eucalipto; D – Hipericão; E – Nogueira.

A condução do processo extractivo constituído por cinco etapas a 40 °C traduziu-se em todos os casos num aumento da absorvência quer em 350 quer em 280 nm, em comparação com a extracção conduzida à temperatura ambiente (Figura 2.14). No caso do eucalipto, o aumento foi bastante reduzido, sendo o maior efeito foi observado para a noqueira. Os valores de absorvência variaram muito em função da planta, sendo a absorvência em 280 nm sempre superior à registada em 350 nm. Com base no conjunto dos resultados obtidos, foi seleccionado como método extractivo um

método constituído por cinco etapas extractivas, cada com a duração de 10 min, conduzido a 40 °C.

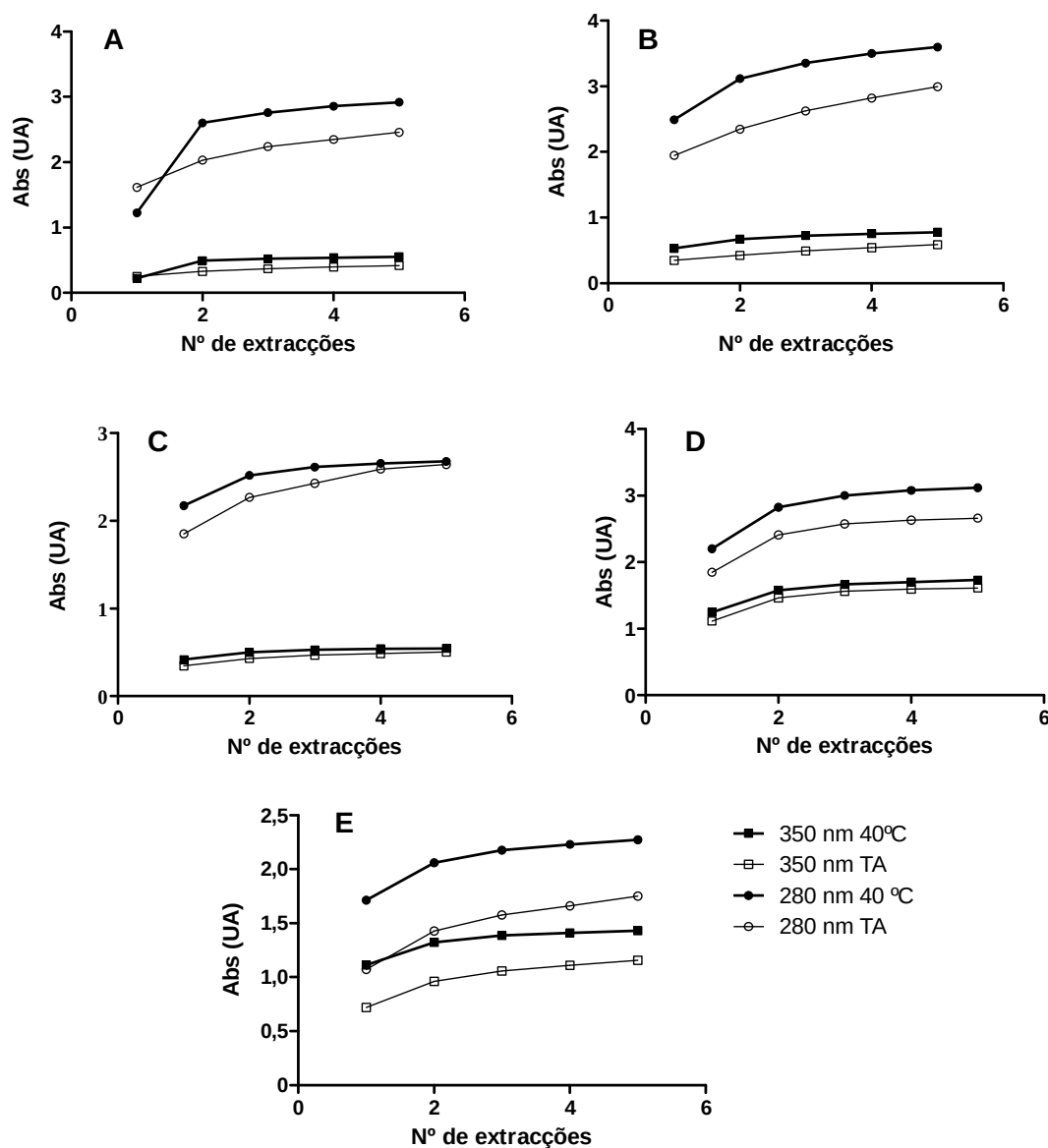


Figura 2.14. Efeito da temperatura na eficiência da extracção. A – Carvalho; B – Castanheiro; C – Eucalipto; D – Hipericão; E – Nogueira. TA – Temperatura ambiente.

A Tabela 2.10 apresenta a comparação entre a actividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos dos extractos obtidos com o método inicial e com o método optimizado. No caso do carvalho, o método optimizado conduziu à obtenção de um extracto com maior actividade antioxidante e, simultaneamente, um teor mais elevado de compostos fenólicos totais, alterações estas com significado estatístico. Nos outros casos, pelo menos um dos parâmetros apresentou um incremento estatisticamente significativo, com excepção do hipericão para o qual o método optimizado não se traduziu em alterações estatisticamente significativas. O ácido ascórbico e a rutina apresentaram

no ensaio de avaliação da capacidade captadora do radical DPPH valores de IC_{50} (média $\pm$ dp) de $5,26 \pm 0,88$ e $9,92 \pm 0,91$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O efeito captador do radical DPPH foi dependente da concentração para todos os extractos (Figura 2.15).

Tabela 2.10. Comparação entre a actividade captadora do radical DPPH e o teor de compostos fenólicos totais dos extractos obtidos com o método inicial e com o método optimizado

Planta	DPPH (média $\pm$ dp, IC_{50} $\mu\text{g/ml}$, n= 3)		Teor de compostos fenólicos totais (média $\pm$ dp, EAG mg /g liofilizado, n= 3)	
	Extracto	Extracto optimizado	Extracto	Extracto optimizado
<i>Eucalyptus globulus</i>	$16,12 \pm 0,47$	$11,99 \pm 1,58$ $p = 0,012^*$	$289,6 \pm 1,4$	$311,2 \pm 20,2$ $p = 0,205$
<i>Castanea sativa</i>	$13,87 \pm 1,33$	$12,58 \pm 1,09$ $p = 0,218$	$243,3 \pm 4,7$	$283,8 \pm 15,1$ $p = 0,014^*$
<i>Quercus robur</i>	$10,75 \pm 1,30$	$7,53 \pm 0,70$ $p = 0,020^*$	$302,4 \pm 12,4$	$346,3 \pm 6,7$ $p = 0,006^*$
<i>Juglans regia</i>	$19,69 \pm 0,98$	$16,65 \pm 1,00$ $p = 0,020^*$	$274,5 \pm 3,6$	$269,9 \pm 4,81$ $p = 0,254$
<i>Hypericum androsaemum</i>	$11,2 \pm 1,50$	$11,25 \pm 1,13$ $p = 0,991$	$276,7 \pm 6,8$	$280,9 \pm 3,8$ $p = 0,407$

*valores estatisticamente significativos

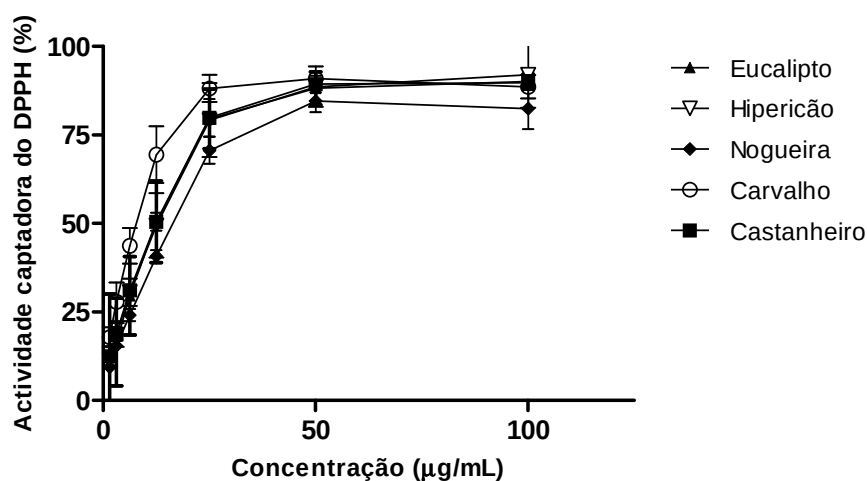


Figura 2.15. Actividade captadora de DPPH exercida pelos extractos em estudo. Os resultados correspondem à média de no mínimo quatro determinações em que as barras de erro representam o dp.

2.5 DISCUSSÃO

Vários métodos extractivos são correntemente usados para extrair compostos fenólicos, sendo o mais frequentemente utilizado a extracção sólido-líquido. Inúmeros solventes podem ser utilizados, sendo genericamente admitido que as soluções etanólicas ou metanólicas de diferente graduação têm a capacidade de extrair quase todos os tipos de flavonóides e derivados de ácidos fenólicos [192]. A Farmacopeia Portuguesa VIII preconiza um método extractivo em que o solvente é uma solução hidroalcoólica ou metanólica para os flavonóides dos fármacos contendo flavonóides, como é o caso da laranja-amarga e pirliteiro [263].

Neste trabalho, utilizaram-se soluções etanólicas nas graduações de 40° e 70°, bem como água e etanol para a obtenção dos extractos. Para além da sua reconhecida capacidade extractiva de compostos fenólicos, estes solventes foram também seleccionados pela sua inocuidade e compatibilidade com o tecido cutâneo.

Vários autores dedicaram-se ao estudo da optimização do método extractivo com vista à obtenção de extractos com uma actividade antioxidante mais elevada [292-295]. O tipo de solvente extractivo tem uma marcada influência no processo extractivo. As propriedades físicas do solvente ou da mistura de solventes tais como a densidade, a viscosidade e a constante dielétrica determinam a sua eficácia como solvente extractivo. Em todos os casos, excepto para o eucalipto, o solvente mais eficaz foi uma mistura hidroalcoólica, o que é concordante com inúmeros relatos de que este tipo de solvente constitui um dos mais eficazes solventes extractivos para compostos fenólicos [296]. É também reconhecido que o poder de penetração do solvente, ou seja a facilidade de atravessar as paredes das células mortas e dissolver os constituintes retidos no seu interior, é mais elevado para a água e líquidos orgânicos miscíveis com a água, tais como o etanol [297]. Após pulverização, ocorre um grande aumento da área do material a extrair e a ruptura das paredes celulares, ambos fenómenos favorecedores do processo extractivo. Uma vez eliminada, na totalidade ou em parte, a barreira que impedia a penetração do solvente, este entra em contacto directo com os componentes das células, O processo extractivo decorre da difusão da solução altamente concentrada localizada no interior das células fragmentadas para o solvente, processo que se prolonga até ser atingido um estado de equilíbrio entre a concentração do meio intracelular e o solvente [298]. A renovação do solvente traduziu-se numa extracção mais eficaz do que o prolongamento do contacto do solvente com a planta. A renovação do solvente provoca a alteração do equilíbrio, com o consequente aumento da difusão do material solúvel do interior das células vegetais para o solvente.

Factores como o tempo e temperatura de extracção, para além do solvente e método extractivos são considerados críticos. A temperatura durante a secagem e a extracção afecta a estabilidade dos antioxidantes devido à possibilidade de ocorrência de degradação química ou enzimática, perdas por evaporação ou decomposição térmica [299]. Este último mecanismo foi sugerido como o primordial na redução de teor de polifenóis durante a secagem a temperaturas elevadas [300]. Neste trabalho, a temperatura testada foi de 40 °C, idêntica à usada na fase de evaporação do etanol, com vista a minimizar a degradação dos compostos antioxidantes. O aumento da temperatura de extracção levou a um aumento das absorvências medidas em 350 e em 280 nm, as quais constituíram indicadores da extracção de compostos fenólicos, para todos os extractos. O aumento da temperatura favorece a extracção em função do aumento da solubilidade dos compostos a extrair. Este efeito favorável da temperatura na extracção de compostos fenólicos é referido por diversos autores [301, 302].

O prolongamento da extracção não se traduziu num aumento continuado da eficácia extractiva. Estudos conduzidos com grainhas de uva revelaram que numa extracção com a duração de 200 min, 80 a 90 % dos compostos fenólicos são extraídos nos primeiros 40 min [302]. A curva da cinética de extracção sólido-líquido obtida no estudo citado apresenta uma fase inicial de elevada taxa de extracção seguida de uma taxa mais lenta, atingindo-se um equilíbrio, de uma forma assintótica. O estudo da concentração de etanol, temperatura e tempo de extracção na actividade antioxidante de um extracto obtido de uma planta rica em flavonóides demonstrou que os dois primeiros parâmetros têm um papel importante na actividade antioxidante do extracto, enquanto o tempo (comparação entre 2 e 24 h) tem um efeito pouco expressivo [303]. Estes resultados são comparáveis aos obtidos neste trabalho.

Extractos de nove plantas da flora portuguesa, obtidos com quatro solventes diferentes, foram caracterizados em termos da actividade captadora do radical DPPH e teor de compostos fenólicos totais. Cinco plantas com maior actividade antioxidante foram identificadas e para cada uma foi definido o solvente que conduziu à obtenção do extracto mais activo. De uma forma sistemática, estudou-se o efeito do solvente, do tempo de extracção, do método extractivo e da temperatura na preparação de extractos com propriedades antioxidantes obtidos a partir das cinco plantas seleccionadas. Foi possível estabelecer um método extractivo para as cinco plantas em estudo, constituído por cinco etapas extractivas, cada com a duração de 10 min, conduzido a 40 °C.

A optimização das condições do processo extractivo favorece a obtenção de um extracto com maior actividade e constitui um importante contributo para a obtenção de extractos com características mais reprodutíveis.

3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CAPTADORA DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E DE AZOTO E ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA

3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CAPTADORA DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E DE AZOTO E ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA

Com base nos resultados do capítulo anterior foram seleccionados extractos de cinco plantas, tendo sido definido para cada uma o solvente que conduz à obtenção do extracto com maior capacidade captadora do radical DPPH. Definiu-se também um método extractivo, após um processo de optimização, idêntico para todas as plantas e que conduziu, na maioria dos casos, à obtenção de extractos com maior capacidade antioxidante.

Com o objectivo de efectuar uma melhor discriminação da capacidade antioxidante dos extractos procedeu-se à avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio e azoto com relevância fisiológica. Nos ensaios anteriores, a avaliação da capacidade antioxidante efectuou-se pelo estudo da capacidade captadora do radical DPPH, que embora sendo uma metodologia de amplo uso utiliza um radical sintético, sendo assim uma abordagem muito redutora. Neste capítulo, todas as espécies reactivas estudadas foram directamente relacionadas com o stress oxidativo cutâneo induzido pela exposição à radiação solar, tal como discutido na introdução desta tese.

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 Avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS)

Em todos os casos a concentração capaz de produzir 50 % do efeito (IC_{50}) foi calculada a partir do gráfico que representa a concentração *versus* o efeito, por regressão linear (MS Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, EUA).

3.1.1.1 Radical superóxido

A avaliação da capacidade captadora do $O_2^{\cdot -}$ foi realizada por espectrofotometria no visível, monitorizando-se a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT – *Nitro blue tetreazolium*) a diformazano pelo $O_2^{\cdot -}$ [304]. O $O_2^{\cdot -}$ foi gerado quimicamente pela reacção do metossulfato de fenazina (PMS – *Phenazine metossulfate*) com a forma reduzida da β -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), na presença do oxigénio (Eq. 3.1). Após redução pela NADH, o PMS reduzido reage com o oxigénio molecular originando o $O_2^{\cdot -}$ (Eq. 3.2). O diformazano é um composto de cor azul que apresenta um máximo de absorção a 560 nm, pelo que é possível detectá-lo espectrofotometricamente e

consequentemente avaliar o grau de redução do NBT. Qualquer molécula capaz de sequestrar o $O_2^{\cdot-}$ conduzirá a uma diminuição na velocidade de redução do NBT.



A mistura reaccional continha, num volume final de 300 μ l, os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: NADH (166 μ M), NBT (43,3 μ M) e extractos em diferentes concentrações dissolvidos em solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 , 19 mM, pH 7,4) ou dimetilsulfóxido (DMSO). A reacção é iniciada pela adição de PMS (2,7 μ M). Não se verificou qualquer interferência do DMSO no valor de absorvência resultante da redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$. As determinações dos valores de absorvência foram efectuadas em 560 nm, à temperatura ambiente, durante 2 min em leitor de placas (BIOTEK, modelo ELX 808, EUA). O ácido ascórbico e o trolox foram usados como controlos positivos. O ensaio foi efectuado em triplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador de $O_2^{\cdot-}$ foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da redução do NBT induzida pelo $O_2^{\cdot-}$, de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de } O_2^{\cdot-} (\%) = 100 - \frac{D_{amostra}}{D_{controlo}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.1}$$

sendo $D_{amostra}$ o declive da recta obtida com os valores de absorvência/min do ensaio na presença do extracto em estudo e $D_{controlo}$ o declive da recta obtida do ensaio efectuado na ausência do extracto.

Foram efectuados ensaios para estudar possíveis interferências na metodologia. Estes ensaios foram efectuados na ausência de NBT e na ausência de PMS e NADH. Não se verificou alteração do valor da absorvência para qualquer dos extractos estudados. Para avaliar a possibilidade dos extractos oxidarem o diformazano, revertendo-o a NBT, os extractos foram adicionados à mistura reaccional após 2 min. Não se verificou alteração do valor da absorvência para qualquer dos extractos estudados.

3.1.1.2 Peróxido de hidrogénio

A avaliação da capacidade de captação de H_2O_2 foi realizada por quimioluminescência, monitorizando-se a oxidação da lucigenina pelo H_2O_2 [305]. O H_2O_2 induz a oxidação da lucigenina que origina um sinal de quimioluminescência, o qual consiste na emissão de radiação luminosa electromagnética em consequência de uma reacção química.

A mistura reaccional continha, num volume final de 250 μL , os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: lucigenina (1,6 mM) dissolvida em solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 , 50 mM, pH 7,4), extractos testados em diferentes concentrações dissolvidos em solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 , 50 mM, pH 7,4) ou DMSO. A reacção foi iniciada pela adição de H_2O_2 (2% m/m) e decorreu a 37 °C. As leituras efectuaram-se em leitor de placas (BIOTEK, modelo Synergy HT, EUA). A solução de H_2O_2 foi preparada diariamente por diluição de uma solução concentrada (30 %). Não se verificou nenhuma interferência do DMSO na oxidação da lucigenina pelo H_2O_2 . O ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo.

O ensaio foi efectuado em triplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador dos extractos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da lucigenina induzida pelo H_2O_2 , de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ (\%)} = 100 - \frac{L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}}}{L_{\text{controlo}} - L_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.2}$$

sendo L_{amostra} o valor de luminescência do ensaio realizado na presença do extracto em estudo, L_{controlo} o valor de luminescência do ensaio realizado na ausência de extracto e L_{branco} o valor de luminescência do ensaio realizado na ausência de extracto e H_2O_2 .

A interferência dos extractos na intensidade do sinal de luminescência foi previamente avaliada. Estes ensaios realizaram-se na ausência de lucigenina. Não se verificou alteração do valor de luminescência para qualquer dos extractos estudados. Foi estudada a reactividade directa dos extractos com a lucigenina na ausência de H_2O_2 , não se tendo observado alterações do valor de luminescência para os extractos estudados.

3.1.1.3 Radical peroxilo

A avaliação da capacidade de captação de ROO[•] foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da fluoresceína pelo ROO[•] de acordo com o método descrito por Fernandes *et al.* [306]. O ROO[•] é gerado pela termodecomposição do dicloridrato de α,α' -azobisisobutiramidina (AAPH) a 37 °C (Eqs. 3.3 e 3.4).



Designa-se como ORAC (Capacidade de absorção de radicais de oxigénio – *Oxygen radical antioxidant capacity*) a capacidade de captação de ROO[•], avaliada pela monitorização da oxidação de uma sonda fluorescente pelo ROO[•] ao longo do tempo, e que é traduzida pela diminuição da intensidade da sua fluorescência. A reacção é conduzida até à completa inibição da fluorescência, sendo a quantificação da inibição obtida pelo cálculo da área sob a curva (AUC) do gráfico obtido. O valor de ORAC agrupa assim o tempo e o grau de captação do ROO[•].

A mistura reaccional continha, num volume final de 200 μl , os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: fluoresceína (61 nM) e extractos em diferentes concentrações. O ensaio foi iniciado pela adição de AAPH (19 mM). Todas as soluções foram preparadas com solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 , 75 mM, pH 7,4). A fluorescência foi continuamente monitorizada em leitor de placas (BIO TEK, modelo Synergy HT, EUA), nos comprimentos de onda de excitação e emissão em 485 nm e em 528 nm, respectivamente, em intervalos de 1 min, até ser atingido um valor de fluorescência menor ou igual a 0,5 % do valor da fluorescência da leitura imediatamente anterior. O trolox foi utilizado como composto referência. O ensaio foi efectuado em triplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

A capacidade captadora de ROO[•], por parte dos extractos de plantas em estudo, exprimiu-se na forma de valor de ORAC, calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Valor de ORAC} = \frac{AUC_{amostra} - AUC_{branco}}{AUC_{trolox} - AUC_{branco}} \times \frac{\text{Molaridade de trolox}}{\text{Concentração de extracto } (\mu\text{g / mL})}$$

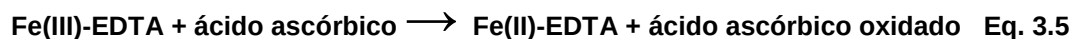
Fórmula 3.3

sendo $AUC_{amostra}$ o valor da área sob a curva do ensaio realizado na presença do extracto em estudo, AUC_{branco} o valor da área sob a curva do ensaio realizado na ausência do extracto e AUC_{trolox} o valor da área sob a curva do ensaio realizado na presença de trolox 1 μM .

Foram efectuados ensaios para avaliar a possível interferência dos extractos no sinal de fluorescência. Estes ensaios realizaram-se na ausência de fluoresceína e verificou-se que não houve qualquer alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo. Efectuaram-se também ensaios na ausência de AAPH, para avaliar um possível efeito “*quenching*” da fluorescência por parte dos extractos. Verificou-se que não ocorreu alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo.

3.1.1.4 Radical hidroxilo

A avaliação da capacidade de captação de $\text{HO}^\bullet$ pelos extractos realizou-se com um método espectrofotométrico. A desoxirribose é degradada a malonildialdeído (MDA) na presença do $\text{HO}^\bullet$, formando-se um cromóforo corado de rosa após reacção com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido, a quente [307]. A formação deste composto foi monitorizada em 532 nm. O $\text{HO}^\bullet$ foi gerado através da reacção de Fenton (Eq. 3.5). Esta reacção é acelerada na presença de agentes redutores, tais como o ácido ascórbico (Eq. 3.6).



A mistura reaccional continha, num volume final de 1 ml, os seguintes constituintes nas concentrações finais indicadas: desoxirribose (2,8 mM), FeCl_3 -EDTA (20 μM – 100 μM), ácido ascórbico (50 μM) e os extractos, avaliados em diferentes concentrações. O volume foi completado até 1 ml com solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 , 10 mM, pH 7,4). A reacção foi iniciada pela adição de H_2O_2 (1,42 mM). Após uma hora de incubação a 37 °C, adicionou-se 1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico

(1 % m/V), preparado extemporaneamente, e 1 ml de ácido tricloroacético (2,8 % m/V) e aqueceu-se durante 15 min a 100 °C. As determinações dos valores de absorvência dos controlos e das amostras realizaram-se em 532 nm em espectrofotómetro (Jasco Corporation, modelo V-530, Japão) contra os respectivos brancos (sem H₂O₂), após arrefecimento das misturas. O manitol foi usado como controlo positivo. O ensaio foi efectuado em duplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador dos extractos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da degradação da desoxirribose a MDA, induzida pelo HO[•], de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de HO}^{\bullet} (\%) = 100 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.4}$$

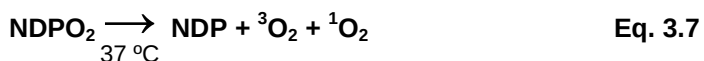
sendo A_{amostra} o valor de absorvência do ensaio realizado na presença do extracto em estudo, A_{controlo} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto.

Realizaram-se também ensaios na ausência de EDTA, com o intuito de avaliar a actividade quelante de ferro dos extractos, e na ausência de ácido ascórbico para avaliar uma potencial acção pró-oxidante. Na ausência de EDTA, o ferro liga-se à desoxirribose e a geração de HO[•] ocorre localmente, na proximidade das moléculas deste açúcar [308]. Na presença de quelantes de ferro, este é removido da molécula de desoxirribose e a sua degradação é inibida [309]. Uma eventual acção pró-oxidante dos extractos pode avaliar-se verificando-se se na ausência de ácido ascórbico ocorre geração de HO[•], traduzida na degradação da desoxirribose [310].

3.1.1.5 Oxigénio singuleto

A avaliação da capacidade de captação do ¹O₂ pelos extractos foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação da di-hidrorodamina (DHR) a rodamina 123 (RH) pelo ¹O₂ [311].

O ¹O₂ foi gerado quimicamente, pela termo-decomposição do endoperóxido 3,3'-(1,4-natfaleno)-bispropanoato dissódico (NDPO₂) a 3,3'-(1,4-natfaleno)-bispropanoato dissódico (NDP) a 37°C, (Eq. 3.7).



Uma solução stock de DHR (2,89 mM) em dimetilformamida foi conservada em atmosfera de azoto a -20 °C. A mistura reaccional continha, num volume final de 250 µl,

os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: DHR (50 μ M), histidina (10 mM) e extractos avaliados em diferentes concentrações, dissolvidos em solução tampão de fosfato (Na_2HPO_4 , 100 mM, pH 7,4). O ensaio foi iniciado pela adição do NDPO₂, previamente sintetizado, de acordo com o método de Costa *et al.* [311]. Este composto foi cedido pelo grupo de investigação que o sintetizou. As determinações dos valores de fluorescência foram efectuadas a 37 °C, após um período de 30 min, em leitor de placas (BIOTEK, modelo Synergy HT, EUA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão em 485 nm e em 528 nm, respectivamente [311]. O ácido ascórbico foi utilizado como controlo positivo. O ensaio foi efectuado em duplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador de ¹O₂ foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da DHR induzida pelo ¹O₂, de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de } ^1\text{O}_2 (\%) = 100 - \frac{F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.5}$$

sendo F_{amostra} o valor da fluorescência do ensaio realizado na presença dos extractos, F_{controlo} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e F_{branco} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e NDPO₂.

Foram efectuados ensaios na ausência de DHR para estudar possíveis interferências na metodologia. Não se verificou qualquer alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo. Efectuaram-se também ensaios na ausência de NDPO₂ que demonstraram ausência de alteração do valor de fluorescência. Foram ainda efectuados ensaios para avaliar um possível efeito “*quenching*” da fluorescência por parte dos extractos, adicionando-se os extractos à mistura reacção após 30 min. Não se verificou alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo.

3.1.1.6 Óxido nítrico

A capacidade de captação do [•]NO foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação do composto não fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) a triazolofluoresceína pelo [•]NO de acordo com o descrito por Fernandes *et al.* [312]. O [•]NO foi gerado pelo 3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5), o qual liberta [•]NO (Eq. 3.8).



Eq. 3.8

Uma solução stock de DAF-2 em DMSO foi previamente preparada e mantida em atmosfera de azoto, a -20 °C. As diluições de DAF-2 a partir da solução stock foram preparadas com solução tampão de fosfato (KH₂PO₄, 50 mM, pH 7,4), imediatamente antes de cada ensaio e colocadas no gelo ao abrigo da luz.

A mistura reaccional continha, num volume final de 250 µl, os seguintes reagentes, nas concentrações finais indicadas: DAF-2 (5 µM) e extractos em diferentes concentrações dissolvidos em solução tampão de fosfato (KH₂PO₄, 50 mM, pH 7,4) ou DMSO. A reacção foi iniciada pela adição de NOC-5 (10 µM). Não se verificou nenhuma interferência do DMSO na oxidação da DAF-2 pelo [•]NO. As determinações dos valores de fluorescência foram efectuadas a 37 °C, após um período de 30 min, em leitor de placas (BIOTEK, modelo Synergy HT, EUA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão em 485 nm e em 528 nm, respectivamente. A rotina foi utilizada como controlo positivo. O ensaio foi efectuado em triplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador de [•]NO foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da DAF-2 induzida pelo [•]NO, de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de } ^\bullet\text{NO (\%)} = 100 - \frac{F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.6}$$

sendo F_{amostra} o valor da fluorescência do ensaio realizado na presença dos extractos, F_{controlo} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e F_{branco} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e do NOC-5.

Realizaram-se ensaios na ausência de DAF-2 para avaliar possíveis interferências no sinal de fluorescência. Não se verificou qualquer alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo. Para avaliar a reactividade dos extractos com DAF-2, efectuaram-se testes na ausência de NOC-5. Não se verificou qualquer alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo. Foram ainda efectuados ensaios para avaliar um possível efeito “*quenching*” da fluorescência por parte dos extractos, adicionando-se os extractos no final da reacção. Também neste caso, não se verificou nenhuma alteração do valor de fluorescência para qualquer dos extractos em estudo.

3.1.1.7 Anião peroxinitrito

A avaliação da capacidade de captação de ONOO^- foi realizada por fluorimetria, monitorizando-se a oxidação do composto não fluorescente DHR a RH, que apresenta fluorescência, pelo ONOO^- de acordo com a metodologia descrita por Kooy *et al.* [313]. O ONOO^- foi cedido pelo grupo de investigação que o sintetizou pela adição de uma solução de NaNO_2 a uma solução de H_2O_2 em meio ácido, de acordo com o método descrito por Fernandes *et al.* [312]. Após preparação, a solução foi conservada em atmosfera de azoto, ao abrigo da luz a -80°C . A concentração de ONOO^- variou entre 60 a 80 mM.

Uma solução stock de DHR (2,89 mM) em dimetilformamida foi conservada em atmosfera de azoto a -20°C . As diluições de DHR a partir da solução stock foram preparadas com solução salina tampão de fosfato (NaCl , 90 mM; Na_3PO_4 , 50 mM; KCl 5 mM, pH 7,4), contendo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA, 100 μM) adicionado imediatamente antes de cada ensaio, e colocadas em gelo e ao abrigo da luz.

A mistura reaccional continha, num volume final de 300 μl , os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: DHR (5 μM) e extractos em diferentes concentrações. O ensaio foi iniciado pela adição do ONOO^- (600 nM) previamente sintetizado, dissolvido em NaOH (0,05 M). Todos os reagentes foram dissolvidos em solução salina tampão de fosfato (NaCl , 90mM; Na_3PO_4 , 50 mM; KCl , 5 mM, pH 7,4).

As determinações dos valores de fluorescência foram efectuadas a 37°C , após um período de incubação de 5 min a 37°C , em leitor de placas (BIOTEK, modelo Synergy HT, EUA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão em 485 nm e em 528 nm, respectivamente. O ensaio foi efectuado em triplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

O efeito captador dos extractos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da oxidação da DHR induzida pelo ONOO^- , de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito captador de } \text{ONOO}^- (\%) = 100 - \frac{F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}}{F_{\text{controlo}} - F_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.7}$$

sendo F_{amostra} o valor da fluorescência do ensaio realizado na presença do extracto, F_{controlo} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e F_{branco} o valor da fluorescência do ensaio realizado na ausência do extracto e ONOO^- .

O ensaio foi repetido na presença de NaHCO_3 (25 mM) de forma a simular as condições fisiológicas, considerando a presença de uma elevada quantidade de HCO_3^- no organismo. Foram efectuados ensaios para estudar possíveis interferências na

metodologia, resultantes da reactividade directa dos extractos com ONOO^- . Estes ensaios efectuaram-se na ausência de DHR. Não se verificou qualquer alteração do valor de fluorescência para os extractos em estudo. Efectuaram-se também ensaios na ausência de ONOO^- que demonstraram ausência de alteração do valor de fluorescência. Foram ainda efectuados ensaios para avaliar um possível efeito “*quenching*” da fluorescência por parte dos extractos, adicionando-se os extractos à mistura reaccional após 5 min. Não se verificou alteração do valor de fluorescência para todos os extractos em estudo.

3.1.2 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

3.1.2.1 Identificação dos compostos fenólicos

Uma vez seleccionados os extractos com capacidade antioxidante mais elevada, procedeu-se à identificação dos compostos fenólicos dos extractos de folhas de *C. sativa* e *Q. robur* com recurso a um método de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC – *High performance liquid chromatography*) em fase reversa, com base nos tempos de retenção e espectros UV/VIS. A co-cromatografia com padrões foi utilizada para confirmação da identidade dos compostos fenólicos. As condições do sistema cromatográfico usado estão descritas abaixo.

Sistema cromatográfico

Equipamento: Cromatógrafo Gilson (Gilson Medical Electronics, França) provido de bomba quaternária

Coluna: C18, ODS2 Spherisorb[®] (Waters Corporation, EUA),, 25 x 0,46 cm, tamanho de partícula 5 μm e pré-coluna C18 Spherisorb[®] (Waters Corporation, EUA)

Detector: Detector de fotodíodos (DAD – *Diode array*)

Detecção: Dados espectrais foram acumulados no intervalo 200 – 400 nm e registaram-se cromatogramas em 280, 320 e 350 nm (software Unipoint[®], Gilson Medical Electronics, França)

Eluente: **Solvente A** – Água:ácido fórmico (19:1); **Solvente B** – Metanol

Fluxo: 0,9 ml/min

Volume de injeção: 20 μl

Gradiente: tal como descrito na Tabela 3.1.

A identificação dos compostos fenólicos foi efectuada pelo Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Tabela 3.1. Gradiente do eluente usado na metodologia de identificação e quantificação de compostos fenólicos

Tempo (min)	Solvente A	Solvente B
0	95	5
3	85	15
13	75	25
25	70	30
39	55	45
42	55	45
44	50	50
47	45	55
50	30	70
56	25	75
60	20	80

3.1.2.2 Validação do método de HPLC

Para a validação do método de quantificação dos compostos fenólicos foram avaliados os parâmetros repetibilidade, precisão intermédia e linearidade.

Foram utilizados como padrões o ácido clorogénico, o hiperósido, a rutina e o ácido elágico. Prepararam-se três soluções-mãe em metanol, a partir das quais se efectuou uma série de cinco diluições. Cada concentração de padrão foi assim avaliada em triplicado, de modo a estabelecer a linearidade. As rectas de calibração elaboraram-se com recurso à regressão linear (MS Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, EUA), utilizando o método dos mínimos quadrados.

A repetibilidade foi avaliada pela injeção de uma solução padrão seis vezes, no decurso de mesmo dia. A precisão intermédia foi avaliada injectando uma solução padrão em três dias consecutivos.

3.1.2.3 Quantificação dos compostos fenólicos

Prepararam-se soluções dos extractos em EtOH 70°, as quais foram filtradas por filtro de porosidade 0,22 µm. Os extractos foram quantificados de acordo com o sistema cromatográfico abaixo descrito.

Sistema cromatográfico

Equipamento: Cromatógrafo Varian (Varian Inc., EUA), provido de bomba ternária

Coluna: C18, ODS2 Spherisorb[®] (Waters Corporation, EUA), 25 x 0,46 cm tamanho de partícula 5 µm e pré-coluna C18 Spherisorb[®] (Waters Corporation, EUA)

Detector: Detector UV

Deteção: 0 min. λ = 280 nm; 10 min λ = 320 nm; 30 min λ = 350 nm (software Star Chromatography[®], versão 6.3, Varian Inc., EUA)

Eluente: **Solvente A** – Água:ácido fórmico (19:1); **Solvente B** – Metanol

Fluxo: 0,9 ml/min

Volume de injeção: 20 µl

Gradiente: tal como descrito na Tabela 3.1.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Avaliação da capacidade captadora de espécies reactivas de oxigénio e de azoto

Um efeito captador de HO[•], O₂^{•-} e H₂O₂ dependente da concentração foi observado para todos os extractos (Figura 3.1). No caso do ¹O₂, apenas os extractos de *C. sativa*, *Q. robur* e *H. androsaemum* exibiram efeitos máximos superiores a 50 % permitindo o cálculo do valor de IC₅₀.

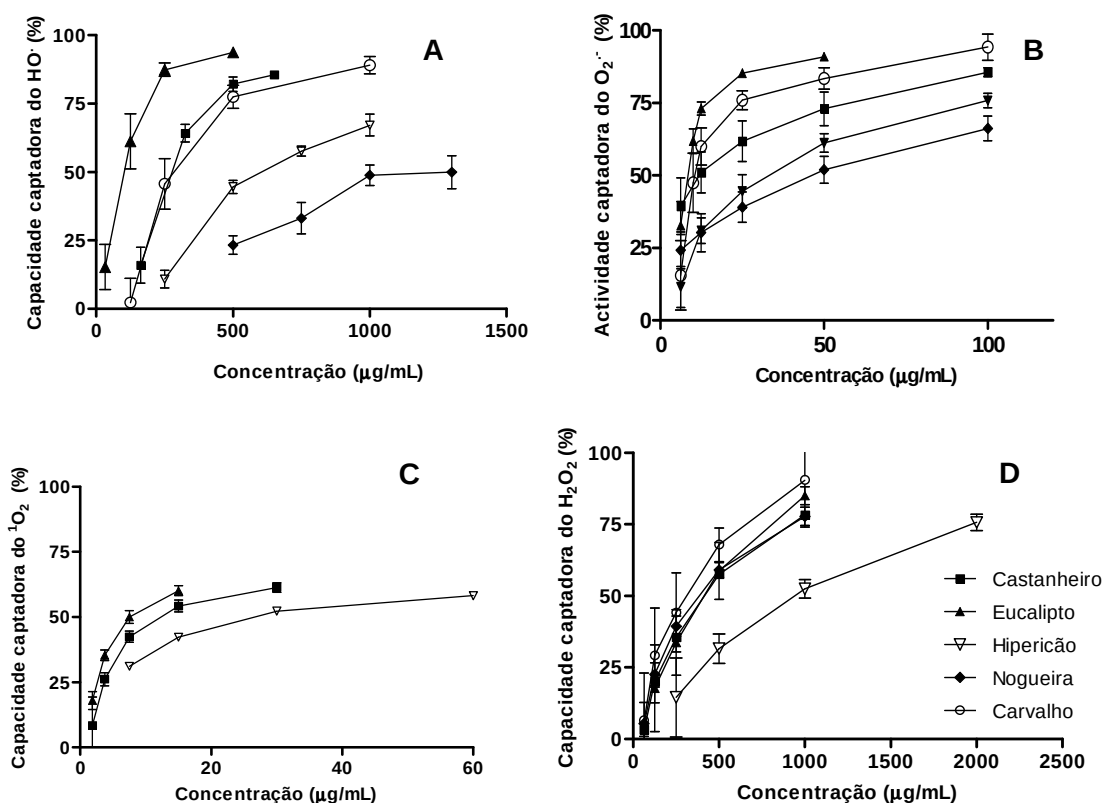


Figura 3.1. Capacidade captadora de HO· (A), O₂·⁻ (B), ¹O₂ (C) e H₂O₂ (D) exercida pelos extractos em estudo. Os resultados correspondem à média de no mínimo 4 determinações em que as barras de erro representam o dp.

As Tabela 3.2 e Tabela 3.3 resumem os resultados obtidos relativos aos ensaios do efeito captador de ROS. O extracto de *E. globulus* foi o que apresentou maior efeito captador de O₂·⁻ e HO·, enquanto o extracto de *C. sativa* se destacou no ensaio de captação do H₂O₂. De entre os três extractos que apresentaram efeitos captadores de ¹O₂ superiores a 50 %, o de *Q. robur* foi o mais activo. O extracto de *J. regia* exibiu o valor de ORAC mais elevado. A comparação dos efeitos dos extractos de plantas com os efeitos dos controlos permitiu evidenciar, em alguns casos, um efeito superior dos extractos. O efeito captador de O₂·⁻ exibido pelos extractos foi mais elevado do que o efeito do controlo trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. No caso do HO·, os extractos de todas as espécies vegetais apresentaram valores de IC₅₀ mais baixos do que os do controlo manitol, com excepção do extracto de *J. regia*. No ensaio de captação do ROO·, todos os extractos apresentaram um efeito captador próximo ou superior ao do ácido ascórbico, com excepção do extracto de *Q. robur*.

Tabela 3.2. Capacidade captadora das espécies reactivas de oxigénio
(IC₅₀ µg /ml; média ± dp, n ≥ 4)

Extracto/composto	O ₂ ^{•-}	HO [•]	H ₂ O ₂	¹ O ₂
<i>Eucalyptus globulus</i>	8,38 ± 0,89	103,7 ± 19,2	388,9 ± 89,7	**
<i>Castanea sativa</i>	13,63 ± 3,91	216,7 ± 10,3	250,8 ± 85,1	12,31 ± 1,36
<i>Quercus robur</i>	10,99 ± 1,11	285,9 ± 47,7	410,0 ± 17,4	7,90 ± 1,13
<i>Juglans regia</i>	47,59 ± 10,20	*	383,4 ± 37,7	**
<i>Hypericum androsaemum</i>	32,72 ± 6,89	595,8 ± 79,4	943,8 ± 94,0	28,30 ± 2,75
Ácido ascórbico	0,028 ± 0,012	—	199,8 ± 48,3	3,42 ± 0,35
Trolox	452,45 ± 17,15	—	—	—
Manitol	—	912,9 ± 106,4	—	—

* Não foi possível calcular o IC₅₀ para a concentração máxima testada (1000 µg /ml)

** O efeito captador máximo observado foi inferior a 50 %

O extracto que exibiu maior efeito captador para cada ROS está sombreado

Não se verificou promoção da degradação da desoxirribose, no ensaio de avaliação da capacidade captadora de HO[•] efectuado na ausência de ácido ascórbico, para nenhum dos extractos em estudo, o que constitui um indicador de ausência de efeito pró-oxidante. Na ausência de EDTA, verificou-se, para todos os extractos, um efeito preventivo da degradação da desoxirribose, o qual está associado a um efeito quelante de ferro.

Tabela 3.3. Valor de ORAC (µmoles de equivalentes em Trolox/mg de extracto, média ± dp, n ≥ 4)

Extracto/composto	ORAC
<i>Eucalyptus globulus</i>	1,43 ± 0,03
<i>Castanea sativa</i>	1,24 ± 0,30
<i>Quercus robur</i>	1,09 ± 0,13
<i>Juglans regia</i>	2,17 ± 0,50
<i>Hypericum androsaemum</i>	1,51 ± 0,26
Ácido ascórbico	1,24 ± 0,42
Trolox	4

O extracto que exibiu maior efeito captador está sombreado

O efeito captador das RNS foi dependente da concentração do extracto, em todos os casos (Figura 3.2). Todos os extractos apresentaram efeitos captadores superiores a 50 % para as espécies reactivas estudadas.

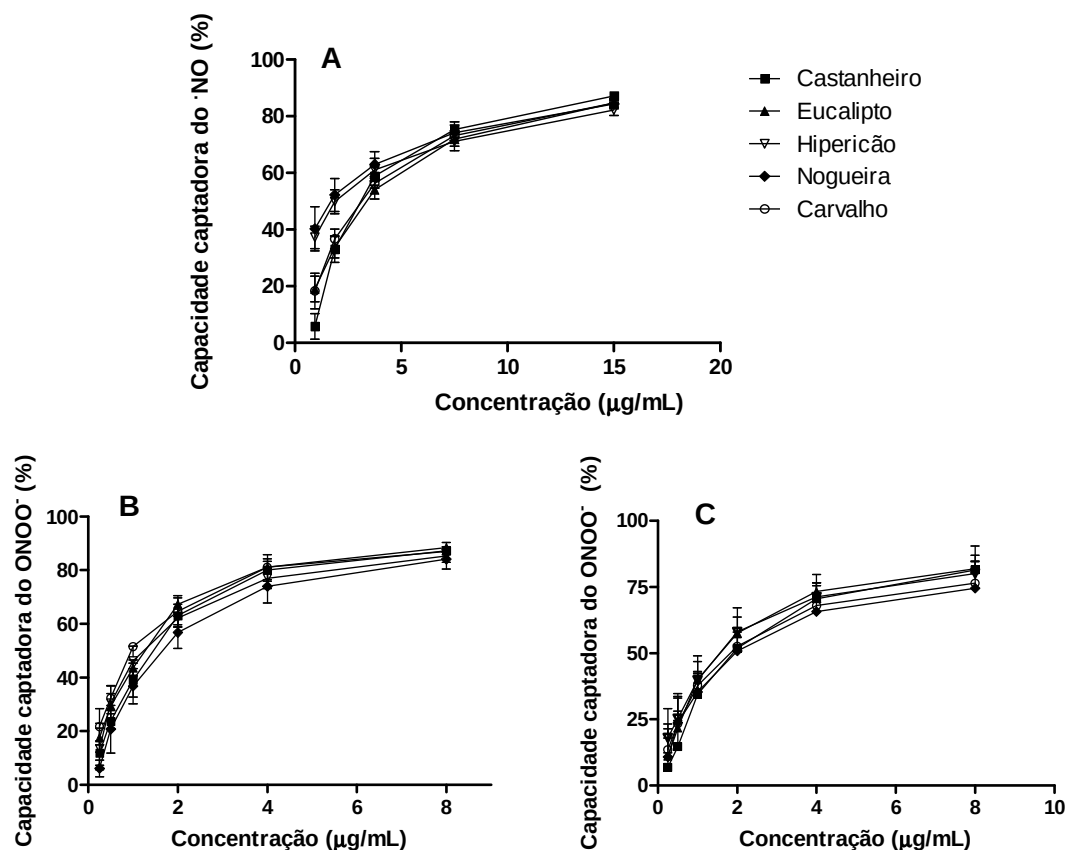


Figura 3.2. Capacidade captadora de NO· (A) e ONOO· na ausência (B) e na presença (C) de NaHCO₃ exercida pelos extractos em estudo. Os resultados correspondem à média de no mínimo quatro determinações em que as barras de erro representam o dp.

Os resultados relativos ao efeito captador de RNS estão resumidos na Tabela 3.4. O extracto de *Q. robur* exibiu o maior efeito captador de ONOO·, quer na presença quer na ausência de NaHCO₃, enquanto o extracto de *J. regia* se evidenciou no ensaio de captação de NO·.

Tabela 3.4. Capacidade captadora de $\cdot\text{NO}$ e de ONOO^- na presença e na ausência de NaHCO_3 (IC_{50} $\mu\text{g}/\text{ml}$, média $\pm$ dp, $n \geq 4$)

Extracto/composto	$\cdot\text{NO}$	ONOO^-	ONOO^- na presença de NaHCO_3
<i>Eucalyptus globulus</i>	3,37 $\pm$ 0,31	1,28 $\pm$ 0,12	1,57 $\pm$ 0,31
<i>Castanea sativa</i>	3,10 $\pm$ 0,28	1,48 $\pm$ 0,20	1,95 $\pm$ 0,47
<i>Quercus robur</i>	3,13 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,35
<i>Juglans regia</i>	1,95 $\pm$ 0,58	1,66 $\pm$ 0,24	2,01 $\pm$ 0,45
<i>Hypericum androsaemum</i>	2,18 $\pm$ 0,40	1,21 $\pm$ 0,23	1,74 $\pm$ 0,63
Ácido ascórbico	—	0,21 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,09
Rutina	0,86 $\pm$ 0,06	—	—
Cisteína	—	0,46 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,15

O extracto que exibiu maior efeito captador para cada RNS está sombreado.

O efeito captador de ONOO^- é ligeiramente modificado pela presença de HCO_3^- . Está documentada a modulação da reactividade do ONOO^- por concentrações fisiológicas de CO_2 , devido à sua rápida reacção, originando NO_2 e $\text{CO}_3^{\cdot-}$, que são as principais espécies responsáveis pelas reacções de nitração e oxidação observadas *in vivo* [32]. De acordo com os resultados obtidos é provável que os extractos das plantas em estudo sejam também eficientes captadores de NO_2 e $\text{CO}_3^{\cdot-}$, uma vez que o efeito captador não foi muito diferente na presença e na ausência de HCO_3^- .

A capacidade captadora de RNS é, para todos os extractos, mais elevada comparativamente ao efeito captador de ROS, uma vez que os valores de IC_{50} são mais baixos. Nenhum extracto se distinguiu por exibir o efeito antioxidante mais elevado (IC_{50} mais baixo) para todas as ROS e RNS em estudo. Houve maior proximidade entre os diferentes extractos nos resultados de capacidade captadora de RNS comparativamente às ROS. As espécies reactivas para as quais se observaram maiores diferenças entre os efeitos captadores exibidos pelos extractos foram o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o $\text{HO}^\bullet$ e o $^1\text{O}_2$.

3.2.2 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Os extractos de plantas são misturas complexas que incluem compostos de natureza diversa. Neste trabalho, optou-se por efectuar uma caracterização quali-quantitativa dos compostos fenólicos, com base na sua provável contribuição para a capacidade antioxidante do extracto. Não foi, contudo, objectivo efectuar uma caracterização exaustiva da composição fenólica que incluísse a elucidação estrutural dos compostos não identificados. O método cromatográfico usado neste trabalho está

descrito na literatura, tendo sido usado com sucesso na quantificação de compostos fenólicos de produtos naturais [314].

Os cromatogramas dos extractos de *C. sativa* (Figura 3.3) e de *Q. robur* (Figura 3.4) evidenciaram a presença de vários compostos fenólicos. Com base nos espectros UV/Vis e tempos de retenção identificaram-se vários ácidos fenólicos e flavonóides. A presença de compostos com diferentes características, tais como diferentes polaridades, obriga ao uso de um método cromatográfico executado em gradiente, prática corrente na análise química de matrizes naturais. No entanto, a proximidade estrutural de alguns compostos dificulta a sua resolução. No cromatograma de *C. sativa*, a rutina, o hiperósido e a isoquercitrina apresentam co-eluição, em resultado da sua afinidade estrutural. Situação semelhante ocorre no cromatograma do extracto de *Q. robur* em que a rutina e o hiperósido co-eluem.

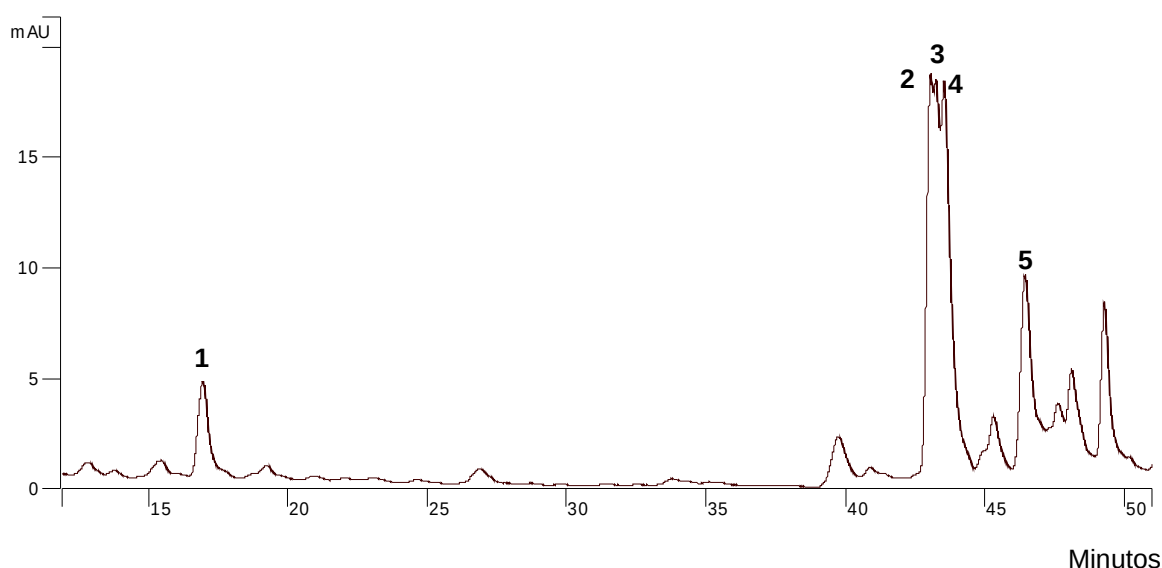


Figura 3.3. Cromatograma do extracto de *C. sativa*. $\lambda = 350$ nm.

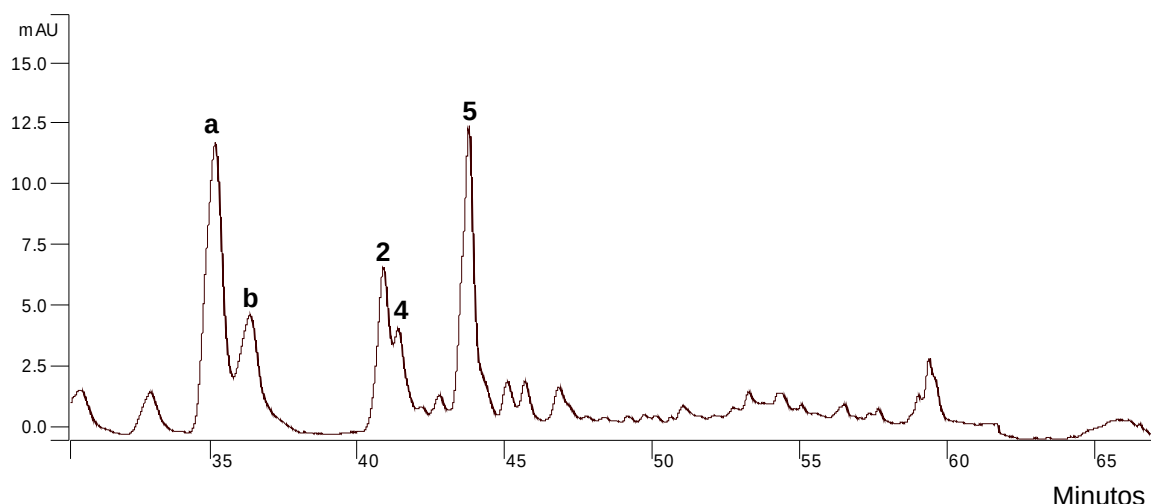


Figura 3.4. Cromatograma do extracto de *Q. robur*. $\lambda = 350$ nm.

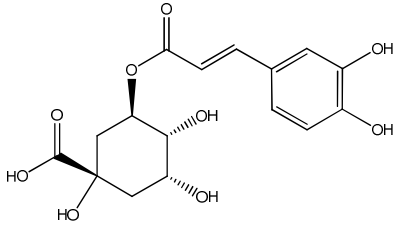
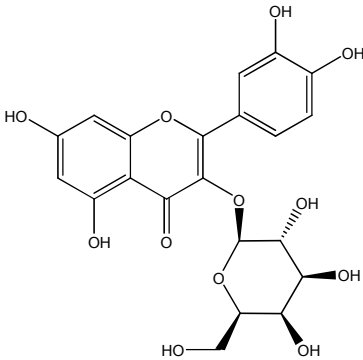
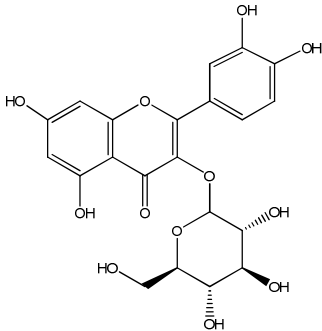
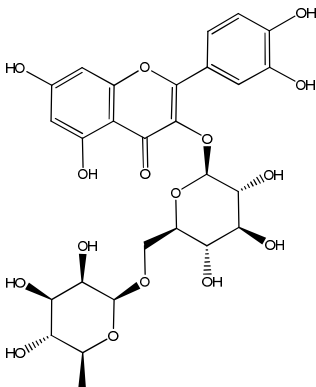
A quantificação dos compostos fenólicos foi antecedida por um processo de validação do método cromatográfico. Os parâmetros de validação estão descritos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros de validação do método cromatográfico usado para quantificação dos compostos fenólicos

Padrão	Repetibilidade (CV %)	Precisão intermédia (CV %)	Linearidade	Amplitude (mg/ml)
Rutina	1,8	5,3	$y = 1,74 \times 10^7 x - 7713$ $R^2 = 1,0000$	0,0039-0,5
Ácido clorogénico	1,7	5,6	$y = 2,71 \times 10^7 x - 28888$ $R^2 = 0,9999$	0,0039-0,5
Hiperósido	0,5	2,8	$y = 2,11 \times 10^7 x - 51357$ $R^2 = 0,9995$	0,0039-0,5
Ácido elágico	2,0	5,6	$y = 1,49 \times 10^7 x + 458$ $R^2 = 0,9987$	0,000977-0,125

A composição fenólica quantitativa dos dois extractos em estudo está descrita na Tabela 3.6.

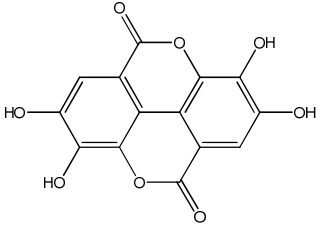
Tabela 3.6. Composição fenólica quantitativa dos extractos de *C. sativa* e *Q. robur* (mg/g de extracto liofilizado, média $\pm$ dp, n= 3)

Identificação no cromatograma	Composto fenólico identificado	<i>Castanea sativa</i>	<i>Quercus robur</i>
Ácido clorogénico			
1		2,81 $\pm$ 0,10	—
Hiperósido			
2			**
Isoquercitrina			
3		16,0 $\pm$ 0,1*	—
Rutina			
4			5,24 $\pm$ 0,04**

*os três flavonóides foram quantificados em conjunto como rutina

**hiperósido e rutina foram quantificados em conjunto como hiperósido

Tabela 3.6. (continuação)

Identificação no cromatograma	Composto fenólico identificado	<i>Castanea sativa</i>	<i>Quercus robur</i>
5	Ácido elágico		
		4,20 ± 0,10	4,08 ± 0,12
a	Flavonol não identificado	—	6,31 ± 0,01***
b	Flavonol não identificado	—	3,74 ± 0,01***

***quantificados como hiperósido

O composto maioritário do extracto de *C. sativa* é a rutina, enquanto o composto maioritário identificado no extracto de *Q. robur* é o ácido elágico.

Os compostos fenólicos identificados nos dois extractos possuem capacidade captadora de algumas das ROS e RNS investigadas neste trabalho, tal como descrito na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Capacidade captadora de ROS e de RNS descrita na literatura para os diferentes compostos fenólicos identificados nos extractos de *Q. robur* e de *C. sativa*

Composto identificado	ROS					RNS	
	O ₂ ^{•-}	HO [•]	H ₂ O ₂	ROO [•]	¹ O ₂	[•] NO	ONOO [•]
Ácido clorogénico	[315]	[316]	[317]	[318]	[319]	—	[320]
Ácido elágico	[321]	[321]	—	[321]		—	
Hiperósido	[322]	[323]	—	[318]	[323]	—	[324]
Isoquercitrina	[325]	[323, 325]	—	[318]	[323]	—	[324]
Rutina	[322]	[326]	[327]	[318]	[328]	[329]	[324, 330]

3.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi efectuada uma caracterização detalhada do efeito captador de diferentes ROS e RNS com o objectivo de seleccionar os extractos para a continuação do estudo, nomeadamente para incorporação em formulações de aplicação cutânea.

Os critérios que presidiram à selecção dos extractos foram: efeito captador para todas as espécies reactivas estudadas e valores baixos de IC₅₀ (ou seja capacidade antioxidante mais elevada). Com base nestes critérios foram seleccionados os extractos de *C. sativa* e *Q. robur*. O ¹O₂ foi uma das ROS que permitiu uma melhor discriminação do efeito captador dos extractos. Esta espécie reactiva foi detectada directamente na pele humana exposta à radiação UVA [53], tendo sido associada a reacções de fotossensibilização decorrentes da exposição de substâncias presentes na pele, tais como o ácido urocânico, à radiação UV. Pode assim considerar-se de crucial importância para uma putativa acção preventiva do stress oxidativo cutâneo, o efeito captador de ¹O₂. Os extractos de *J. regia* e *E. globulus* exibiram efeitos captadores máximos inferiores a 50 %, pelo que a selecção se restringiu aos outros extractos em estudo. Dos extractos de *C. sativa*, *Q. robur* e *H. androsaemum*, este último destacou-se claramente por apresentar valores de IC₅₀ globalmente mais elevados nos ensaios de captação de ROS e RNS, pelo que a escolha recaiu nos outros dois extractos.

Inúmeras espécies vegetais têm aplicação terapêutica em diferentes afecções cutâneas [331, 332]. O uso de plantas como ingredientes de produtos cosméticos é também muito comum [264, 333, 334]. Várias plantas com capacidade antioxidante foram estudadas na perspectiva de aplicação na área dermatológica e/ou cosmética. *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Ginkgo biloba* constituem exemplos representativos. A capacidade antioxidante é frequentemente avaliada pelo ensaio de captação do radical DPPH. Esta metodologia é simples, rápida e de baixo custo e é amplamente utilizada para a caracterização da capacidade antioxidante de compostos, de extractos e de outras matrizes. Os valores mais baixos de IC₅₀ obtidos no ensaio de captação do DPPH, de entre os vários estudos descritos na literatura para as plantas mencionadas anteriormente, independentemente da parte da planta e condições de extracção, foram 8,41 µg/ml (*Camellia sinensis*) [335], 9,23 µg/ml (*Rosmarinus officinalis*) [336], 40,7 µg/ml (*Ginkgo biloba*) [337] e 17,7 µg/ml (*Salvia officinalis*) [338]. Os valores de IC₅₀ do ensaio de captação do DPPH das cinco plantas seleccionadas na primeira etapa deste trabalho e apresentados no capítulo 2 aproximam-se dos valores mais baixos reportados para as espécies vegetais referidas. Tal facto constitui um indicador da potência da capacidade antioxidante dos extractos das espécies vegetais incluídas neste estudo.

O radical DPPH é um radical sintético e como tal tem uma reduzida relevância fisiológica. A avaliação da capacidade antioxidante com base exclusivamente nesse ensaio constitui assim uma abordagem demasiado simplista. Os testes *in vitro* devem ser projectados de forma a aproximarem-se o mais possível aos estados patológicos para os quais se prevê a aplicação dos produtos em estudo [339]. O estudo da capacidade

antioxidante foi desenvolvido para averiguar a potencialidade dos vários extractos de plantas na prevenção e/ou tratamento do stress oxidativo cutâneo. Deste modo, foram seleccionados ensaios de captação de ROS e RNS para as quais está descrita a participação no stress oxidativo da pele, tal como descrito na introdução desta tese. O uso de vários ensaios contribui para uma imagem mais completa do efeito captador do extracto, permitindo aferir a polivalência do efeito antioxidante. Atendendo exclusivamente aos resultados do ensaio de captação do DPPH, a selecção dos extractos, com base nos valores mais baixos de IC₅₀, recairia nos extractos de *E. globulus* e *H. androsaemum*, preferencialmente ao extracto de *C. sativa*. A avaliação complementar do efeito captador de ROS e RNS permitiu uma melhor caracterização da capacidade antioxidante e a definição dos extractos com efeito captador mais elevado, considerando a globalidade dos ensaios.

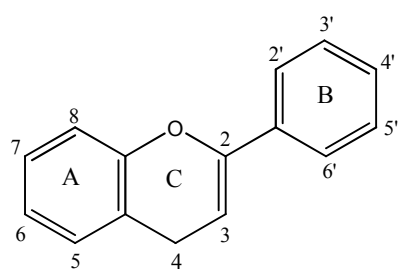
A literatura é escassa relativamente à avaliação da capacidade antioxidante de extractos vegetais envolvendo simultaneamente ROS e RNS, e abrangendo um grupo de sete espécies reactivas, tal como efectuado neste trabalho. Quando os ensaios *in vitro* não são efectuados nas mesmas condições, é dificultada a comparação da capacidade antioxidante entre espécies vegetais. Não é assim possível efectuar comparações da capacidade captadora de ROS e RNS entre as plantas estudadas neste trabalho e as plantas com capacidade antioxidante de uso reportado no campo dermatológico e/ou cosmético, mencionadas anteriormente.

A extrapolação dos efeitos observados nos ensaios *in vitro* para efeitos *in vivo* deve ser efectuada com precaução. Os efeitos antioxidantes observados não constituem uma garantia de eficácia antioxidante *in vivo*. Factores como a biodisponibilidade e a metabolização são determinantes quando a administração dos compostos antioxidantes se efectua *per os*. No caso particular da aplicação cutânea, é fundamental que os antioxidantes apresentem estabilidade na formulação onde estão incorporados e estejam presentes numa concentração adequada no tecido cutâneo.

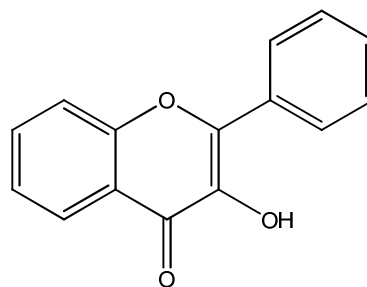
É sobejamente reconhecida a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. Vários autores investigaram a relação estrutura/capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos e flavonóides. O número de grupos hidroxilo ligados ao anel aromático influencia positivamente a capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos. O arranjo na posição *orto* parece favorecer a capacidade captadora de H₂O₂ [317]. Esta característica estrutural está presente nos ácidos fenólicos identificados nos extractos de folhas de *C. sativa* e de *Q. robur*.

Os flavonóides podem distinguir-se estruturalmente em flavonas, flavonóis, isoflavonas, chalconas, flavanóis, flavanonas e antocianidinas [194] (Figura 3.5). As suas propriedades redutoras, nomeadamente, serem dadores de electrões ou de hidrogénio

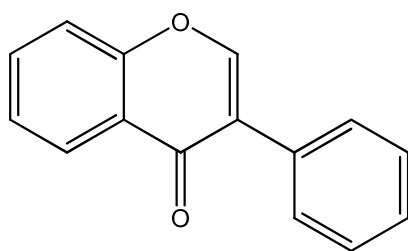
determinam a sua acção antioxidante. A presença de um grupo catecol (3',4'-OH) no anel B dos flavonóides é determinante para uma elevada capacidade antioxidante [340]. Os flavonóides isoquercitrina e hiperósido, identificados nos extractos de *C. sativa* e *Q. robur* possuem o grupo catecol. A presença de uma dupla ligação $C_2=C_3$ e grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 são também requisitos críticos para uma elevada capacidade antioxidante [341]. Essas características estruturais estão presentes nos flavonóis, grupo onde se incluem todos os flavonóides identificados nos extractos de *Q. robur* e *C. sativa*. No entanto, alterações na disposição dos grupos hidroxilo e glicosilação contribuem para a redução da capacidade antioxidante. A rutina, o hiperósido e a isoquercitrina apresentam a posição 3 glicosilada.



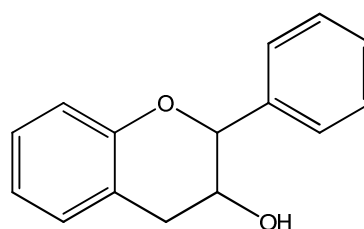
Flavonóide



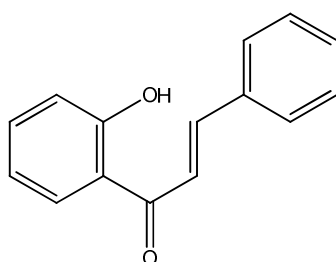
Flavonol



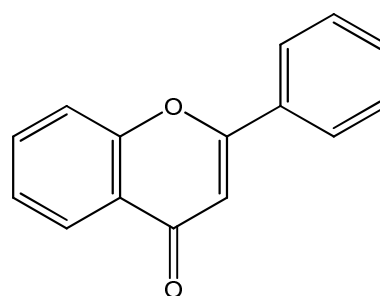
Isoflavona



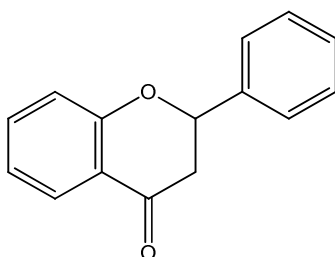
Flavanol



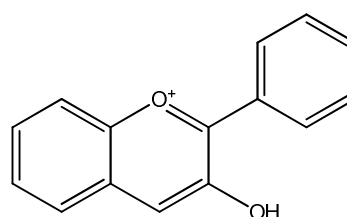
Chalcona



Flavona



Flavanona



Antocianidina

Figura 3.5. Estruturas químicas das subclasses mais comuns de flavonóides.

Para todos os compostos fenólicos identificados nos extractos de *C. sativa* e de *Q. robur* está documentada a capacidade de captar uma ou mais das espécies reactivas envolvidas neste estudo. É assim admissível postular o contributo dos compostos

identificados para a capacidade antioxidante dos extractos. A utilização de extractos em alternativa ao uso de fracções ou mesmo de compostos fenólicos isolados tem sido descrita como vantajosa, devido a eventuais efeitos sinérgicos [342]. Diferentes estudos reportam a ocorrência de efeitos sinérgicos da associação de polifenóis, atribuídos a uma provável associação de mecanismos de acção complementares [343]. A sinergia pode também ser secundária ao efeito protector das substâncias que exibem actividade, modulação da permeação de membranas celulares e minimização de mecanismos de resistência [344].

As plantas em estudo têm aplicação na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, tal como referido no capítulo 2. A actividade antioxidante evidenciada neste trabalho poderá estar na génese dos efeitos terapêuticos que lhes são atribuídos, atendendo em particular ao envolvimento de ROS e RNS em algumas das referidas doenças. Salienta-se o exemplo das doenças de foro respiratório tal como a asma, nas quais o *E. globulus* apresenta uso terapêutico tradicional (tal como discutido por Almeida *et al.* [345]), e as doenças hepáticas, nas quais tem interesse terapêutico o *H. androsaemum*.

Em resumo, todos os extractos de plantas da flora portuguesa em estudo exibiram uma apreciável capacidade captadora de diferentes ROS e RNS que estão implicadas no stress oxidativo cutâneo. A discriminação entre os diferentes extractos foi mais evidente nos ensaios de avaliação da capacidade captadora de ROS. Na selecção dos extractos candidatos à incorporação em formulações tópicas, foi tida em conta a capacidade captadora simultânea de todas as ROS e RNS em estudo e a capacidade captadora mais elevada, traduzida em valores mais baixos de IC₅₀. Com bases nestes critérios foram seleccionados os extractos de folhas de *Q. robur* e *C. sativa*. Diversos ácidos fenólicos e flavonóides foram identificados nestes extractos, os quais possuem capacidade captadora de ROS e RNS e são provavelmente responsáveis, pelo menos parcialmente, pelos efeitos antioxidantes demonstrados neste estudo.

4. AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

4. AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Com base nos estudos conduzidos no capítulo anterior, os extractos de *Q. robur* e de *C. sativa* foram considerados os mais promissores candidatos a antioxidantes de uso cutâneo. Neste capítulo, foram executados novos ensaios com vista a seleccionar apenas um dos extractos. A discriminação dos dois extractos efectuou-se com ensaios complementares de caracterização da actividade antioxidante, nomeadamente a avaliação da capacidade de quelatação de ferro e avaliação do potencial redox por voltametria. O ferro apresenta vários efeitos prejudiciais *in vivo*, inclusive no processo de fotoenvelhecimento. A acção quelante de ferro demonstrou proporcionar uma potente acção antioxidante numa grande variedade de modelos animais e doenças humanas [346]. Após aplicação tópica, compostos com acção quelante de ferro contribuem para uma acção preventiva do envelhecimento da pele [347, 348]. A acção quelante de ferro apresenta assim uma particular relevância na caracterização de antioxidantes tópicos. O potencial redox de antioxidantes é um parâmetro muito informativo permitindo prever se a transferência de electrões para espécies reactivas é termodinamicamente possível. Este parâmetro pode obter-se recorrendo a métodos voltamétricos, os quais são frequentemente utilizados para caracterizar antioxidantes fenólicos de origem natural [349, 350].

O potencial irritante cutâneo dos dois extractos de plantas foi também avaliado. A par da eficácia antioxidante, a segurança é um aspecto crucial para uma putativa aplicação dos extractos em estudo como antioxidantes tópicos. A informação disponível relativa ao uso tradicional das folhas de castanheiro e carvalho, sugere uma baixa toxicidade cutânea. A casca de plantas do género *Quercus* é responsável por dermatites de contacto irritativa e alérgica [351], não existindo contudo relatos de efeitos semelhantes da responsabilidade das folhas. A segurança deve ser, contudo, fundamentada com estudos conduzidos em humanos. Os ensaios de aplicação única sob oclusão são amplamente utilizados para a caracterização do potencial irritante cutâneo [352, 353].

Após a selecção do extracto, efectuaram-se alguns estudos conducentes ao desenvolvimento de uma formulação tópica para o veicular. A estabilidade e a fotoestabilidade do extracto foram avaliadas, e o efeito do pH e da glicerina na estabilidade funcional do extracto foi estudado ao longo do tempo e a diferentes temperaturas.

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Avaliação do efeito quelante de ferro

A avaliação do efeito quelante de ferro realizou-se com um método espectrofotométrico. A ferrozina complexa o ião ferroso originando um complexo corado, com um pico de absorção em 562 nm. A formação deste complexo é inibida na presença de quelantes de ferro. O ensaio de quelatação de ferro foi executado de acordo com uma metodologia descrita na literatura [354], com modificações. A mistura reaccional continha, num volume final de 2 ml, os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: cloreto de ferro (50 µM), ferrozina (100 µM), metanol (60 %) e extractos em diferentes concentrações, dissolvidos em EtOH 70°. As determinações dos valores de absorvência das amostras e controlo foram efectuadas em 562 nm, contra os respectivos brancos (na ausência de ferrozina) (espectrofotómetro Jasco, modelo V-530, Japão), após 10 min de incubação à temperatura ambiente. O EDTA dissódico foi usado como controlo positivo.

O efeito quelante de ferro dos extractos foi expresso sob a forma de percentagem de inibição da formação do complexo ferro/ferrozina de acordo com a fórmula:

$$\text{Efeito quelante de ferro (\%)} = 100 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \quad \text{Fórmula 4.1}$$

sendo A_{amostra} o valor de absorvência do ensaio realizado na presença do extracto em estudo e A_{controlo} o valor de absorvência do ensaio realizado na ausência de extracto.

A concentração capaz de produzir 50 % do efeito (IC_{50}) foi calculada a partir do gráfico que representa a concentração *versus* o efeito, por regressão linear (MS Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, EUA). O ensaio foi efectuado em duplicado e repetido no mínimo quatro vezes.

4.1.2 Determinação do potencial redox (estudos electroquímicos)

A voltametria é uma técnica electroquímica de ampla utilização que encontra aplicação no estudo de processos de oxidação e redução, de adsorção em superfícies e de mecanismos de transferência de electrões, entre outros. Esta técnica permite estabelecer relações directas entre a concentração de uma espécie e uma propriedade eléctrica como a corrente, o potencial, a condutividade, a resistência ou a carga [355].

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial (E_p) e a corrente (I_p) é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. A representação gráfica da diferença de corrente medida em função do potencial aplicado origina um voltamograma, com a forma de uma curva gaussiana, cuja altura é proporcional à concentração da espécie em análise [355]. A capacidade redutora de uma amostra é analisada atendendo a três parâmetros do voltamograma, nomeadamente o potencial redox (E), o qual reflecte a capacidade redutora, a intensidade da corrente anódica (I) e a área sob a curva anódica (S). Estes últimos relacionam-se com a concentração das espécies redutoras presentes na amostra [356].

Os estudos foram conduzidos, à temperatura ambiente, num potenciostato (Eco-Chemie, modelo Autolab PGSTAT 12, Holanda), provido de uma célula electroquímica de vidro (Metrohm, Suíça) de um só compartimento, contendo três eléctrodos: um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo ($d = 2\text{ mm}$), um eléctrodo auxiliar de platina e um eléctrodo de referência Ag/AgCl (saturado em KCl). A velocidade de varrimento foi de 5 mV/s . Prepararam-se soluções-mãe dos extractos de *Q. robur* e *C. sativa* em metanol ($0,6\text{ \% m/V}$), que foram adicionadas ($0,1\text{ ml}$) directamente na célula electroquímica a 10 ml de solução tampão de acetato ($\text{pH } 5,5$, ácido acético $0,2\text{ M}$, acetato de sódio $0,2\text{ M}$).

Os estudos electroquímicos foram efectuados pelo Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

4.1.3 Avaliação do potencial irritante cutâneo

A irritação cutânea é um fenómeno complexo que pode ser percepcionado através da avaliação de diferentes parâmetros biométricos. A reacção irritante da pele pode ser classificada em três categorias: 1) sensação de picada, um parâmetro de natureza subjectiva; 2) inflamação acompanhada de eritema, edema e aumento da temperatura cutânea e 3) alterações da barreira epidérmica que resultam em secura e descamação [357]. A avaliação de apenas um parâmetro biométrico constitui, a maior parte das vezes, uma abordagem redutora do potencial irritante de uma substância. Neste trabalho, optou-se por avaliar simultaneamente o eritema e a perda transepidérmica de água (TEWL) e efectuar a avaliação clínica das lesões. Os voluntários foram também questionados em relação à ocorrência de reacções subjectivas associadas a uma acção irritante, tais como sensação de picada e ardor.

Neste estudo, participaram 20 voluntários com idades compreendidas entre 21 e 46 anos, 7 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, tendo dado o seu consentimento informado por escrito (Anexo III). Não foram incluídos no ensaio grávidas, mães a

amamentar, indivíduos com história clínica de alergia ou de irritação a produtos tópicos, indivíduos com dermatoses activas ou que estejam a seguir um tratamento farmacológico passível de interferir com o ensaio. Os voluntários foram instruídos para não aplicarem produtos tópicos nos antebraços 24 h antes do início dos ensaios e evitar exposição solar e uso de roupas oclusivas no decurso do ensaio. O potencial irritante dos extractos de castanheiro e carvalho foi avaliado com um teste de aplicação única sob oclusão. Este tipo de teste é amplamente utilizado para a caracterização do potencial irritante cutâneo de produtos tópicos [352]. Na face interna de um antebraço foram marcados quatro locais circulares, com área de 2,27 cm², distanciados 2 cm entre si. Em cada local efectuaram-se leituras de perda transepidermica de água (TEWL – *Transepidermal water loss*, Tewameter[®] TM 210, Courage + Khasaka, Alemanha) e eritema (Derma Spectrometer[®], Cortex Technologies, Dinamarca). Após as leituras, foi colocado um círculo de papel de filtro (Ø 11 mm, Epitest LTD Oy, Finlândia,) em cada local e adicionou-se, consoante o local, 50 µl das dispersões aquosas (5% m/V) dos extractos de carvalho ou castanheiro, solução aquosa de sulfato de laurilo e sódio (SLS, 2 % m/V, controlo positivo) ou água desionizada (controlo negativo). A oclusão efectuou-se com câmaras de alumínio Finn[®] (12 mm, Epitest LTD Oy, Finlândia), fixadas com adesivo Scanpor[®] (Alpharma AS, Noruega) (Figura 4). A aplicação das amostras foi aleatorizada por local e braço, utilizando uma tabela de números aleatórios. Após 24 h, removeram-se as câmaras e, 2 horas após, efectuaram-se as leituras de perda transepidermica e eritema em cada local, bem como a classificação clínica das lesões por uma médica dermatologista. Após 24 h repetiram-se todas as medições. As variações de eritema e de TEWL em relação aos valores basais foram comparadas com o teste de Friedman ($p \leq 0,05$). Foram também efectuadas comparações com o controlo negativo com o teste de Wilcoxon ($p \leq 0,025$), (programa SPSS Statistics 16, SPSS Inc, Chicago, EUA). A opção por testes não paramétricos prendeu-se com a constatação do não cumprimento dos pressupostos de normalidade das distribuições e homocedasticidade (Anexo III).

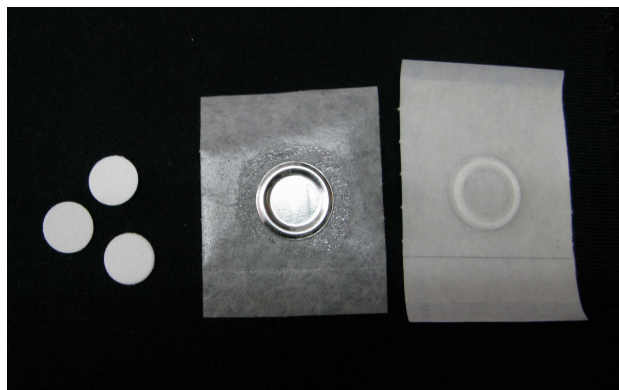


Figura 4. Câmaras de oclusão Finn® (com e sem película protectora) e discos de papel de filtro usados neste estudo.

A temperatura e a humidade relativa (HR) do laboratório onde se efectuaram as medições foi controlada, tendo oscilado entre 18,0 e 20,6 °C e 55 a 67 %, respectivamente, no decurso do ensaio.

As metodologias utilizadas neste ensaio foram estabelecidas de acordo com as normas relativas aos testes de exposição ao SLS [358], as normas para medição da cor da pele e eritema [359] e com as normas orientadoras da avaliação da perda transepidérmica de água [360], publicadas pelo *Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis*. As normas orientadoras dos testes de exposição ao SLS estabelecem recomendações relativas às condições ambientais, aos critérios de selecção dos voluntários, à pureza química e concentração de SLS, ao modo de aplicação e aos métodos de avaliação e de interpretação de resultados. As normas para a avaliação da TEWL e para a medição do eritema cutâneo estabelecem recomendações relativas às variáveis individuais, ambientais e instrumentais que influenciam estes parâmetros biométricos.

4.1.3.1 Avaliação da perda transepidérmica de água (TEWL)

Verifica-se na pele um gradiente difusional de água entre as camadas mais profundas da epiderme e o estrato córneo, decorrente do mais elevado conteúdo hídrico das camadas profundas. Este fluxo de água é dependente das condições ambientais e da integridade da barreira cutânea, pelo que a medição da perda de água transepidérmica representa um indicador da função de barreira desempenhada pelo estrato córneo.

A medição deste parâmetro foi efectuada com o aparelho Tewameter (Courage-Khasaka, Alemanha), o qual possui uma sonda que consiste num cilindro oco provido de dois pares de sensores de temperatura e humidade. O gradiente de vapor de água à superfície da pele é então medido pelo equipamento e expresso em g/m².h. O

princípio da medição baseia-se na lei de difusão de Fick (Fórmula 4.2), que considera a massa de água transportada por unidade de superfície cutânea, num determinado período de tempo, de acordo com a expressão:

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dp_v}{dx} \quad \text{Fórmula 4.2}$$

sendo A a superfície (em m^2), m a massa de água transportada (em g), t o tempo decorrido (em h), D a constante de difusão (0,0877 g/m.h.mm Hg), p_v a pressão de vapor da atmosfera (mm Hg) e x a distância da superfície da pele ao ponto de medição (m).

A medição da perda de água transepidérmica é efectuada com o objectivo de avaliar, para produtos de aplicação tópica, o efeito de reforço da barreira cutânea (situação em que decresce) ou o efeito negativo na integridade da barreira (neste caso ocorre aumento da TEWL). A irritação da pele pode manifestar-se pela diminuição da integridade da barreira, com consequente aumento da TEWL. A medição deste parâmetro pode permitir a detecção do potencial irritante de uma substância na ausência de sinais de inflamação. O *Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis* recomenda a medição deste parâmetro como o melhor método para avaliação dos efeitos irritantes do SLS, após aplicação sob oclusão [358].

4.1.3.2 Avaliação instrumental do eritema

A reacção inflamatória da pele caracteriza-se pela libertação de histamina pelos mastócitos, a qual induz vasodilatação e consequentemente o aparecimento de eritema, e alteração da permeabilidade vascular. A medição do eritema efectuou-se por reflectometria, com o equipamento Derma-spectrometer® (Cortex Technologies, Dinamarca). A hemoglobina possui *in vivo* um máximo de absorção específico, na zona verde (520 – 580 nm), e um mínimo de absorção, na zona vermelha, acima de 600 nm. O espectro de absorção da melanina acima de 400 nm mostra uma inclinação descendente constante à medida que aumenta o comprimento de onda sem apresentar qualquer pico de absorção. Assim, devido à vasodilatação característica do eritema, maior quantidade de luz verde é absorvida e menor quantidade reflectida. Em contraste, a quantidade de luz vermelha absorvida e reflectida apresenta pequena variação na presença do eritema da pele. O reflectómetro compara a quantidade de luz vermelha (I_{verm}) e luz verde (I_{verde}) reflectidas e calcula o índice de eritema (E) de acordo com a fórmula:

$$E = 100 \times \log \left(\frac{I_{\text{verm.}}}{I_{\text{verde}}} \right) \quad \text{Fórmula 4.3}$$

A área de pele seleccionada é irradiada sequencialmente com luz de comprimento de onda 568 e 655 nm, e a luz reflectida pela pele é detectada. O equipamento foi calibrado com um padrão branco e um padrão negro antes de cada série de medições.

4.1.3.3 Avaliação clínica da reacção irritante

A avaliação clínica, embora intrinsecamente subjectiva, tem demonstrado ser uma avaliação sensível e reprodutível [361]. A avaliação clínica dos locais de teste, de acordo com a escala indicada na Figura 4.1, similar à usada por Jibry *et al.* [362], foi efectuada por uma médica dermatologista, com experiência de execução e avaliação de testes epicutâneos.

0= Ausência de reacção



1= Eritema ligeiro, pontual



2= Eritema ligeiro, mas bem perceptível, ocupando toda a área de exposição



3= Eritema moderado



4= Eritema intenso com edema



5= Eritema muito intenso com lesões epidérmicas (vesículas, erosões, etc.)



Figura 4.1. Escala usada para classificação clínica das lesões cutâneas.

4.1.4 Estudo da reprodutibilidade do método extractivo

Com base em todos os resultados obtidos nos ensaios anteriores, foi seleccionado o extracto de folhas de castanheiro, uma vez que apresentou uma actividade quelante de ferro superior à do carvalho e atendendo também a um melhor conhecimento da composição fenólica.

A obtenção de um extracto com características reprodutíveis é essencial para assegurar uma qualidade consistente do produto final. As formulações que incorporam extractos de plantas apresentam frequentemente variabilidade na composição quantitativa, fruto do uso de métodos de extracção insuficientemente caracterizados e com baixa reprodutibilidade. A reprodutibilidade do processo extractivo foi avaliada após preparação de três lotes de extracto de folhas de *C. sativa* nas mesmas condições (método descrito no ponto 2.3.4.2) e avaliando para cada lote, o teor de compostos fenólicos totais, a capacidade captadora do radical DPPH e a composição fenólica quantitativa tal como descrito nos pontos 2.3.3.2 e 2.3.3.1, respectivamente.

4.1.5 Avaliação da estabilidade do extracto de *C. sativa*

A avaliação da estabilidade do extracto de *C. sativa* na forma de liofilizado efectuou-se um ano após a sua preparação e armazenamento em frasco de vidro âmbar, colocado em exsiccador. Após esse período avaliou-se o teor de compostos fenólicos totais, a capacidade captadora do radical DPPH e a composição fenólica quantitativa tal como descrito nos pontos 2.3.3.2, 2.3.3.1 e 3.1.2.3, respectivamente. Os resultados foram avaliados com o teste t de *student* ($p \leq 0,05$), após verificação da normalidade das distribuições e homocedasticidade (Anexo III) (programa SPSS Statistics 16, SPSS Inc, Chicago, EUA).

4.1.6 Avaliação da fotoestabilidade do extracto de *C. sativa*

A fotoestabilidade foi avaliada de acordo com a Norma orientadora Q1B: *Photostability testing of new drug substances and products*, publicada pela *International Conference on Harmonization* (ICH) [363]. O extracto (150 mg), colocado num poço de uma placa de poliestireno de 12 poços, foi exposto à radiação emitida por uma lâmpada xénon de intensidade 250 W numa câmara (Atlas, modelo Suntest XLS+, EUA), durante 22 h. Simultaneamente, foi colocada na câmara de ensaio outra placa de poliestireno revestida de papel de alumínio, com a mesma quantidade de extracto. Este controlo foi utilizado para excluir a potencial contribuição da elevação da temperatura que ocorre com o aquecimento da lâmpada. Um actinómetro químico foi utilizado para validar

as condições de irradiação. Uma solução de cloridrato de quinina a 2 % (m/V) colocada numa cuvete de quartzo provida de tampa, foi exposta às mesmas condições de que o extracto. Simultaneamente, expôs-se uma nova cuvete de quartzo revestida com papel de alumínio. A diferença de absorvência entre as duas cuvetes (exposta e não exposta) medida em 400 nm no final do ensaio teria que ser, no mínimo, 0,5 UA, de acordo com a norma orientadora, como garantia de que as condições de irradiação foram apropriadas.

Procedeu-se à avaliação da actividade captadora do radical DPPH do extracto (amostra e controlo) antes e após o período de exposição à radiação, de acordo com a metodologia descrita anteriormente no ponto 2.3.3.2. A comparação dos resultados de actividade antioxidante efectuou-se com o teste t de *student* ($p \leq 0,05$), após verificação da normalidade das distribuições e homocedasticidade (Anexo III) (programa SPSS Statistics 16, SPSS Inc, Chicago, EUA). A cor do extracto foi avaliada com um colorímetro (Minolta, modelo CR-400, Japão), executando medições em triplicado da cor do extracto. O colorímetro é um reflectómetro que emite uma luz branca que corresponde a todas as bandas do espectro da luz visível e permite a determinação da cor através da descrição espacial deste parâmetro, de acordo com o espaço de cor CIE 1976 $L^*a^*b^*$, proposto pela *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE). A coordenada L^* representa a luminosidade (*lightness*), a coordenada b^* a escala cromática entre o azul e o amarelo, e a coordenada a^* a escala cromática entre o verde e o vermelho (Figura 4.2). O ensaio foi efectuado com fonte de luz padrão D65 (que representa aproximadamente a luz do meio dia de um dia de sol na Europa Ocidental e Norte da Europa) e com ângulo de observador de 2° .

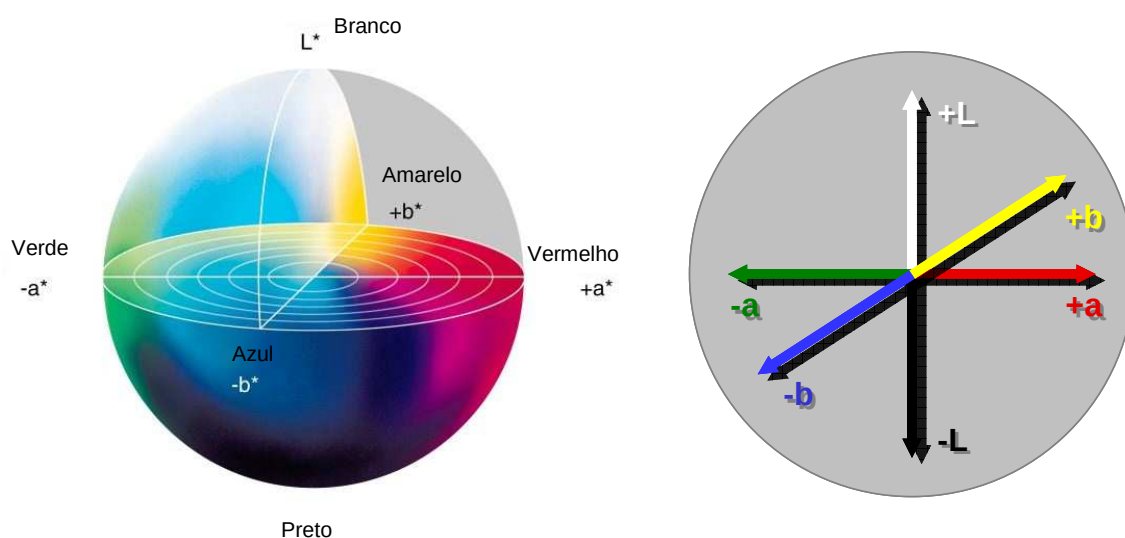


Figura 4.2. Descrição espacial da cor segundo o espaço de cor $L^*a^*b^*$.

4.1.7 Avaliação da estabilidade funcional do extracto de *C. sativa*

O efeito do pH na estabilidade do extracto de *C. sativa* foi avaliado para dois valores de pH, compatíveis com a aplicação cutânea. A estabilidade do extracto de *C. sativa* (0,025 % m/m) em solução tampão pH 7,1 (tris(hidroximetil)aminometano (tris), 50 mM), em solução tampão pH 5 (acetato de sódio, 50 mM) e em glicerina (85 % (m/m)) foi avaliada no decurso de 3 meses. Neste trabalho optou-se por avaliar a estabilidade com base na actividade antioxidante (estabilidade funcional). Esta abordagem foi seguida por diferentes autores [364, 365] com o objectivo de caracterizar a estabilidade de extractos de plantas e apresenta como vantagem permitir avaliar a actividade global do extracto entrando em linha de conta com eventuais efeitos sinérgicos. Para além disso, permite também ultrapassar as dificuldades associadas à selecção de compostos responsáveis pela actividade (marcadores) em misturas complexas. A actividade captadora do radical DPPH foi avaliada ao fim de 1, 7, 30 e 90 dias. As amostras foram armazenadas a 20 °C e no caso dos solventes para os quais o extracto revelou maior estabilidade foi estudada a estabilidade após armazenamento a 4 °C (Frigorífico Siemens, Alemanha) e a 40 °C (Estufa Heraeus, Alemanha). Simultaneamente, foi medido o pH (Potenciómetro Metrohm, modelo 691, Suíça, provido de eléctrodo de vidro combinado).

4.1.7.1 Avaliação da actividade captadora do radical DPPH

A técnica utilizada para avaliação da actividade captadora do radical DPPH baseou-se na usada para avaliação da actividade dos extractos em solução hidroalcoólica. No entanto, dado que os solventes neste estudo são aquosos ou hidroglicéricos foi necessário otimizar a metodologia de modo a evitar a insolubilização do DPPH. A mistura reaccional continha, num volume final de 200 µl, os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: DPPH (150 µM) e soluções dos extractos em diferentes concentrações. Todos os reagentes foram dissolvidos em EtOH 96°. A absorvência foi lida em 515 nm após 20 min de incubação à temperatura ambiente em leitor de placas (BIOTEK, modelo ELX 808, EUA). O ácido ascórbico foi usado como controlo positivo e permitiu comparação dos resultados obtidos com a técnica descrita anteriormente e a técnica aqui descrita.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Caracterização da capacidade antioxidante

Ambos os extractos demonstraram capacidade de quelatar o ferro, de um modo dependente da concentração (Figura 4.3).

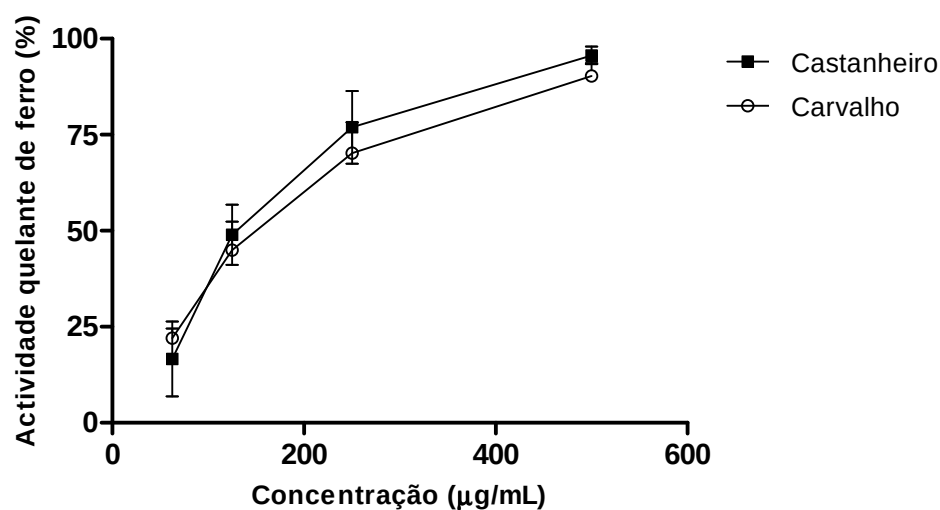


Figura 4.3. Actividade quelante de ferro dos extractos de folhas de *C. sativa* e de *Q. robur*. Os resultados correspondem à média de no mínimo quatro determinações em que as barras de erro representam o dp.

O extracto de *C. sativa* apresentou um efeito quelante de ferro superior ao do extracto de *Q. robur*, uma vez que apresentou um valor mais baixo de IC_{50} (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Efeito quelante de ferro (média $\pm$ dp, $n \geq 4$) e potencial redox dos extractos de *C. sativa* e de *Q. robur*

Extracto/Composto	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Potencial redox (V)
<i>C. sativa</i>	$132,9 \pm 23,8$	0,346
<i>Q. robur</i>	$153,8 \pm 26,3$	0,383
EDTA	$12,60 \pm 0,76$	—

Os potenciais redox dos extractos são semelhantes (Tabela 4.1), notando-se contudo uma maior intensidade da corrente para o extracto de *C. sativa*, uma vez que apresenta um pico mais expressivo no voltamograma (Figura 4.4). Este facto poderá

estar relacionado com uma concentração mais elevada de fitocompostos antioxidantes ou pode indiciar que o processo de transferência de electrões é mais favorável para o extracto de castanheiro.

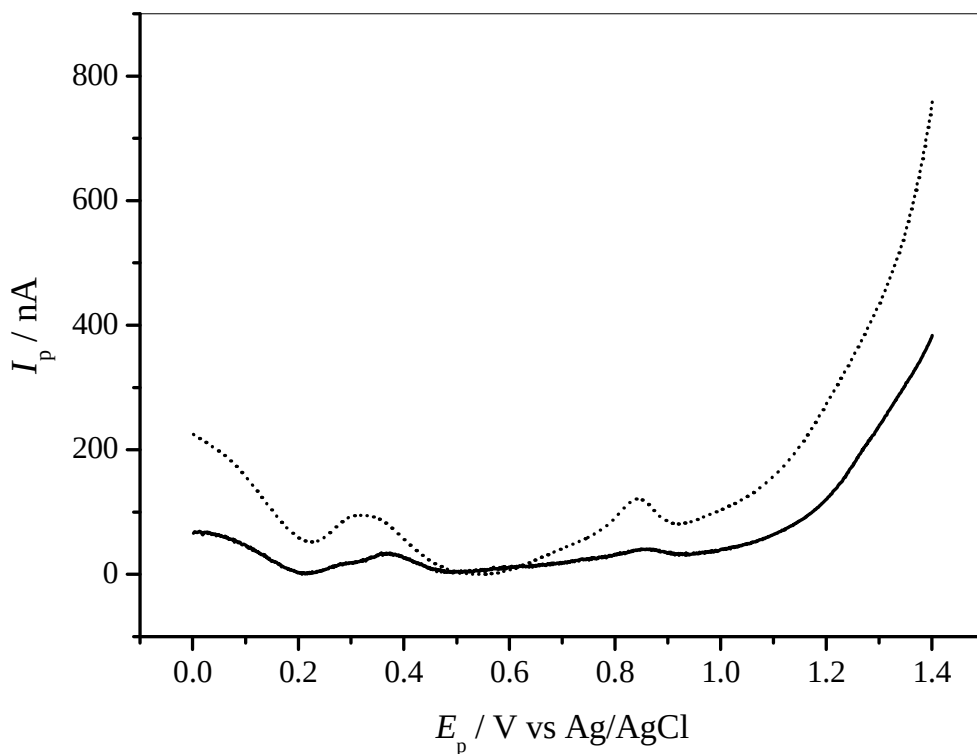


Figura 4.4. Voltamogramas de impulso diferencial de soluções (0,6 %, m/V) de extractos de carvalho (—) e de castanheiro (....) em solução tampão de acetato de pH 5,5. Velocidade de varrimento 5 mV/s.

A Figura 4.5 representa a variação da perda de água transepidérmica a partir dos valores basais, observada 2 h e 24 h após remoção das câmaras de oclusão. O controlo positivo (SLS) destacou-se por apresentar as diferenças mais relevantes. Em ambos os tempos de medição, a variação da TEWL após aplicação da solução de SLS é estatisticamente diferente da observada após aplicação de água desionizada, o que atesta a validade da metodologia usada. É interessante verificar que, no ensaio efectuado com o extracto de castanheiro, 24 h após a remoção da câmara de oclusão, a variação da TEWL a partir dos valores basais é estatisticamente diferente da observada para o controlo negativo (Tabela 4.2). Esta variação corresponde a um decréscimo da TEWL, o que poderá estar relacionado com um eventual efeito de reforço da barreira da pele. Uma vez que os ensaios foram efectuados em pele saudável, um eventual efeito regenerador ou cicatrizante não é plausível.

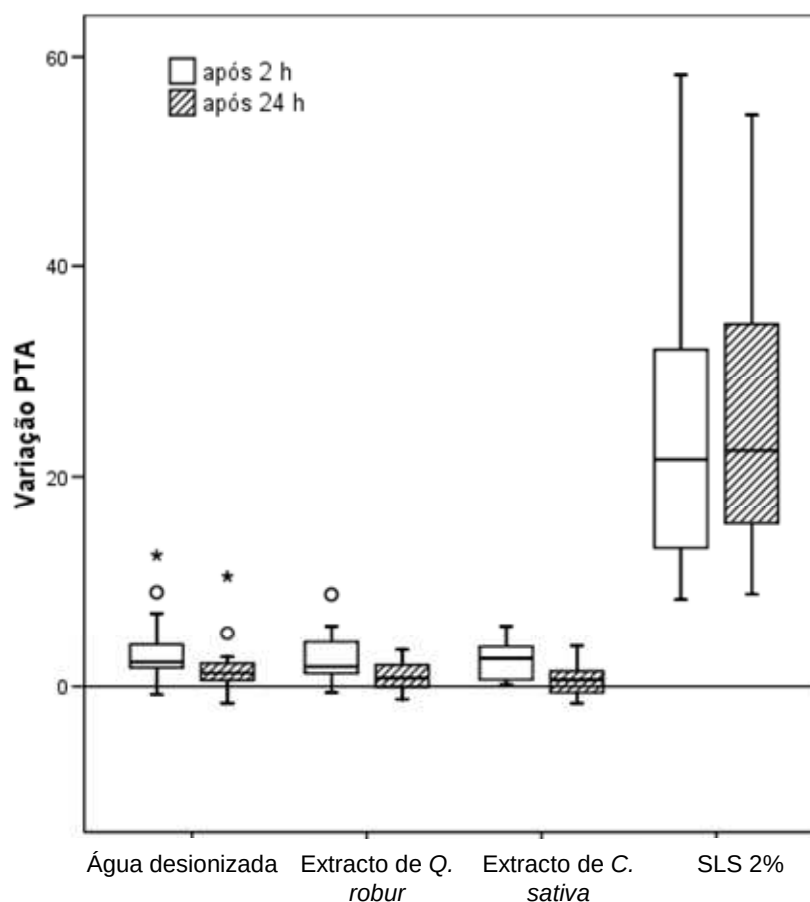


Figura 4.5. Caixa de bigodes representativa da variação da perda de água transepidérmica após teste de aplicação única sob oclusão.

No caso do controlo positivo, a variação do eritema, a partir dos valores basais, foi estatisticamente diferente da observada para o controlo negativo apenas 24 h após remoção da câmara de oclusão (Tabela 4.2), embora se observe claramente um aumento da mediana dos valores do índice de eritema, em comparação com o controlo negativo (Figura 4.6). Tal facto poderá estar relacionado com a variabilidade inter-individual na reacção ao SLS. No casos dos dois extractos, observaram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente à variação dos valores do índice de eritema em comparação com o controlo negativo nos dois tempos de ensaio para o extracto de carvalho e somente no tempo 2 h (após remoção das câmaras de oclusão) para o castanheiro. No entanto, estas diferenças estão associadas a um decréscimo do índice de eritema (Figura 4.6) e podem justificar-se por uma ligeira alteração da cor da pele relacionada com a intensa cor verde dos extractos. Esta coloração esverdeada da pele tem tendência a desaparecer, observando-se no último tempo do ensaio uma maior proximidade dos valores de índice de eritema com o controlo negativo.

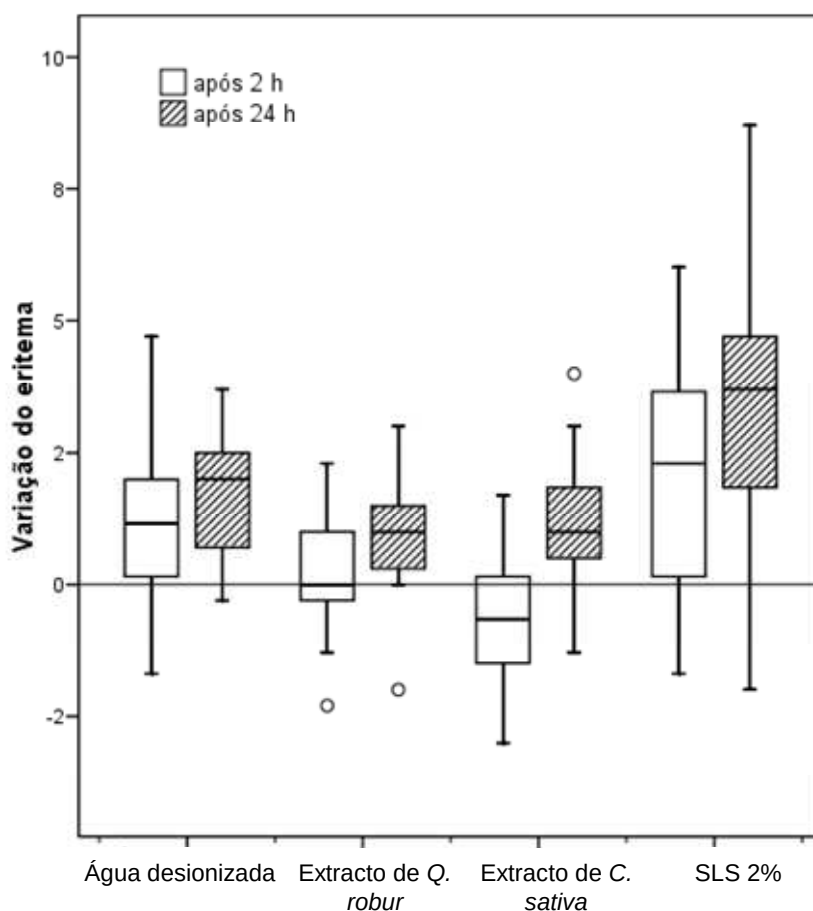


Figura 4.6. Caixa de bigodes representativa da variação do eritema após teste de aplicação única sob oclusão.

Tabela 4.2. Parâmetros do teste de Wilcoxon (comparação do índice de eritema e TEWL com o controlo negativo, 2 e 24 h após remoção das câmaras de oclusão) (valor de p , $p \leq 0,025$)

Extracto/Composto	TEWL		Eritema	
	2 h	24 h	2 h	24 h
<i>C. sativa</i>	0,433	0,021*	0,001*	0,031
<i>Q. robur</i>	0,112	0,031	0,002*	0,007*
SLS 2%	<0,001*	<0,001*	0,116	0,009*

*valores estatisticamente significativos

A imagem da Figura 4.7 ilustra as reacções cutâneas provocadas pelos produtos em estudo. A reacção eritematosa provocada pelo controlo positivo neste voluntário é claramente visível. Nos outros locais não se observa nenhuma lesão cutânea.

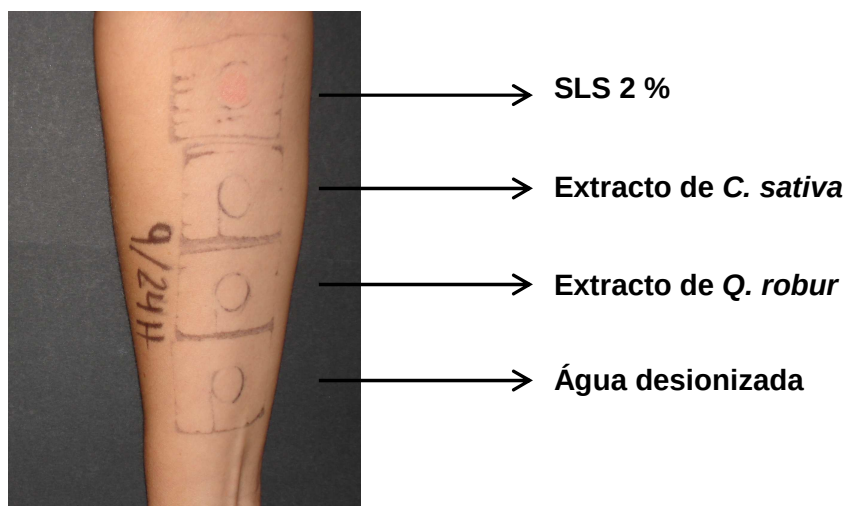


Figura 4.7. Imagem do antebraço de um voluntário 24 h após remoção das câmaras de oclusão.

O controlo positivo provocou em todos os voluntários uma reacção irritante com classificação clínica diferente de zero (correspondente a ausência de efeito irritante). A variabilidade inter-individual da reacção ao SLS está bem patente neste estudo, uma vez que foram atribuídas todas as classificações da escala (com excepção da zero). Existiu uma tendência para agravamento da reacção irritante com o tempo, uma vez que 24 h após remoção da câmara de oclusão é mais alta a frequência de reacções com classificações mais elevadas (Figura 4.8) comparativamente ao tempo 2 h. Um voluntário apresentou uma reacção com classificação 1 após aplicação cutânea dos dois extractos, 24 h após remoção da câmara de oclusão. No entanto, o mesmo voluntário, apresentou simultaneamente uma reacção irritante com o mesmo grau de intensidade em consequência da aplicação de água desionizada (controlo negativo), pelo que pode concluir-se que a reacção observada está relacionada com uma elevada sensibilidade do voluntário à oclusão e não com o potencial irritante dos extractos de folhas de *C. sativa* e *Q. robur*.

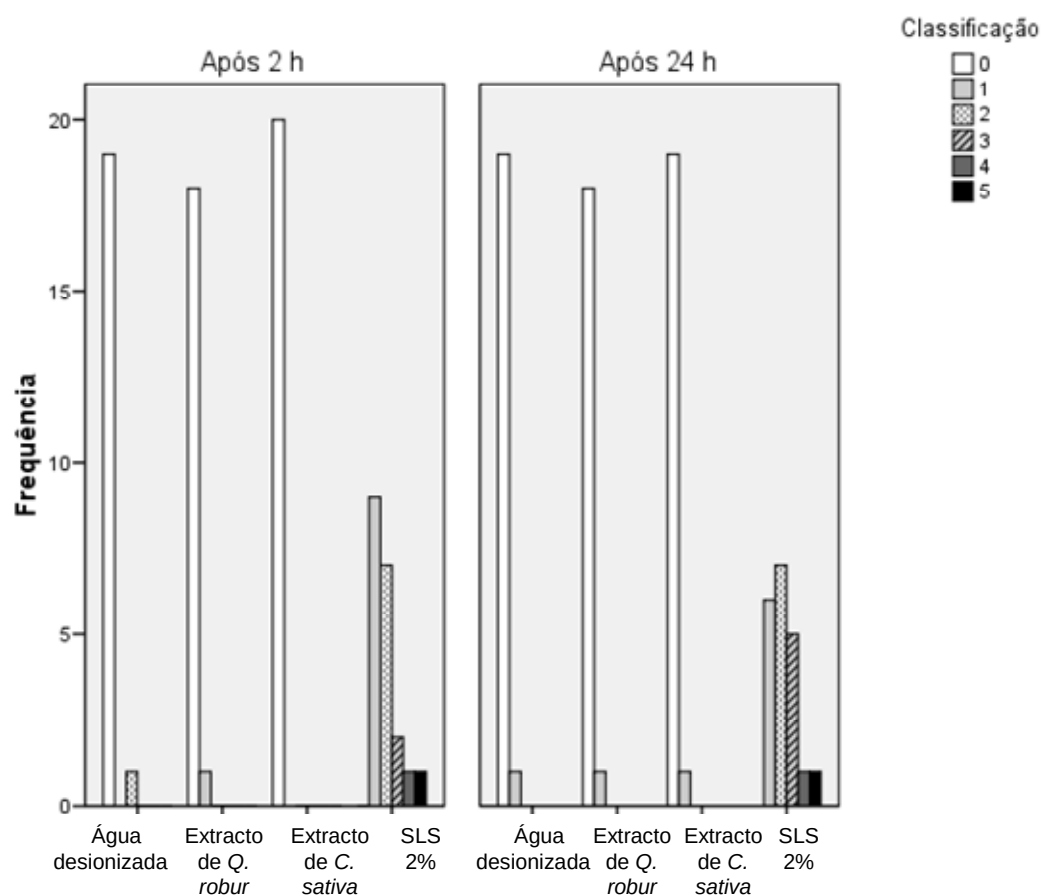


Figura 4.8. Frequência das classificações clínicas das reacções cutâneas após aplicação sob oclusão dos extractos de *C. sativa* e de *Q. robur*, controlo positivo (SLS 2 % m/V) e controlo negativo (água desionizada).

Nenhum voluntário relatou sintomas associados a uma reacção de irritação, tais como sensação de picada e/ou ardor após aplicação dos extractos sob oclusão, o que reforça a boa tolerância cutânea dos extractos de *C. sativa* e *Q. robur*.

4.2.2 Avaliação da reprodutibilidade do método extractivo e da estabilidade do extracto de *C. sativa*

A reprodutibilidade do processo extractivo foi avaliada pela comparação de três lotes do extracto de *C. sativa*. Os cromatogramas dos três lotes preparados evidenciam a semelhança entre os perfis cromatográficos (Figura 4.9).

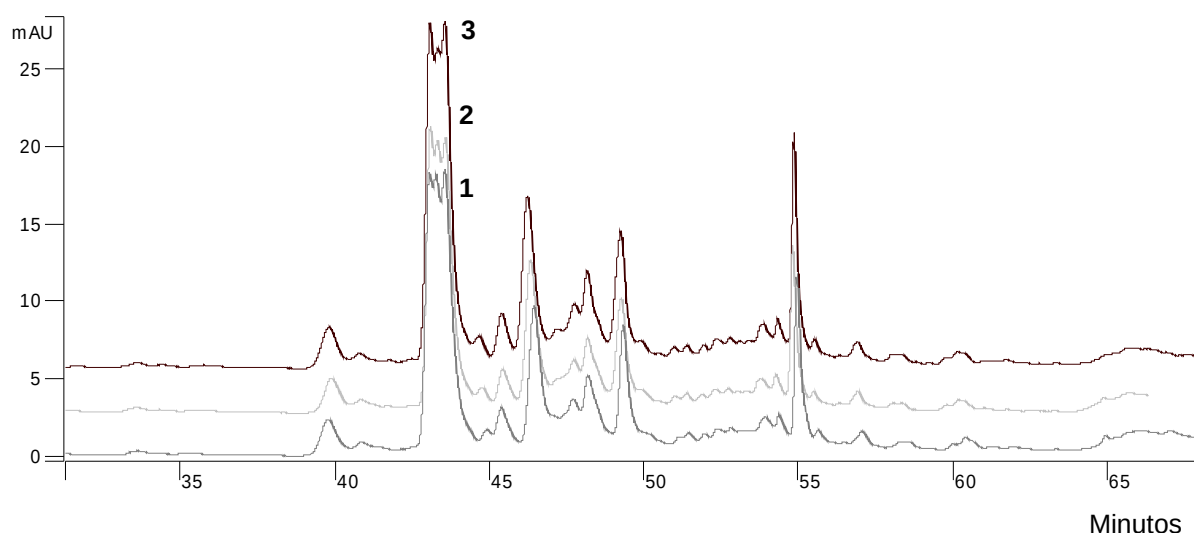


Figura 4.9. Cromatogramas dos três lotes de *C. sativa* ($\lambda = 350$ nm).

A Tabela 4.3 apresenta os teores de compostos fenólicos quantificados para cada lote. A variabilidade é genericamente baixa, sendo o coeficiente de variação (CV) inferior a 5 % em todos os casos.

Tabela 4.3. Comparação do teor dos compostos fenólicos entre os três lotes de extracto de *C. sativa*

Compostos fenólicos (mg/g)	Lote			Média $\pm$ dp n= 3
	1	2	3	
Ácido clorogénico	2,23 $\pm$ 0,06	2,21 $\pm$ 0,07	2,25 $\pm$ 0,06	2,23 $\pm$ 0,02 CV (%)= 1,1
Hiperósido+ Isoquercitrina + Rutina *	14,69 $\pm$ 0,64	13,58 $\pm$ 0,21	14,54 $\pm$ 0,07	14,27 $\pm$ 0,60 CV (%)= 4,2
Ácido elágico	3,00 $\pm$ 0,07	3,01 $\pm$ 0,09	3,20 $\pm$ 0,04	3,07 $\pm$ 0,11 CV (%)= 3,6

*quantificados em conjunto como rutina

A actividade captadora do radical DPPH, o teor de compostos fenólicos totais e a massa de extracto obtida após liofilização foram também avaliados para os três lotes de extracto de folhas de *C. sativa*. A variabilidade entre os três lotes foi baixa, tendo sido o CV mais elevado (5,2 %) verificado no ensaio de captação do radical DPPH (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Comparação da actividade captadora do DPPH, do teor de compostos fenólicos totais e da massa de extracto entre os três lotes do extracto de *C. sativa*

	Lote			Média ± dp
	1	2	3	
DPPH (IC₅₀ µg/ml, n= 3)	12,33 ± 0,06	11,67 ± 0,56	12,95 ± 1,09	12,32 ± 0,64 CV (%)= 5,2
Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g, n= 3)	263,1 ± 1,6	272,7 ± 3,7	273,9 ± 3,2	269,9 ± 5,95 CV (%)= 2,2
Massa de extracto liofilizado (mg)	1180	1168	1212	1186,7 ± 22,7 CV (%)= 1,9

A estabilidade do extracto liofilizado foi avaliada 12 meses após a sua preparação. O extracto (lote 3) foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e colocado em exsiccador. A Tabela 4.5 reúne os resultados obtidos no ensaio de avaliação da actividade captadora do radical DPPH e no teor de compostos fenólicos totais para o extracto de *C. sativa*. As variações relativas observadas situaram-se abaixo de 10 %, sendo o teor de compostos fenólicos totais o único parâmetro com diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4.5. Comparação da actividade captadora do DPPH e do teor de compostos fenólicos totais do extracto de *C. sativa* após preparação e após 12 meses (média ± dp, n= 3) e parâmetros do teste t de *student* (valor de *p*, *p* ≤ 0,05)

	Início	Após 12 meses	Variação (%)	<i>p</i>
DPPH IC₅₀ (µg/ml)	12,95 ± 1,09	11,87 ± 1,40	8,3	0,321
Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	273,9 ± 3,2	258,6 ± 2,3	5,6	0,002*

* valores estatisticamente significativos

Os teores dos compostos fenólicos identificados no extracto de *C. sativa* e quantificados 12 meses após preparação sofreram ligeiras alterações. A variação mais elevada traduziu-se numa diferença de 11 %, sendo estatisticamente significativas as variações encontradas para os teores de ácido elágico e da associação hiperósido+rutina+isoquercitrina (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Comparação do teor de compostos fenólicos do extracto de *C. sativa* após preparação e após 12 meses (mg/g, média $\pm$ dp, n= 3) e parâmetros do teste t de *student* (valor de *p*, $p \leq 0,05$)

Compostos fenólicos (mg/g)	Início	Após 12 meses	Variação (%)	<i>p</i>
Ácido clorogénico	2,25 $\pm$ 0,06	2,36 $\pm$ 1,83	4,5	0,082
Hiperósido+ Isoquercitrina + Rutina **	14,54 $\pm$ 0,07	13,44 $\pm$ 1,16	7,5	< 0,001*
Ácido elágico	3,20 $\pm$ 0,04	2,85 $\pm$ 0,04	11,0	< 0,001*

*valores estatisticamente significativos

**quantificados em conjunto como rutina

O estudo da fotoestabilidade do extracto foi conduzido de acordo com as normas orientadoras da ICH. A diferença das absorvências, medidas em 400 nm, das soluções de cloridrato de quinina a 2 %, exposta à radiação e não exposta, correspondeu a 0,655 UA, o que satisfaz o requisito da ICH (mínimo 0,5 UA) [363], e constitui um indicador de que as condições de tempo e irradiação utilizadas no teste foram adequadas. Dado que ocorreu alguma redução de massa (em função da perda de água motivada pelo aumento da temperatura) os valores de IC₅₀ calculados no ensaio de avaliação da actividade captadora do radical DPPH foram corrigidos atendendo à perda de massa. Observou-se um ligeiro decréscimo da actividade captadora do radical DPPH da amostra irradiada, efeito este não estatisticamente significativo (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Actividade captadora de DPPH (média $\pm$ dp, n= 3) do extracto de *C. sativa* e parâmetros do teste t de *student* (valor de *p*, $p \leq 0,05$) (comparação dos resultados obtidos antes e após a execução do ensaio de fotoestabilidade)

	IC ₅₀ (µg/ml)	<i>p</i>
Antes	15,92 $\pm$ 2,92	
Após	17,64 $\pm$ 3,78	0,417
Controlo	14,60 $\pm$ 3,27	0,476

Em relação aos parâmetros de cor, as alterações foram muito acentuadas, em particular para os parâmetros L* e b* (Tabela 4.8). Estas alterações são facilmente visíveis a olho nu, observando-se um escurecimento e redução da cor verde (Figura 4.10). Estas alterações também ocorreram no controlo (amostra protegida com papel de

alumínio), o que indicia que a responsabilidade por esta degradação é da elevação da temperatura e não da exposição à luz.

Tabela 4.8. Parâmetros de cor do extracto de *C. sativa* avaliados antes e após a execução do ensaio de fotoestabilidade (média $\pm$ dp, n= 3)

	L*	a*	b*
Antes	55,00 $\pm$ 0,35	-0,525 $\pm$ 0,05	19,83 $\pm$ 0,19
Após	41,01 $\pm$ 0,21	1,27 $\pm$ 0,03	9,20 $\pm$ 0,11
Controlo	42,95 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,03	10,81 $\pm$ 0,14

As variações dos diferentes parâmetros cromáticos foram semelhantes embora ligeiramente superiores para a amostra irradiada em comparação com o controlo (Figura 4.11).

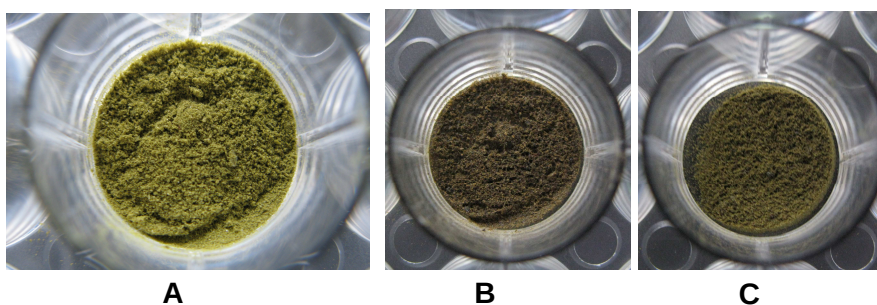


Figura 4.10. Modificação da cor do extracto após a execução do ensaio de fotoestabilidade:
A – Antes da irradiação; B – Após irradiação (amostra); C – Após irradiação (controlo).

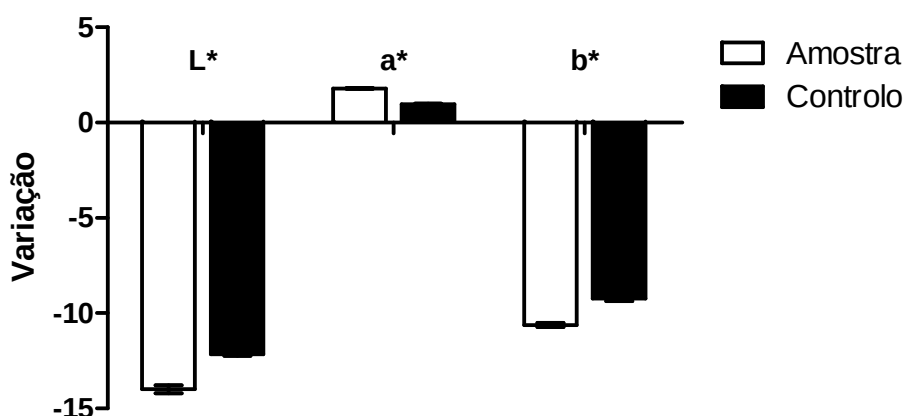


Figura 4.11. Variação dos parâmetros de cor do extracto de *C. sativa* após execução do ensaio de fotoestabilidade. Os resultados exprimem a média de no mínimo três determinações em que as barras de erro representam o dp.

A Figura 4.12 ilustra a evolução dos valores de IC_{50} do extracto de *C. sativa* relativos ao ensaio de captação do radical DPPH, ao longo do tempo. Quando o extracto foi dissolvido em solução tampão de pH 7,1 observou-se uma progressiva redução da actividade antioxidante, atingindo-se ao fim de 90 dias um valor de cerca de nove vezes superior ao valor inicial. O pH não apresentou alteração apreciável no decurso do período do estudo, pelo que as alterações observadas não podem ser atribuídas a modificações do pH. Quando o solvente foi uma solução tampão de pH 5 ou glicerina (85 % m/m) a estabilidade funcional foi muito superior. Perante estes resultados, o estudo prosseguiu pela avaliação do efeito da temperatura na estabilidade do extracto dissolvido nos dois solventes acima referidos.

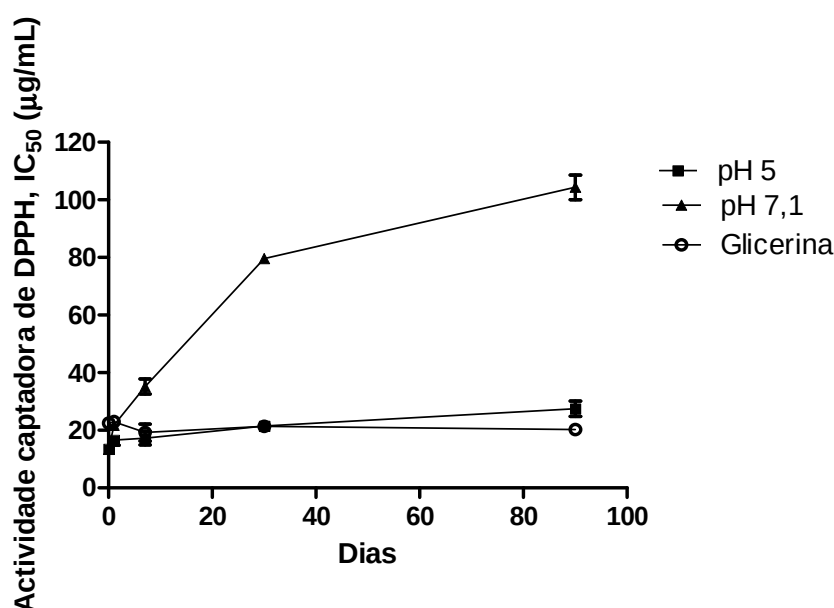


Figura 4.12. Influência do tempo na actividade captadora de DPPH do extracto de *C. sativa* (0,025 % m/V) em solução tampão pH 5, solução tampão pH 7,1 e glicerina (85 % m/m). Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp.

A temperatura exibiu um efeito apreciável na estabilidade funcional do extracto de *C. sativa*, quando dissolvido em solução tampão de pH 5 (Figura 4.13). À temperatura de 40 °C, verificou-se uma progressiva redução da actividade antioxidante. As alterações observadas não se correlacionam com modificações do pH, uma vez que o pH não apresentou alteração apreciável no decurso do período do estudo. A estabilidade do extracto parece ser favorecida a baixa temperatura (4 °C).

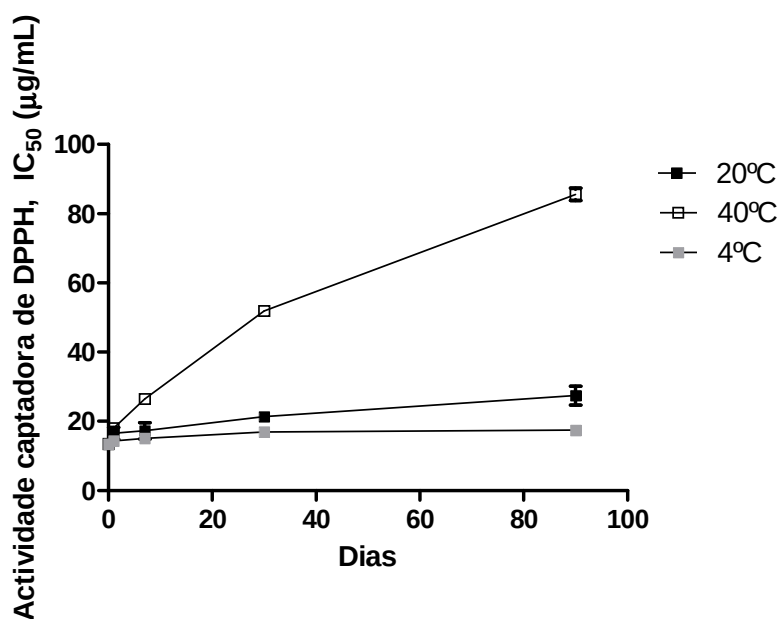


Figura 4.13. Influência do tempo e da temperatura na actividade captadora de DPPH do extracto de *C. sativa* em solução tampão pH 5. Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp.

A glicerina parece contribuir para uma maior estabilidade funcional do extracto de *C. sativa*, uma vez que para todas as temperaturas testadas observaram-se apenas ligeiras alterações da actividade antioxidante (Figura 4.14).

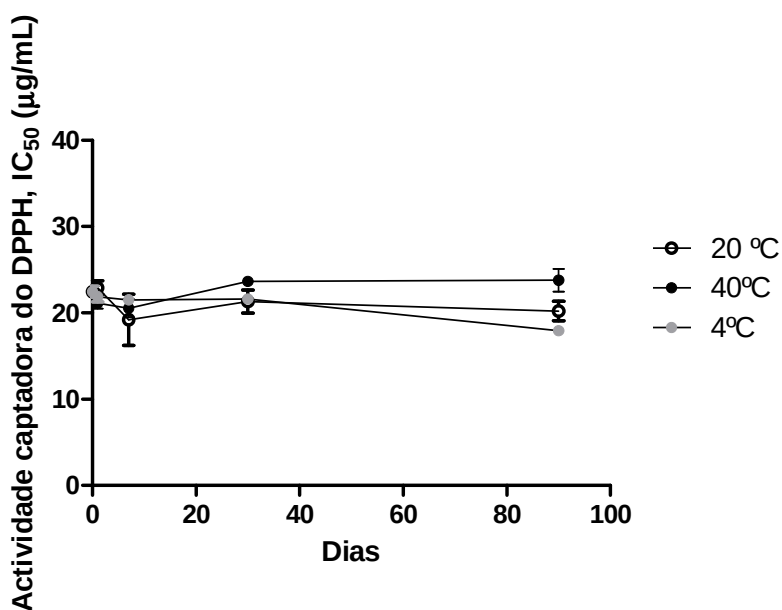


Figura 4.14. Influência do tempo e da temperatura na actividade captadora de DPPH do extracto de *C. sativa* em glicerina (85 % m/m). Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp.

4.2.3 Discussão

O ferro participa em reacções que culminam com a produção de espécies reactivas. Por reacção com o H_2O_2 , a designada reacção de Fenton, origina o potente $\text{HO}^\bullet$. O ferro também catalisa a reacção de Haber-Weiss, onde o $\text{O}_2^{\cdot-}$ reage com o H_2O_2 originando também o $\text{HO}^\bullet$. O ferro está ligado a proteínas transportadoras tais como a ferritina e a transferrina, pelo que em condições normais não participa na produção de ROS. Contudo, o ferro é libertado em situações de stress oxidativo, tais como a exposição à radiação solar. A nível cutâneo, Bissett *et al.* verificaram a deposição de ferro livre na derme de ratinhos após exposição à radiação UVB. Verificou-se também que os níveis de ferro da pele humana são mais elevados nas zonas expostas em comparação com as zonas protegidas da exposição solar [348]. Os danos cutâneos mediados pela radiação UVA também envolvem o ferro [366]. Pourzand *et al.*, constataram em fibroblastos que a radiação UVA promove a degradação da ferritina e o aumento do ferro livre [367]. O papel prejudicial do ferro livre sugere um possível interesse da aplicação cutânea de agentes quelantes de ferro. O uso destes agentes revelou actividade inibitória da geração de $\text{HO}^\bullet$ e supressão da peroxidação lipídica induzidas pela exposição à reacção UV [234]. Outros estudos documentaram o uso de quelantes na prevenção das alterações histológicas e alterações visíveis cutâneas provocadas pela exposição de curta e longa duração a doses sub-eritematogénicas de radiação UVB [348, 368]. O ácido kójico é um exemplo de um composto bifuncional que possui simultaneamente actividade quelante de ferro e actividade antioxidante e que demonstrou elevada eficácia na inibição da peroxidação lipídica mediada pela radiação UVB [347]. Neste estudo, os extractos de *Q. robur* e de *C. sativa* revelaram capacidade quelante de ferro. O efeito quelante de ferro dos flavonóides foi previamente investigado, sendo os grupos hidroxilo na posição 3 do anel C e/ou posição 5 do anel A e o grupo 4-oxo considerados os locais de ligação preferencial ao metal [369]. É assim provável que os constituintes fenólicos sejam parcialmente responsáveis pelo efeito quelante observado. A associação da capacidade captadora de espécies reactivas, demonstrada no capítulo anterior, e da capacidade quelante de metais, evidenciada neste capítulo, poderá contribuir para uma maior eficácia antioxidante.

Os produtos de origem vegetal podem ser responsáveis por dermatites de contacto alérgica e irritativa e reacções fototóxicas e fotoalérgicas [370]. Na literatura, estão descritos vários relatos de efeitos cutâneos irritantes ou alérgicos de extractos de plantas [371-373]. Membros das famílias Ranunculaceae, Euphorbiaceae e Asteraceae (Compositae) estão particularmente associados à dermatite de contacto irritativa. As fotodermatites são causadas por plantas que possuem furocumarinas, sendo

representativas as plantas das famílias Umbelifereae, Rutaceae e Moraceae. Dermatites de contacto alérgicas são induzidas principalmente por plantas da família Asteraceae, as quais possuem na sua composição lactonas sesquiterpénicas. As plantas das famílias Lauraceae, Magnoliaceae e Jubulaceae também possuem os compostos referidos e também podem produzir reacções alérgicas. Compostos fenólicos e terpenóides também podem ser responsáveis por reacções alérgicas [370]. Os produtos de origem natural não podem ser considerados inócuos, pelo que, para além da realização de estudos de eficácia, é essencial avaliar a tolerância cutânea de extractos de plantas, antes de considerar a sua incorporação em formulações tópicas. Curiosamente, vários extractos de plantas têm sido estudados no tratamento das dermatites de contacto. Os compostos fenólicos e os terpenóides são considerados os mais eficazes sendo de citar como exemplo o flavonóide wogonina, que demonstrou capacidade de reduzir a inflamação cutânea associada à dermatite de contacto [374]. A acção pode dever-se a um mecanismo não específico (ex.: acção antioxidante) ou a um mecanismo específico tal como a inibição de mediadores envolvidos na resposta inflamatória [370]. O envolvimento de espécies reactivas na dermatite de contacto foi referido na introdução desta tese, pelo que, teoricamente, pode postular-se a acção benéfica de extractos de plantas com actividade antioxidante na dermatite de contacto. Ambos os extractos testados apresentaram boa tolerância cutânea traduzida na ausência de perturbação da barreira da pele (cujo indicador foi a TEWL) e ausência de reacção eritematosa ou outra reacção caracterizada por lesões cutâneas. O teste utilizado (aplicação única sob oclusão) tem valor preditivo do potencial irritante. No entanto, só um teste de uso, após aplicação repetida, permitiria concluir, em definitivo, da ausência de acção irritante na zona cutânea de aplicação do produto.

A selecção de apenas um extracto foi motivada pela maior capacidade quelante de ferro e atendendo também a um melhor conhecimento da composição fenólica. Mediante estes critérios, foi seleccionado o extracto de *C. sativa* para a continuação do estudo.

O uso terapêutico ou cosmético de extractos de plantas exige que sejam satisfeitos os requisitos de qualidade, segurança e eficácia. Neste contexto, a reprodutibilidade do processo extractivo é essencial para assegurar uma qualidade consistente do extracto, tendo em linha de conta que os extractos de plantas e medicamentos neles baseados estão frequentemente associados a elevada variabilidade [375]. A comparação da composição fenólica, do teor de compostos fenólicos totais e da actividade captadora do radical DPPH em três lotes do extracto, revelou uma baixa variabilidade, sendo o coeficiente de variação, em qualquer dos casos, inferior a 6 %. Na avaliação da qualidade do extracto, afigura-se também de importância primordial a

caracterização da estabilidade. A fotoestabilidade do extracto foi também estudada atendendo à sua provável aplicação na prevenção do fotoenvelhecimento. Dada a complexidade intrínseca inerente aos extractos vegetais, torna-se difícil avaliar a estabilidade apenas com um ensaio ou parâmetro. Considere-se o exemplo da quantificação de apenas alguns compostos, a qual não fornece uma avaliação global e exacta de todos os compostos activos. O conhecimento exacto dos compostos responsáveis pela actividade é frequentemente difícil, atendendo a que muitas vezes estes compostos actuam sinergicamente. A estabilidade do extracto liofilizado foi avaliada considerando não só a composição fenólica e o teor de compostos fenólicos totais mas também a actividade captadora do radical DPPH, a qual configura a contribuição de todos os compostos, identificados ou não, e reflecte eventuais efeitos sinérgicos. Este ensaio, originalmente desenvolvido por Blois [288], constituiu uma metodologia económica, rápida e precisa para avaliar a actividade antioxidante e tem sido usado para avaliar a estabilidade funcional de antioxidantes isolados ou incorporados em formulações semi-sólidas [364, 376]. O extracto pode considerar-se estável dado que a variação observada para os parâmetros avaliados foi sempre inferior a 10 %, excepto no caso do teor de ácido elágico em que foi marginalmente superior (11 %).

O ensaio de fotoestabilidade executado de acordo com as normas orientadoras da ICH, está essencialmente vocacionado para selecção do material de embalagem, atendendo à necessidade de protecção da luz. Os resultados obtidos demonstraram ausência de efeito da exposição à radiação solar simulada, o que é um resultado benéfico atendendo inclusive à elevada quantidade global de energia emitida no decurso do ensaio com a duração de 22 h.

O pH demonstrou ter uma importante influência na estabilidade funcional do extracto de *C. sativa*. A influência do pH na estabilidade dos polifenóis está documentada na literatura, sendo dependente da estrutura do composto fenólico. O ácido clorogénico é particularmente sensível para valores de pH mais elevados enquanto a rutina apresenta maior resistência às variações do pH [377]. Contudo, Buchner *et al.* demonstraram que a rutina é bastante estável a pH 5, sofrendo uma depleção de cerca de 20 % (ao fim de 300 min) quando o pH é ajustado a 8 [378]. Estes resultados estão em concordância com os dados deste trabalho, uma vez que o extracto é marcadamente menos estável a pH 7,1 do que a pH 5. A rutina é o composto fenólico maioritário do extracto de *C. sativa*, pelo que os registos sobre a sua estabilidade em função do pH assumem particular relevância. A rutina é mais estável do que a respectiva aglicona – a quercetina – supondo-se que em consequência do bloqueio do hidroxilo da posição 3 do anel C por um açúcar [378]. A pH 5, o extracto apresentou-se estável apenas às temperaturas de 4 e 20 °C. O efeito de temperaturas elevadas na estabilidade de antioxidantes fenólicos está descrito na

literatura. O hiperósido e a rutina são menos estáveis ao calor do que o ácido clorogénico [379]. A actividade captadora do radical DPPH do extracto dissolvido em glicerina manteve-se praticamente inalterável ao longo do tempo, mesmo à temperatura de 40 °C. A glicerina é um poliálcool de amplo uso em formulações tópicas e em produtos cosméticos e de higiene corporal, principalmente pelas suas propriedades humectantes e emolientes [380]. O papel da glicerina na estabilidade de polifenóis foi previamente estudado. O composto galhato de epigalhocatequina incorporado numa formulação glicérica gelificada com Carbopol® manteve-se estável à temperatura de 50 °C. Os autores justificaram os resultados com base no carácter anidro da formulação, o que contribuiria para o efeito protector [381]. A solução glicérica usada neste trabalho não é anidra, uma vez que contém 15 % de água. Uma protecção da hidrólise não poderá ser assim a justificação para a acção protectora da glicerina. A formação de pontes de hidrogénio com as moléculas de água contribui para que a água esteja menos disponível para participar em reacções de degradação. Com base nestes resultados, perspectiva-se com um efeito positivo na estabilidade do extracto, a inclusão de glicerina, em quantidade apreciável, na formulação tópica. A glicerina promove também a hidratação cutânea [382]. As formulações que possuem glicerina proporcionam hidratação de longa duração, essencialmente porque a glicerina aprisiona a água e assim contribui, para a redução da perda de água transepidérmica [383]. A perspectiva de melhoria da hidratação cutânea, pela aplicação de uma formulação com glicerina, afigura-se de particular importância em face da conhecida diminuição do teor de água do estrato córneo com o envelhecimento, resultante da redução de substâncias com capacidade de fixação da água, e também da desidratação cutânea concomitante com uma exposição excessiva ao sol.

Ambos os extractos de folhas de *Q. robur* e *C. sativa* revelaram capacidade quelante de ferro e apresentaram, para uma concentração de 5 % m/V, uma boa tolerância cutânea, avaliada com um teste de aplicação única sob oclusão. A selecção recaiu no extracto de *C. sativa*, atendendo à maior actividade quelante de ferro e à identificação de um maior número de compostos fenólicos. O método extractivo apresentou uma boa reprodutibilidade. Quer a estabilidade do extracto na forma de liofilizado, quer a sua fotoestabilidade revelaram-se apropriadas. Os estudos de pré-formulação sugerem que deverá ser incorporada glicerina na formulação tópica e o pH deverá ser ajustado para um valor próximo de 5, de modo a assegurar a estabilidade do extracto.

**5. DESENVOLVIMENTO, OPTIMIZAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA
SEMI-SÓLIDO COM EXTRACTO DE *C. SATIVA***

5. DESENVOLVIMENTO, OPTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA SEMI-SÓLIDO COM EXTRACTO DE *C.SATIVA*

O objectivo final desta tese consistiu no desenvolvimento de um sistema semi-sólido adequado à incorporação do extracto de *C. sativa*. Tais sistemas semi-sólidos são particularmente indicados para aplicação na pele, uma vez que aderem ao local de aplicação e permitem assim a cedência das substâncias com actividade biológica por longos períodos de tempo. O espectro das preparações semi-sólidas para administração cutânea inclui, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa VIII, pomadas, geles, cremes, pastas, emplastos e cataplasmas [263]. Os emplastos e cataplasmas não são contudo formas semi-sólidas do ponto de vista reológico. As cataplasmas são aplicadas com o auxílio de um pano, enquanto os emplastos constituem preparações que apresentam uma base adesiva onde estão incorporadas as substâncias activas, pelo que no momento de aplicação exibem um carácter sólido. Diferentes preparações semi-sólidas têm sido desenvolvidas para veicular fitocompostos, maioritariamente geles e cremes [364, 365, 381, 384, 385]. Os tipos de constituintes de preparações semi-sólidas estão sumarizados na Tabela 5.1 [386].

Tabela 5.1. Tipos de constituintes de preparações semi-sólidas

Constituintes
Fase oleosa
Agente emulsivo
Conservante
Regulador de pH
Solvente
Viscosificante polimérico

A acção biológica do sistema em desenvolvimento relaciona-se com a prevenção dos efeitos prejudiciais induzidos pela exposição solar. A acção da radiação solar induz um aumento da TEWL e consequentemente uma redução do teor de água no estrato córneo. Um aumento abrupto da TEWL foi observado em humanos após exposição única a radiação UV. O tempo que medeia a recuperação dos valores basais de TEWL é dependente da dose de radiação [387]. A exposição crónica à radiação solar também parece influenciar o nível de hidratação da pele. Tagami demonstrou que a pele do dorso da mão com elevada exposição solar apresenta um conteúdo hídrico mais baixo, em comparação com a pele da mesma zona anatómica não exposta. Este efeito não foi contudo observado em outras áreas anatómicas [388]. No processo de envelhecimento

intrínseco também ocorre a redução do teor hídrico do estrato córneo [388]. A pele do idoso apresenta-se frequentemente seca e áspera, podendo apresentar fissuras e prurido [388]. Para esse efeito poderá contribuir a redução de aminoácidos hidrossolúveis no estrato córneo e a redução da secreção sebácea. Uma acção hidratante das camadas superficiais da pele é assim desejável e pode seguir diferentes estratégias, nomeadamente a aplicação cutânea de constituintes do factor humectante natural (NMF – *Natural moisturizing factor*), substâncias humectantes e substâncias que proporcionam efeito oclusivo. Entre as substâncias com acção de retenção de água encontram-se os polióis (glicerina, sorbitol e propilenoglicol). O uso de emolientes lipófilos (parafina líquida, miristato de isopropilo, vaselina, entre outros) proporciona uma acção lubrificante e oclusiva. O constituinte com acção oclusiva mais eficaz é a vaselina, embora o seu uso seja limitado pela baixa aceitabilidade cosmética. A associação de componentes hidrófilos (com acção refrescante e emoliente) e componentes lipófilos (com acção lubrificante e emoliente) na forma de emulsão afigura-se como capaz de proporcionar um aporte cutâneo mais completo de água e lípidos. As preparações para aplicação na pele devem possuir propriedades sensoriais agradáveis tais como boa espalhabilidade e baixa adesividade residual. Os sistemas emulsionados são amplamente utilizados para aplicação tópica sendo, na generalidade, cosmeticamente bem apreciados. Os hidrogeles constituem outra categoria de formulações tópicas com elevada apreciação. A comparação da aceitabilidade cosmética de geles, pomadas, cremes A/O e O/A revelou que os hidrogeles foram os preferidos. O facto de serem laváveis, proporcionarem efeito refrescante e não produzirem sensação residual untuosa poderá justificar a preferência [389].

A actividade antioxidante é muito influenciada pela composição do sistema físico. Em sistemas bifásicos, como os sistemas emulsionados, ocorre partilha do antioxidante entre as fases, de acordo com a sua lipofilia. Os tensioactivos influenciam também a actividade dos antioxidantes [390]. Fenómenos como a repulsão electrostática (na presença de tensioactivos aniónicos) podem reduzir ou mesmo inibir a actividade dos compostos antioxidantes [391]. Os tensioactivos são, genericamente, considerados como irritantes cutâneos [392-394]. Fenómenos como a desnaturação proteica, a remoção de lípidos, a inibição da proliferação celular e a libertação de mediadores químicos foram sugeridos como responsáveis pela acção irritante. Uma preparação sem agentes tensioactivos apresenta-se assim como vantajosa. A contribuição dos agentes emulsivos para a estabilidade do sistema emulsionado é decisiva, pelo que na sua ausência deverão existir outros mecanismos de estabilização, tais como o recurso a partículas sólidas finamente divididas, macromoléculas ou polímeros. O mecanismo de

estabilização de emulsões na presença de polímeros envolve a formação de uma camada adsorvida na interfase líquido/líquido. Quando duas gotículas se aproximam, devido por exemplo aos movimentos brownianos, ocorre repulsão resultante da presença das camadas adsorvidas, efeito este designado estabilização estérica. A presença de hidrocarbonetos de cadeia longa na fase oleosa, tais como o hexadecano e a parafina líquida, também parece favorecer a estabilidade de emulsões sem agente emulsivo [395]. O aumento da viscosidade da fase externa também potencia a estabilidade do sistema emulsionado, contribuindo para a prevenção da formação de creme, um dos fenómenos de destabilização de emulsões. Nesse contexto, o recurso a fases contínuas gelificadas também constitui uma importante estratégia de estabilização [396]. Entre os polímeros hidrófilos gelificantes encontram-se os polímeros conhecidos pela designação comercial Carbopol®, designados como carbómeros pela Farmacopeia Portuguesa. Os homopolímeros de Carbopol® são polímeros do ácido acrílico, com ligações cruzadas com éteres alílicos de sacarose ou de pentaeritritol (Figura 5.1).

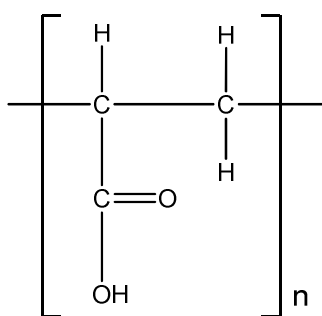


Figura 5.1. Estrutura química simplificada dos polímeros de ácido acrílico.

O grupo de resinas Carbopol® é muito vasto, mas embora difiram na sua performance as suas propriedades gerais são semelhantes. A gelificação é normalmente conseguida por neutralização com uma base (bases inorgânicas, aminas de baixo peso molecular ou alcanolaminas), em que ocorre a ionização do polímero e a formação de cargas negativas ao longo do esqueleto molecular. A repulsão de cargas do mesmo sinal origina o desenrolamento do polímero numa estrutura distendida. A reacção é rápida e proporciona um aumento da consistência instantâneo, sendo esta influenciada pelo pH e pela força iónica da dispersão aquosa. Estes polímeros podem também originar aumento da viscosidade em sistemas aquosos pela adição de 10 a 20 % de um dador de hidroxilo. Alguns dos dadores de hidroxilo mais comuns são os polióis (glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol), o manitol, os tensioactivos não iónicos com cinco ou mais grupos etoxilo e os copolímeros silano-glicol. Estes compostos formam pontes de hidrogénio com os polímeros, ocasionando a sua distensão, por meio de um processo não instantâneo, em

que a consistência máxima é atingida no espaço de cinco minutos a três horas. O aquecimento da dispersão acelera o processo, não sendo aconselhável utilizar temperaturas superiores a 60 °C. A Figura 5.2 ilustra os diferentes mecanismos que conduzem a um aumento de viscosidade de dispersões aquosas de Carbopol®.

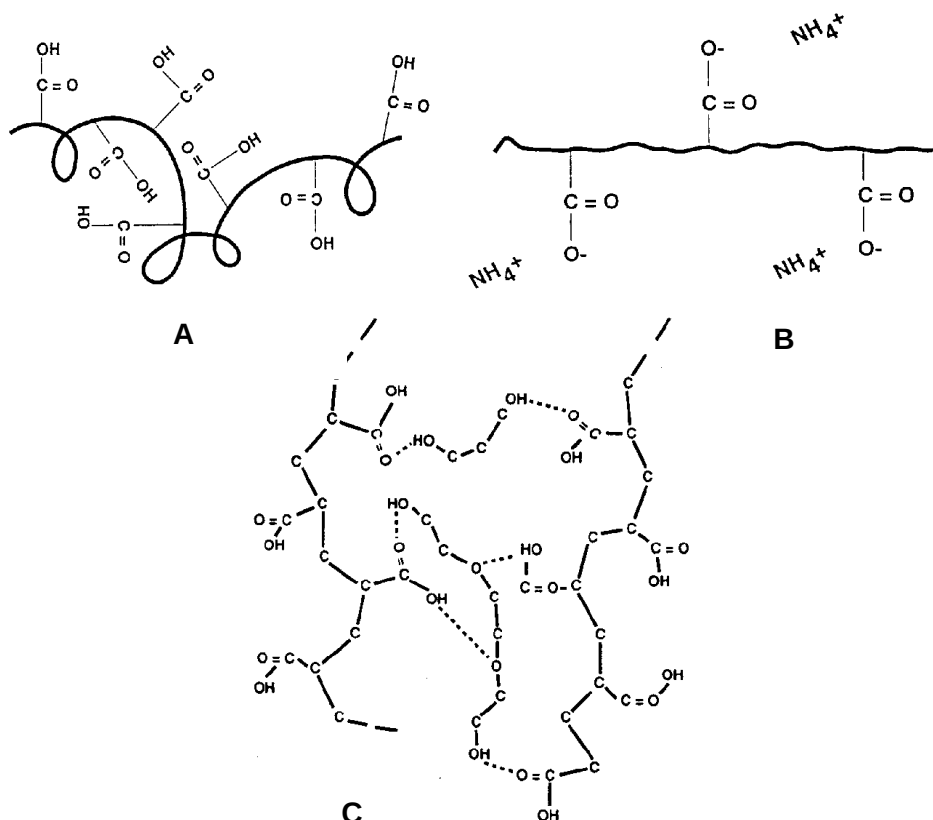


Figura 5.2. Representação de uma molécula de Carbopol® não neutralizada (A), neutralizada (B) e com pontes de hidrogénio com polióis (propilenoglicol e polietilenoglicol) (C).

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.1 Desenvolvimento galénico de um sistema semi-sólido

Considerando o objectivo de desenvolver um sistema emulsionado semi-sólido sem agentes emulsivos, a opção recaiu numa preparação emulsionada O/A onde foi incorporado um excipiente lipófilo líquido (parafina líquida) e em que a fase externa está gelificada (com o polímero Carbopol® 940). Esta escolha foi também motivada pela descrição na literatura de uma preparação obtida pela dispersão de parafina líquida num hidrogel de Carbopol® 940, designada como óleo-hidrogel, à qual se atribuem propriedades refrescantes e boa estabilidade física [397]. Esta classificação aproxima-a dos designados geles-cremes, distinguindo-se destes últimos pela ausência de agentes

emulsivos. Foi também incorporada a glicerina, de modo a assegurar uma viscosidade adequada (pela formação de pontes de hidrogénio com o polímero) e contribuir para a estabilidade do extracto (de acordo com os resultados obtidos nos estudos descritos no capítulo 4). Com vista a assegurar a estabilidade do ponto de vista microbiológico, adicionou-se um conservante de amplo uso em formulações de aplicação cutânea (metilparabeno).

5.1.2 Optimização da formulação

Existem várias técnicas de optimização de formulações, incluindo métodos directos, nos quais a optimização decorre simultaneamente com a experimentação (ex.: método Simplex) e métodos indirectos, em que a experimentação é realizada previamente à optimização (ex: planos multifactoriais). Estes métodos encontram aplicação em várias áreas, incluindo a área alimentar [398-400] e as áreas farmacêutica e cosmética [401, 402]. A exploração dos resultados obtidos realizou-se através da metodologia das superfícies de resposta (RSM – *Response surface methodology*), a qual permite obter um modelo matemático que correlaciona as variáveis dependentes com as variáveis independentes (factores) de um determinado processo. A análise é efectuada com recurso a um programa estatístico que elabora uma tabela com as estimativas dos efeitos das variáveis independentes (termos linear e quadrático) e da interacção entre elas, a partir dos resultados experimentais. Apenas se consideram significativas para a explicação do modelo, as variáveis para as quais $p \leq 0,05$. A representação da estimativa dos efeitos pode ser efectuada no designado diagrama de Pareto, o qual constitui um histograma que exhibe a informação por ordem decrescente de importância relativa. Uma vez seleccionadas as variáveis com efeito significativo, gera-se o modelo matemático que correlaciona a variável dependente (y) com as variáveis independentes (x_i), definido por uma equação do tipo seguinte (considerando três variáveis independentes):

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + \text{erro}$$

Fórmula 5.1

A equação pode ser representada graficamente sob a forma de superfícies de resposta. Entre outros, esta metodologia tem aplicação na determinação da combinação óptima dos factores que conduz à resposta desejada e que descreve a resposta perto do óptimo; na determinação da influência de alterações dos níveis dos factores numa resposta específica e na determinação dos níveis de um factor que satisfaçam simultaneamente um conjunto de especificações.

5.1.2.1 Estudo da influência das quantidades de glicerina e de parafina líquida

A composição da formulação desenvolvida e a descrição das funções de cada constituinte constam da Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Composição da formulação sujeita ao estudo de otimização

Constituintes	% m/m	Função
Carbopol® 940	2,0	Agente gelificante
Parafina líquida	De acordo com matriz experimental	Fase lipófila e emoliente
Glicerina	De acordo com matriz experimental	Humectante, emoliente e estabilizante
Metilparabeno	0,15	Conservante
Água	q.b.p. 100	Fase hidrófila
Extracto de <i>C. sativa</i>	0,5*	Antioxidante

*adicionado apenas para o estudo da actividade captadora do radical DPPH

O processo de optimização iniciou-se pelo estudo da influência das quantidades de glicerina e de parafina líquida na estabilidade física (avaliada pelo estudo da estabilidade após centrifugação), nas propriedades de textura e na estabilidade funcional, avaliada com o ensaio de captação do radical DPPH. Foi utilizado um desenho factorial (considerando dois factores), centrado (os valores do ponto central correspondem às médias dos valores correspondentes aos pontos factoriais) e rotativo (uma vez que a variância da previsão da resposta depende apenas da distância ao ponto central e não da direcção) para planeamento das experiências (Figura 5.3), elaborado no software STATISTICA (versão 5.1, Statsoft Inc., 1996, EUA).

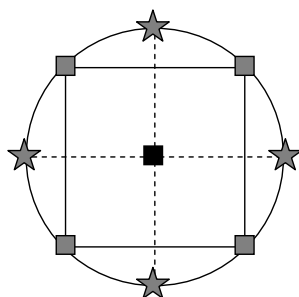


Figura 5.3. Representação esquemática do desenho experimental (*Central composite design*) usado neste estudo. ★ ponto axial, □ ponto factorial, ■ ponto central.

O desenho experimental utilizado neste estudo está representado na Tabela 5.3. Prepararam-se 12 formulações, sendo que quatro correspondem ao ponto central (de modo a assegurar a precisão). Os factores em estudo foram as quantidades de glicerina e de parafina líquida, tendo sido estabelecidos para cada factor cinco níveis (Tabela 5.4). Este tipo de desenho experimental (*central composite design*) é um dos mais utilizados no planeamento experimental quando a exploração dos resultados se efectua com a RSM [403].

Tabela 5.3. Desenho experimental usado no estudo de optimização

Experiência	Glicerina (% m/m)	Parafina líquida (% m/m)
1	22,93	12,93
2	22,93	27,07
3	37,07	12,93
4	37,07	27,07
5	20,00	20,00
6	40,00	20,00
7	30,00	10,00
8	30,00	30,00
9	30,00	20,00
10	30,00	20,00
11	30,00	20,00
12	30,00	20,00

Tabela 5.4. Níveis dos factores em estudo

Factor	-1,414	-1	0	1	1,414
Glicerina (% m/m)	20	22,93	30	37,07	40
Parafina líquida (% m/m)	10	12,93	20	27,07	30

Na preparação das formulações foi usada glicerina na concentração de 85 % (m/m), tendo sido calculada a respectiva quantidade de modo a corresponder à quantidade de glicerina descrita no desenho experimental.

A preparação consistiu em dissolver o metilparabeno na mistura hidroglicérica a 45 – 50 °C, com agitação magnética (Placa de agitação magnética Velp Scientifica, modelo Multistirrer 15, Itália, Banho de água circulante Grant, modelo W6, Reino Unido)

adicionando-se de seguida lentamente o Carbopol[®], com agitação mecânica (500 rpm, 10 min, agitador mecânico Heidolph, modelo RZR 2041, Alemanha). Após um período de repouso de 5 h a 20 °C (de modo a assegurar a maturação) as misturas foram homogeneizadas e a parafina líquida foi adicionada lentamente com agitação mecânica (700 rpm, 10 min). As preparações permaneceram em repouso por um período mínimo de 24 h a 20 °C (Estufa Astell Scientific, modelo JBH 800, Reino Unido) antes de se efectuar qualquer ensaio.

Foi avaliada a estabilidade física por centrifugação a 3000 rpm durante 30 min, 24 h após preparação (Centrífuga Eppendorf, modelo 5804, Alemanha). Este procedimento repetiu-se ao fim de 30 dias de armazenamento a 20 °C (Estufa Astell Scientific, modelo JBH 800, Reino Unido). As propriedades de textura foram também estudadas nos mesmos intervalos de tempo, executando um ensaio designado como ensaio de avaliação da espalhabilidade, usando o texturómetro modelo TA-XT2i-HR (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado com a sonda *TTC spreadability test fixture*. A Figura 5.4 ilustra o equipamento e sonda usados no ensaio efectuado. Neste ensaio, a amostra é colocada no cone fêmea, evitando a incorporação de ar. A superfície é nivelada, a sonda é colocada numa posição definida (25 mm) e o ensaio inicia-se com o movimento descendente do cone macho (23 mm de penetração e velocidade de 3 mm/s) que comprime a amostra forçando o seu espalhamento entre as superfícies dos dois cones. Simultaneamente, foram avaliadas as propriedades de textura de três produtos comerciais (Creme Myokine[®], Vichy; Creme peles normais e mistas Biophycée[®], Galénic e Creme de dia DNAge cell renewal[®], Nívea) destinados à aplicação na face, de modo a constituírem uma referência comparativa. Os ensaios foram efectuados em triplicado, a 20 °C.

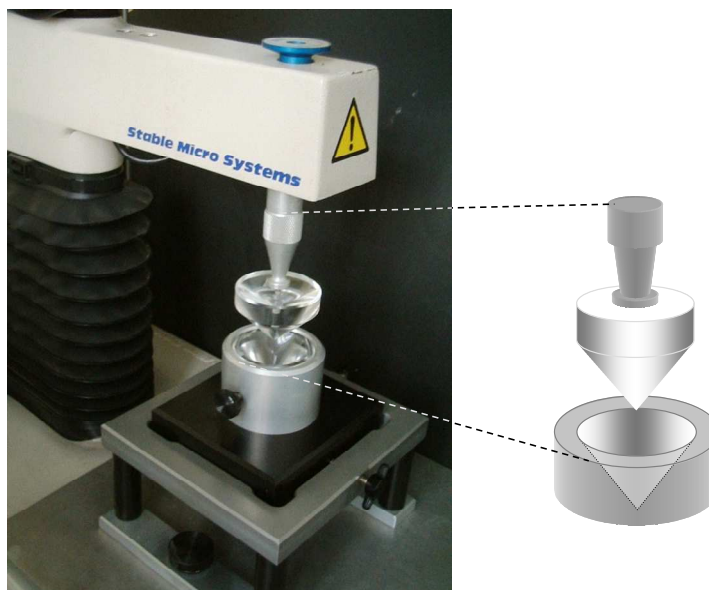


Figura 5.4. Texturómetro com sonda acoplada utilizado no ensaio de avaliação da espalhabilidade.

Um texturograma típico deste tipo de ensaio está representado na Figura 5.5. A partir do gráfico podem ser calculados os parâmetros “Força máxima”, “Força mínima” (N), “Área positiva” e “Área negativa” (N.mm). A “Força máxima” assume especial relevo, sendo correlacionada com a firmeza e foi o parâmetro usado nos estudos efectuados.

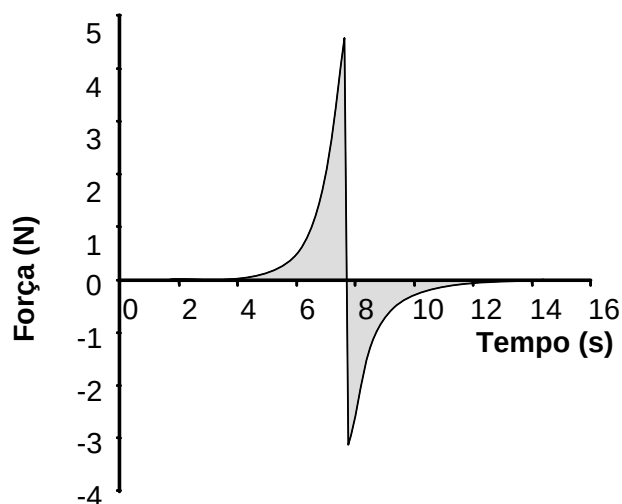


Figura 5.5. Texturograma tipo obtido com a execução do ensaio de avaliação da espalhabilidade.

A actividade captadora do radical DPPH avaliou-se 30 dias após a preparação das formulações que continham extracto de *C. sativa* (0,5 % m/m), tendo as amostras sido armazenadas a 20 °C (Estufa Astell Scientific, JBH 800, Reino Unido). O extracto foi

adicionado 24 h após preparação da base (formulação sem extracto). As amostras foram armazenadas durante um mês com o objectivo de efectuar uma avaliação mais discriminatória da influência das quantidades de glicerina e de parafina líquida.

O procedimento de avaliação da actividade captadora do radical DPPH foi modificado do protocolo utilizado na avaliação da actividade antioxidante do extracto liofilizado de *C. sativa*, de forma a assegurar a obtenção de uma dispersão com baixa turvação e, por consequência, com diminuta interferência no método espectrofotométrico. Vários solventes foram testados, optando-se por uma mistura em partes iguais de dimetilsulfóxido (DMSO) e isopropanol. A ausência de interferência do solvente com o DPPH foi também avaliada. A mistura reaccional continha, num volume final de 200 µl, os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: DPPH (150 µM) e dispersões das preparações em diferentes diluições em DMSO:isopropanol (1:1). O DPPH foi dissolvido em EtOH 96°. A absorvência foi lida a 515 nm após 60 min de incubação à temperatura ambiente (Leitor de placas, BIOTEK, modelo ELX 808, EUA).

A metodologia das superfícies de resposta foi utilizada para a caracterização do efeito dos factores estudados, tendo sido elaborados diagramas de Pareto e curvas de superfície de resposta, com recurso ao software STATISTICA (versão 5.1, Statsoft Inc., 1996, EUA).

5.1.2.2 Estudo da influência da incorporação de dióxido de titânio

O extracto de *C. sativa* apresenta uma intensa cor verde, a qual é transmitida à preparação semi-sólida. Para correcção da cor, testou-se a adição de um pigmento mineral branco, o dióxido de titânio (TiO₂), e estudou-se a sua influência nas propriedades de textura da base (formulação sem extracto). O procedimento utilizado no ensaio de avaliação das propriedades de textura está descrito no ponto 5.1.2.1. Prepararam-se três sistemas semi-sólidos com a composição descrita na Tabela 5.5, de acordo com a metodologia descrita previamente, mas em que o período de maturação do gel foi de 24 h. A incorporação do dióxido de titânio efectuou-se após dispersão prévia na parafina líquida. As preparações permaneceram em repouso por um período mínimo de 24 h a 20 °C antes de se efectuar o ensaio. Neste estudo, o conservante não foi incluído nas formulações, uma vez que a sua incorporação prolongava a técnica de preparação e porque é muito reduzida a probabilidade de crescimento microbiano, uma vez que os ensaios são efectuados num curto intervalo de tempo após a preparação.

Tabela 5.5. Composição das formulações com diferentes quantidades de TiO₂ (% m/m)

Constituinte	A	B	C
Carbopol® 940	2,00	2,00	2,00
Glicerina (85% m/m)	26,98	26,98	26,98
Parafina líquida	12,93	12,93	12,93
Dióxido de titânio	0,00	0,50	1,00
Água	q.b.p.100	q.b.p.100	q.b.p.100

5.1.2.3 Estudo da influência da concentração de Carbopol® e da influência do pH

O processo de optimização prosseguiu pelo ajuste do valor de pH para um valor próximo de 5. Prepararam-se formulações – base (sem extracto) com diferentes quantidades de trietanolamina, de acordo com a Tabela 5.6. O procedimento de preparação das formulações foi idêntico ao descrito no ponto anterior, com excepção do prolongamento do tempo de agitação durante a adição da parafina líquida (20 min) e da incorporação da trietanolamina na etapa final, após prévia dissolução em parte da água.

Para avaliação do pH, adicionou-se 3 ml de água neutra a 1 g de amostra. Após homogeneização, o pH foi medido com recurso a um potenciómetro (Metrohm, modelo 691, Suíça, provido de eléctrodo de vidro combinado).

Tabela 5.6. Composição das formulações com 2 % de Carbopol® e com diferentes quantidades de trietanolamina (% m/m)

Constituinte	B	B ₁	B ₂	B ₃
Carbopol® 940	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina (85 % m/m)	26,98	26,98	26,98	26,98
Parafina líquida	12,93	12,93	12,93	12,93
Dióxido de titânio	0,50	0,50	0,50	0,50
Trietanolamina	0,00	0,35	0,50	0,75
Água	q.b.p.100	q.b.p.100	q.b.p.100	q.b.p.100

Em face dos resultados, optou-se por testar outras concentrações de agente gelificante. Naturalmente, a redução da quantidade de agente gelificante (com propriedades ácidas) obrigou a um acerto do agente alcalinizante, de modo a que o pH se mantivesse próximo de 5 (optou-se por estipular o intervalo 4,5 – 5). Este pH é compatível com o pH da pele e de acordo com estudos anteriores favorece a estabilidade do extracto. Prepararam-se novas sistemas semi-sólidos, cuja composição está descrita

na Tabela 5.7. As diferentes amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 30 min, centrífuga Eppendorf, modelo 5804, Alemanha) de modo a avaliar a sua estabilidade física.

Tabela 5.7. Composição das formulações com diferentes quantidades de Carbopol® e de trietanolamina (% m/m)

Constituinte	D	D ₁	D ₂	E	E ₁	E ₂
Carbopol® 940	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50
Glicerina (85 % m/m)	26,98	26,98	26,98	26,98	26,98	26,98
Parafina líquida	12,93	12,93	12,93	12,93	12,93	12,93
Dióxido de titânio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Trietanolamina	0,32	0,28	0,26	0,125	0,10	0,07
Água	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100

5.1.3 Avaliação da estabilidade física e funcional

No desenvolvimento galénico de novos produtos é importante desenvolver ensaios preliminares de estabilidade de forma a identificar problemas nos estádios iniciais do processo de desenvolvimento e eliminar preparações que apresentem mais problemas. Existem vários procedimentos adequados à avaliação da estabilidade de um produto com o objectivo de fornecer informação no mais curto espaço de tempo. Os ensaios de estabilidade acelerada são desenvolvidos para aumentar a velocidade de degradação química ou alteração física de uma substância activa ou produto, utilizando condições de armazenamento exageradas, tais como elevadas temperaturas e humidades. Outros tipos de testes de estabilidade são os ciclos de temperatura e/ou humidade, os testes mecânicos e os testes de congelação/descongelação. Os ensaios em que as condições são alteradas periodicamente podem revelar mais rapidamente alterações do que os testes conduzidos a temperatura ou humidade constante. Os ensaios de congelação/descongelação permitem evidenciar a estabilidade de emulsões, a tendência para cristalização ou o aumento da opacidade. Testes mecânicos, como os testes vibratórios, permitem a avaliação da possibilidade de ocorrência de segregação em pós ou grânulos, de separação de fases de emulsões ou do colapso de espumas e constituem um teste de simulação das condições encontradas no processo de transporte dos produtos [404]. Nos ensaios de estabilidade, as amostras são avaliadas a intervalos de tempo definidos, registando-se alterações de propriedades críticas, tais como atributos

físicos (cor, aspecto, consistência), químicos (pH, doseamento de substâncias activas) e biológicos (contaminação microbiana). Neste trabalho, optou-se por avaliar, nos estudos preliminares, a estabilidade à centrifugação, o pH, a actividade antioxidante e a firmeza. No ensaio de estabilidade em tempo real e em condições aceleradas foram também avaliados a cor e o comportamento reológico.

5.1.3.1 Estudos preliminares de estabilidade

Foram preparados três lotes (150 g) segundo a formulação desenvolvida previamente e descrita na Tabela 5.8, de acordo com o seguinte procedimento: o metilparabeno foi dissolvido a quente (45 – 50 °C) na mistura hidroglicérica com agitação magnética (Placa de agitação magnética Velp Scientifica, modelo Multistirrer 15, Itália, Banho de água circulante Grant, modelo W6, Reino Unido). Após arrefecimento, dissolveu-se o extracto e adicionou-se lentamente o agente gelificante (500 rpm, 10 min, agitador mecânico Heidolph, modelo RZR 2041, Alemanha). Após 24 h de repouso (20 °C) ao abrigo da luz, as misturas foram homogeneizadas (500 rpm, 5 min) e adicionou-se lentamente a parafina líquida, onde se dispersou previamente o dióxido de titânio (700 rpm, 20 min). Simultaneamente, foi preparado com o mesmo procedimento, um lote sem extracto, designado como base.

As amostras foram submetidas a ciclos de temperatura (4 – 40 °C cada 24 h durante 7 dias, estufa Astell Scientific, modelo JBH 800, Reino Unido) e a um teste vibratório conduzido durante 24 h a 40 °C, com velocidade de agitação de 90 movimentos/min (banho de água provido de sistema de agitação pendular, Memmert, modelo WNB 7-45, Alemanha). As amostras foram também centrifugadas a 5000 rpm durante 30 min (centrífuga Eppendorf, modelo 5804, Alemanha). Findo o teste cíclico, as amostras permaneceram a 20° C durante no mínimo 24 h e avaliou-se a estabilidade física por meio do estudo da firmeza. Foram também monitorizadas alterações das características organolépticas, do pH e da actividade captadora de DPPH. A avaliação do pH foi executada conforme descrito no ponto 5.1.2.3. A avaliação da capacidade captadora do radical DPPH efectuou-se de acordo com o procedimento descrito no ponto 5.1.2.1, tendo sido modificado o solvente para diluição das formulações (EtOH 96°). As preparações foram previamente centrifugadas a 5000 rpm durante 30 min (Centrífuga Eppendorf, modelo 5804, Alemanha) para eliminar a interferência do dióxido de titânio (que se apresenta em dispersão) no método espectrofotométrico, sendo utilizados os sobrenadantes. O ácido ascórbico foi usado como controlo positivo e permitiu a comparação dos resultados obtidos com a técnica usada em estudos anteriores e a técnica aqui descrita. A comparação dos resultados efectuou-se com o teste não

paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$), uma vez que não se verificou o pressuposto da homogeneidade das variâncias, necessário para os testes paramétricos (Anexo III) (programa SPSS Statistics 16, SPSS Inc, Chicago, EUA).

Após o teste vibratório, as amostras foram inspeccionadas em relação às características organolépticas e ocorrência de separação de fases.

Tabela 5.8. Composição da formulação testada no ensaio preliminar de avaliação da estabilidade

Constituinte	% m/m
Carbopol® 940	1,0
Glicerina (85 % m/m)	26,98
Parafina líquida	12,93
Dióxido de titânio	0,5
Metilparabeno	0,15
Trietanolamina	0,26
Extracto de <i>C. sativa</i>	0,5
Água desionizada	q.b.p. 100

5.1.3.2 Avaliação da estabilidade em tempo real e em condições aceleradas

Prepararam-se três lotes (700 g) da preparação de acordo com o procedimento descrito no ponto anterior, sendo as amostras acondicionadas em frascos de vidro, protegidas da luz com papel de alumínio e armazenadas em estufas a 40 °C e 75 % HR (Estufa Vötsch, modelo VCL 0010, Alemanha) e a 20 °C (Estufa Astell Scientific, modelo JBH 800, Reino Unido), após um período de repouso de 48 h a 20 °C.

Inicialmente, foram avaliados o pH, a cor, a actividade captadora do radical DPPH, os parâmetros de textura e efectuou-se o registo fotográfico. A evolução destes parâmetros foi avaliada ao fim de 1, 3 e 6 meses, com excepção das propriedades de textura que foram avaliadas ao fim de 1 e 6 meses. Os procedimentos de avaliação foram referidos anteriormente nos pontos 5.1.2.1 e 5.1.2.3. Em cada tempo, as amostras (5 g em tubo plástico) foram centrifugadas a 3000 rpm, 30 min (Centrífuga Eppendorf, modelo 5804, Alemanha). O comportamento reológico (Viscosímetro rotativo Haake de cilindros concêntricos com sensor SV-DIN, modelo Viscotester VT550, Alemanha) foi avaliado no início e ao fim de 6 meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. O ensaio reológico foi efectuado a 20 °C, após 1 h de repouso no equipamento, no intervalo de velocidades de deformação em corte 0,1 - 250 s⁻¹ e sentido inverso, com passos de 60 s.

O modelo de Herschel-Bulkley (Fórmula 5.2) foi ajustado aos resultados experimentais, usando a ferramenta Solver (MS Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, EUA).

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$$

Fórmula 5.2

onde τ é a tensão de corte (Pa), τ_0 é a tensão de cedência (Pa), K é o coeficiente de consistência, $\dot{\gamma}$ é a velocidade de deformação em corte (s^{-1}) e n o índice de escoamento.

5.1.4 Avaliação da qualidade microbiológica

A qualidade microbiológica é um importante requisito de estabilidade de uma preparação semi-sólida. A avaliação da qualidade microbiológica dos três lotes efectuou-se ao fim de seis meses de armazenamento a 20 °C. Foi efectuada uma contagem do número total de germes aeróbios viáveis com base nos procedimentos descritos na Farmacopeia Portuguesa VIII. Para a contagem de microrganismos totais, foi utilizado o método de incorporação em meio gelosado com peptonas de caseína e de soja (TSA – *Tryptic soy agar*) com 3 % (m/V) de polissorbato 80, e a incubação efectuou-se a 30 – 35 °C durante 5 dias. Para a contagem de fungos e leveduras foi utilizada a técnica de sementeira à superfície em meio cloranfenicol agar com 3 % (m/V) de polissorbato 80 e a incubação efectuou-se a 25 °C durante 5 dias. Todas as diluições foram efectuadas com solução estéril de peptona tamponada. A adição de polissorbato (Tween®) 80 teve como objectivo a neutralização do conservante (metilparabeno) e foi baseada em estudos prévios. A avaliação da qualidade microbiológica foi efectuada pelo Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

5.1.5 Avaliação da acção preventiva da degradação oxidativa da preparação semi-sólida

A calorimetria de varrimento diferencial é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transformações nos materiais em função da temperatura. Estas medidas fornecem dados quantitativos de processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) e exotérmicos (libertação de energia calorífica), permitindo obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas tais como a mudança de estado físico e a estabilidade térmica e oxidativa.

As determinações foram efectuadas num calorímetro diferencial de varrimento (modelo DSC 204, com controlador Netzsch, modelo TASC 414/3A, Alemanha) e

controladas com o software Netzsch (modelo DSC 204 Measurement versão 3.4, Alemanha). A introdução de gases na câmara do calorímetro foi controlada por um conjunto de medidores de caudal (Netzsch, ref. 6.240.1-40, Alemanha). Nas análises foram usados cadinhos de alumínio Netzsch com tampas perfuradas. A calibração do calorímetro (temperatura e sensibilidade) foi efectuada com um conjunto de padrões fornecidos pela Netzsch (In, Bi, Sn, Zn e KNO₃).

Para cada ensaio utilizou-se uma amostra que consistia em cerca de 3 mg, colocada em cadinho de alumínio com tampa perfurada, de modo a permitir o contacto entre o gás da câmara calorimétrica e a amostra. No teste de termoxidação (determinação da temperatura de indução da oxidação) o *stand-by* inicial foi efectuado à temperatura ambiente (25 °C) em atmosfera de oxigénio. As amostras foram aquecidas desde a temperatura ambiente até à temperatura de 220 °C, com uma velocidade de 5 °C/min, em atmosfera de oxigénio (caudal de 50 ml/min). As amostras foram também analisadas em atmosfera de azoto (teste de termoestabilidade), sendo o *stand-by* inicial efectuado à temperatura ambiente (25 °C) em atmosfera de azoto, para eliminar o oxigénio da câmara calorimétrica. As amostras foram aquecidas desde a temperatura ambiente até à temperatura de 400 °C, com uma velocidade de 5 °C/min, em atmosfera de azoto (caudal de 20 ml/min). Os estudos de DSC foram efectuados pelo Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

5.1.6 Estudo do efeito hidratante cutâneo

O termo hidratação cutânea refere-se, genericamente, à manutenção de um conteúdo hídrico adequado ao nível da epiderme em geral e do estrato córneo em particular, de forma a manter as condições adequadas ao normal desempenho das funções de barreira desempenhadas por esta camada. Estudos conduzidos por Blank determinaram que as propriedades de suavidade e maleabilidade do estrato córneo se mantêm, desde que o seu conteúdo em água se mantenha acima dos 10 % [405]. A hidratação cutânea é, no entanto, uma variável de difícil abordagem, dependente de factores como o sexo, a idade, o fototipo, a área de pele considerada e as condições ambientais. Diferentes métodos foram propostos para a determinação desta variável, baseados em inúmeros princípios – propriedades eléctricas, mecânicas, térmicas e espectrométricas. Os métodos electrométricos tornaram-se dos mais utilizados em virtude da sua fiabilidade e facilidade de operação. O seu princípio de funcionamento baseia-se na determinação das alterações de natureza eléctrica – impedância, resistência e capacitância – detectáveis à superfície da epiderme por utilização de correntes eléctricas de diferentes frequências. A capacitância apresenta diversas

vantagens em relação às medições de impedância ou condutância da pele. A corneometria (designação adoptada para a metodologia mais utilizada com esta finalidade) constitui, na actualidade, o método de referência mais utilizado, quer na investigação fundamental [406], quer na aplicação ao estudo da eficácia de produtos de aplicação cutânea [407]. A medição é efectuada através da cabeça da sonda, colocada paralelamente à superfície cutânea, onde se encontram dois circuitos paralelos, sendo aplicado um campo eléctrico que penetra na pele. A mola interior assegura o estabelecimento do contacto a pressão constante, evitando assim fenómenos adicionais de oclusão, enquanto uma membrana de polietileno evita o contacto directo entre os elementos condutores da sonda e a pele. A medição da capacitância registada pelo corneómetro em contacto com o estrato córneo é função do conteúdo em água deste último. Os valores de hidratação são expressos em unidades arbitrárias (UA). Este método permite estimar o teor de água na epiderme até uma profundidade compreendida entre 60 a 100 μm . A medição da capacitância baseia-se na grande diferença entre a constante dieléctrica da água (igual a 81) e a de outras substâncias presentes na pele humana (cujo valor de constante dieléctrica, é, na maioria dos casos, inferior a 7). A acção hidratante após aplicação única foi avaliada no antebraço de 22 voluntários do sexo masculino (10) e feminino (12), com idades compreendidas entre 23 e 48 anos. O efeito promotor da hidratação cutânea foi avaliado por corneometria (Corneometer® CM 825 acoplado a unidade MPA, Courage Khasaka, Alemanha). Marcaram-se no antebraço quatro locais com área de 7,07 cm^2 , que distavam entre si 2 cm. Em cada local foi aplicada uma quantidade de produto correspondente a 2 mg/cm^2 , efectuando-se 50 rotações com um dedo. As medições efectuaram-se em cada local, em triplicado. Este ensaio foi executado em concordância com as normas orientadoras da EEMCO (*European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and other Topical Products*), que estabelecem recomendações relativas às variáveis ambientais, individuais e instrumentais que afectam esta medição [408]. Avaliou-se simultaneamente a perda transepidérmica de água (TEWL) de acordo com um procedimento descrito no ponto 4.1.3.1. O ensaio decorreu durante 4 horas. Testou-se a preparação com extracto, a preparação sem extracto (base), a glicerina (85 % m/m, controlo positivo) e uma zona não tratada (controlo negativo). Os ensaios foram executados em condições ambientais controladas e evitando correntes de ar. A distribuição dos produtos por local e braço foi aleatorizada, de acordo com uma tabela de números aleatórios. As diferenças dos valores de hidratação cutânea e de TEWL face aos valores basais, foram avaliadas pelo teste de análise de variância univariada (One-Way Anova) e, posteriormente, efectuaram-se comparações com o controlo negativo com o teste de Dunnett. Antes de efectuar o teste de Anova foram verificados os seus pressupostos, nomeadamente a normalidade

da distribuição, através do teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias, através do teste de Levene (Anexo III). A análise estatística foi efectuada com o programa SPSS Statistics 16.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA), considerando-se $p \leq 0,05$.

5.1.7 Caracterização estrutural

Registaram-se imagens de microscopia óptica num microscópio (Nikon, modelo Eclipse E400, Japão) provido de câmara fotográfica (Nikon, modelo Coolpix 950, Japão).

A caracterização da microestrutura efectuou-se por crio-microscopia electrónica de varrimento (CryoSEM). O procedimento consistiu na observação e análise da superfície de fractura de uma amostra fixada à temperatura do azoto líquido. A amostra foi mergulhada em azoto líquido à temperatura de $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ de forma a assegurar uma rápida congelação. A amostra congelada foi fracturada a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo e sublimada a -95 ° durante 1 min. A amostra foi revestida com uma liga de ouro/paládio e examinada no microscópio electrónico de varrimento de alta resolução (Japan Electron Optics Co. modelo JEOL JSM 6301F, Japão) com microanálise por raios X (Oxford, modelo INCA Energy 350, Reino Unido) e sistema para observação de amostras a baixa temperatura (Gatan, modelo Alto 2500, EUA). A análise de CryoSEM foi efectuada pelo Centro de Materiais da Universidade do Porto.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Optimização da formulação

Não ocorreu separação de fases ou sinérese (após centrifugação) para nenhum dos sistemas preparados de acordo com a matriz experimental e quer no início quer 30 dias após preparação. Estes resultados permitem concluir que a estabilidade física do sistema obtido não é influenciada pelas concentrações de parafina líquida e de glicerina.

Quer a quantidade de parafina líquida quer a quantidade de glicerina demonstraram influenciar as propriedades de textura do sistema em estudo. O diagrama de Pareto (Figura 5.6) evidencia claramente que a maior influência foi protagonizada pela parafina líquida, verificando-se também um efeito da interacção entre os dois constituintes. Estes resultados observaram-se após a preparação das amostras e de corridos 30 dias de armazenamento a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O intervalo de valores de firmeza avaliado para os produtos comerciais usados como referência foi de 2,65 a 8,68 N e engloba praticamente todos os resultados das preparações incluídas no estudo factorial.

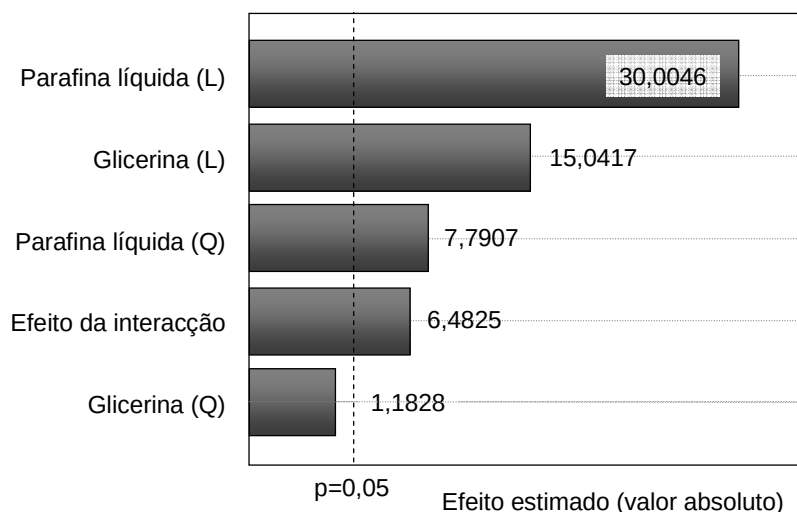


Figura 5.6. Diagrama de Pareto representativo da estimativa dos efeitos dos factores em estudo na firmeza. L – termo linear; Q – termo quadrático.

Situação inversa ocorreu com a actividade captadora do radical DPPH, em que nenhum dos factores em estudo demonstrou influência estatisticamente significativa (Figura 5.7). O papel da glicerina na estabilidade funcional do extracto foi previamente definido nos estudos descritos no capítulo 4. A actividade antioxidante não foi assim afectada pela quantidade de glicerina (entre 20 e 40 % m/m) incorporada. De um modo análogo, a quantidade de parafina líquida não influenciou a actividade antioxidante do extracto incorporado. Os resultados obtidos são interessantes do ponto de vista industrial, uma vez que alterações da composição quantitativa da formulação, no que respeita aos constituintes estudados, não se repercutiram em alterações da actividade antioxidante. Perante os resultados do estudo de optimização, seleccionaram-se quantidades dos dois constituintes correspondentes ao nível -1. Esta selecção foi motivada pelo factor económico, uma vez que os factores estudados não influenciaram a actividade do extracto de *C. sativa* incorporado na preparação semi-sólida.

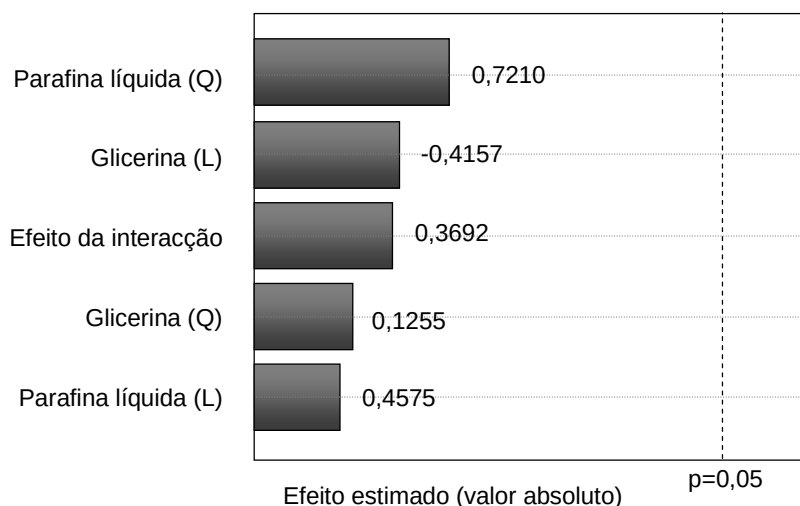


Figura 5.7. Diagrama de Pareto representativo da estimativa dos efeitos dos factores em estudo na actividade captadora do radical DPPH. L – termo linear; Q – termo quadrático.

A superfície de resposta elaborada com base nos resultados obtidos (Figura 5.8) exhibe claramente a forte influência da quantidade de parafina líquida na firmeza da preparação semi-sólida e uma influência mais discreta da quantidade de glicerina.

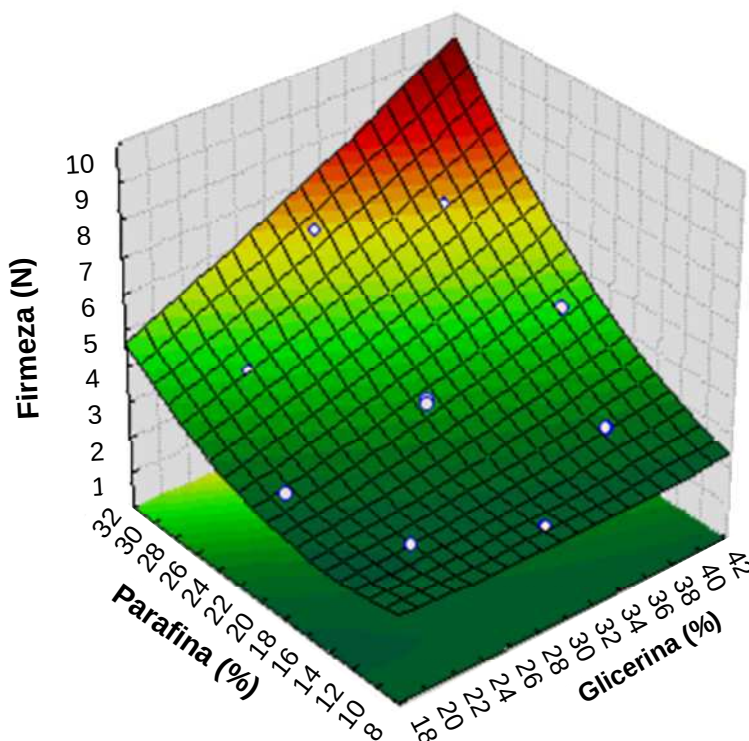


Figura 5.8. Superfície de resposta representativa da influência dos factores em estudo na firmeza.

A inclusão de dióxido de titânio aclara marcadamente a cor da formulação, efeito este observável logo na concentração mais baixa testada (0,5 % m/m). Na concentração de 1 % (m/m) observou-se após aplicação cutânea, uma coloração branca na pele. A incorporação do pigmento não tem nenhum efeito nas propriedades de textura, uma vez que a firmeza das preparações que incluíam diferentes concentrações de dióxido de titânio foi aproximadamente constante (Figura 5.9). Perante estes resultados, foi seleccionada a concentração de dióxido de titânio de 0,5 % (m/m), correspondente à formulação B (Tabela 5.5).

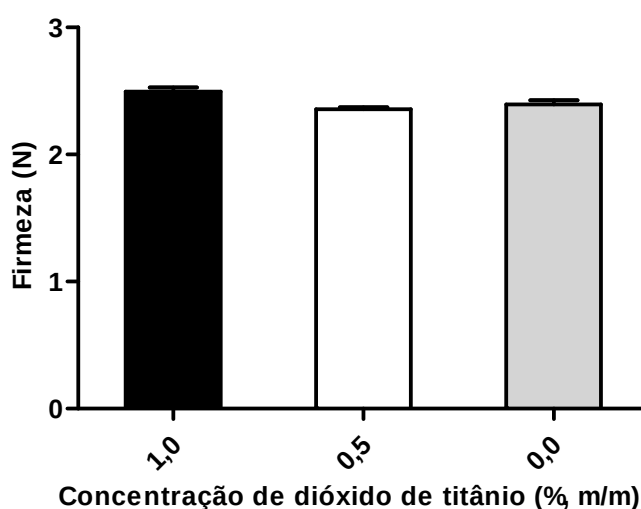


Figura 5.9. Influência da concentração de dióxido de titânio na firmeza. Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp.
T= 20 °C.

O pH tem uma importante influência nas propriedades de textura da forma semi-sólida. Observou-se um aumento de cerca de quatro vezes do valor da força máxima quando o pH foi ajustado de 3,11 para 4,45 (Figura 5.10). Incrementos subsequentes do pH não provocaram alterações neste parâmetro de textura. O grande aumento da firmeza reflectiu-se numa maior dificuldade em espalhar a preparação na pele. O uso de uma quantidade relativamente elevada de Carbopol® (2 % m/m) conduziu a uma sensação residual de adesividade, pelo que procurou-se reduzir a firmeza e a adesividade residual pela redução da quantidade de Carbopol®.

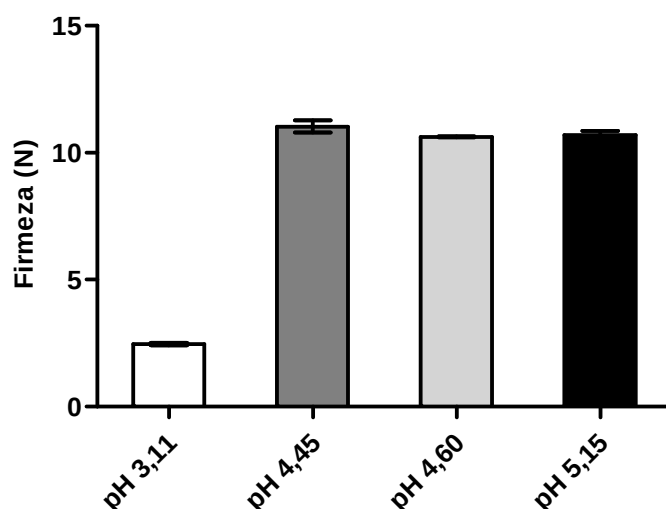


Figura 5.10. Influência do pH na firmeza. A concentração de Carbopol® é de 2 % (m/m). Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp. T= 20 °C.

A Figura 5.11 ilustra a influência da concentração do polímero no parâmetro força máxima. Considerando a influência do pH nas propriedades de textura, seleccionaram-se preparações com valores de pH muito próximos para a comparação ilustrada. O aumento da concentração do agente gelificante reflecte-se no aumento dos parâmetros de textura, o que indicia um aumento da firmeza do sistema em consequência do aumento do emaranhamento das cadeias poliméricas. Verificou-se que a concentração de Carbopol® também influenciou a estabilidade física, uma vez que após centrifugação (5000 rpm, 30 min), as preparações com 0,5 % (m/m) de polímero foram as únicas que apresentaram um exsudado líquido. Com base nos resultados obtidos, seleccionou-se a concentração de Carbopol® de 1 % (m/m) e a quantidade de trietanolamina de 0,26 % (m/m) que conduziu a um pH de 4,95 (formulação D₂, Tabela 5.7). A preparação obtida nessas condições apresenta uma menor adesividade residual e uma firmeza compatível com a aplicação cutânea.

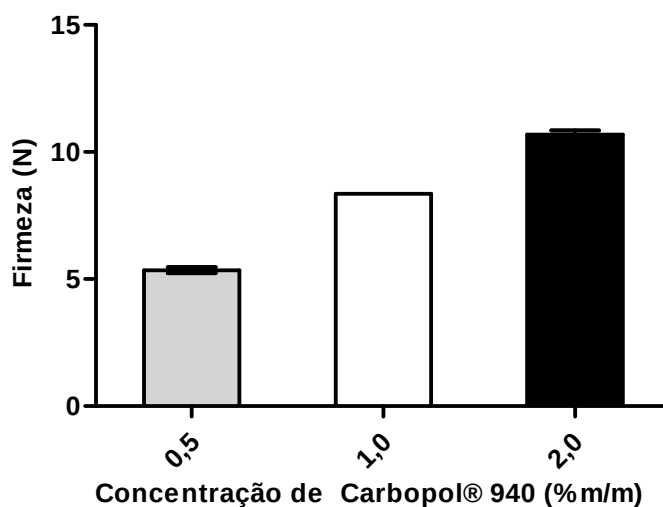


Figura 5.11. Influência da concentração de Carbopol® na firmeza. O pH encontra-se no intervalo 4,95-5,22. Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp. T= 20 °C.

5.2.2 Avaliação da estabilidade física, funcional e microbiológica

Após centrifugação, observou-se, para todos os lotes, ausência de separação de fases, notando-se contudo a formação de um ligeiro exsudado à superfície.

Após conclusão do teste cíclico, registaram-se alterações pouco relevantes da firmeza. Note-se que a inclusão do extracto produziu uma redução da firmeza da formulação (Figura 5.12).

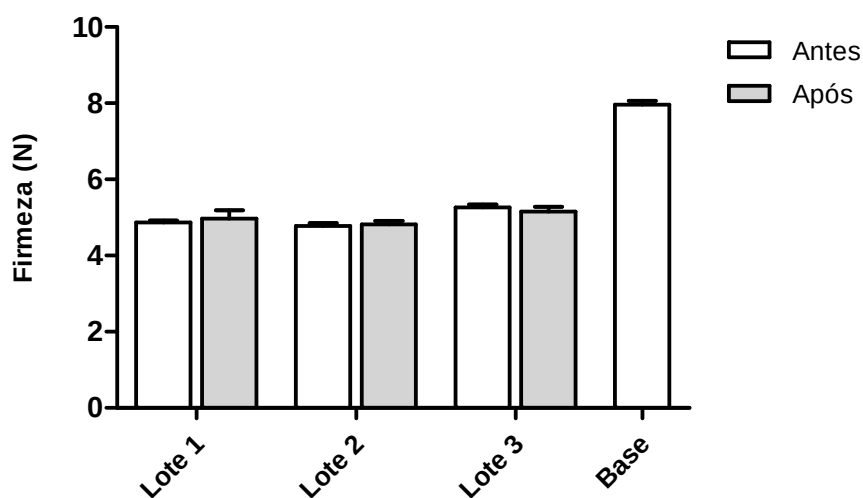


Figura 5.12. Comparação dos valores de firmeza do sistema submetido a um teste cíclico (4 – 40 °C, 7 dias). Os resultados exprimem a média de três determinações em que as barras de erro representam o dp. T= 20 °C.

A actividade captadora do radical DPPH não se alterou de forma apreciável após submissão da amostra ao teste cíclico, em que a temperatura variou diariamente entre 4 e 40 °C. A base não possui actividade captadora do radical DPPH. As amostras apresentaram também reduzidas alterações de pH e firmeza (Tabela 5.9) após o teste cíclico. Após adição de extracto, o pH é ligeiramente inferior ao da base ($4,85 \pm 0,04$). Após o teste vibratório, não se observaram alterações aparentes das características organolépticas e não ocorreu separação de fases, para todos os lotes preparados. A apreciação conjunta destes resultados conduz à conclusão de que a preparação desenvolvida apresenta características de estabilidade física e funcional satisfatórias e que a formulação poderá integrar um estudo de estabilidade em tempo real.

Tabela 5.9. Comparação dos valores de pH, de actividade captadora do radical DPPH e de firmeza avaliados antes e após execução do teste cíclico (média $\pm$ dp, n= 3)

Parâmetro	Antes			Após		
	Lote					
	1	2	3	1	2	3
pH	4,73 ± 0,05	4,75 ±0,03	4,76 ± 0,03	4,74 ± 0,05	4,74 ± 0,03	4,74 ± 0,04
IC ₅₀ (µg/ml)	17,03 ± 2,3	17,72 ± 1,84	17,94 ± 1,92	17,01 ± 1,29	17,48 ± 1,61	18,58 ± 1,09
Firmeza (N)	4,87 ± 0,05	4,78 ± 0,07	5,26 ± 0,08	4,97 ± 0,22	4,82 ± 0,09	5,15 ± 0,13

A metodologia de avaliação da actividade captadora do radical DPPH foi otimizada a partir da técnica usada para o extracto liofilizado, de acordo com as particularidades da preparação em estudo. A Tabela 5.10 sumariza os valores de IC₅₀ do ácido ascórbico calculados no ensaio de captação do radical DPPH executados com as diferentes metodologias desenvolvidas. As diferenças encontradas não são estatisticamente significativas ($p = 0,616$), o que constitui um indicador da validade das metodologias.

Tabela 5.10. Comparação da actividade captadora do DPPH do ácido ascórbico avaliada com diferentes metodologias (média $\pm$ dp, n≥ 4)

	Método extracto liofilizado	Método preparação em processo de optimização	Método preparação final
IC₅₀ (µg/ml)	$5,26 \pm 0,88$	$6,16 \pm 1,76$	$5,70 \pm 0,62$

Os coeficientes de variação para os parâmetros estudados nos três lotes preparados oscilaram entre 0,5 % (no ensaio de avaliação do pH) e 6,5 % (para a

firmeza) o que indica uma boa reprodutibilidade do processo de fabrico da preparação desenvolvida.

O pH permaneceu no intervalo 4,5 – 5,0 para ambas as condições de armazenamento, não se observando uma tendência crescente ou decrescente com o tempo (Figura 5.13).

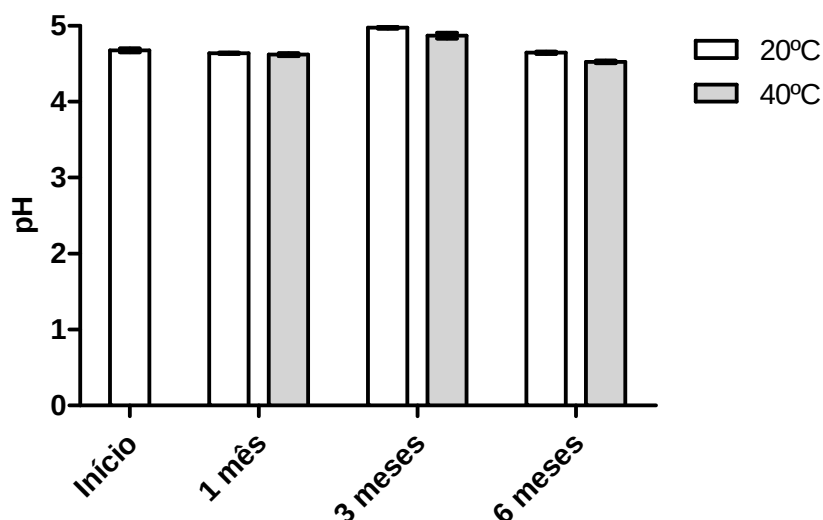


Figura 5.13. Evolução do pH após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. Os resultados exprimem a média dos resultados dos três lotes em que as barras de erro representam o dp.

A 20 °C, as alterações de todos os parâmetros cromáticos foram muito discretas e não perceptíveis à visão. A cor modificou-se substancialmente após armazenamento a 40 °C e 75 % HR. Notou-se uma redução da luminosidade (escurecimento), traduzida na redução do parâmetro L^* . O efeito mais importante registou-se para o parâmetro a^* , que representa a escala cromática entre verde e vermelho (Figura 5.14). O aumento verificado é perceptível a olho nu como uma diminuição da coloração verde (Figura 5.15). O parâmetro b^* aumentou ligeiramente após armazenamento em condições aceleradas.

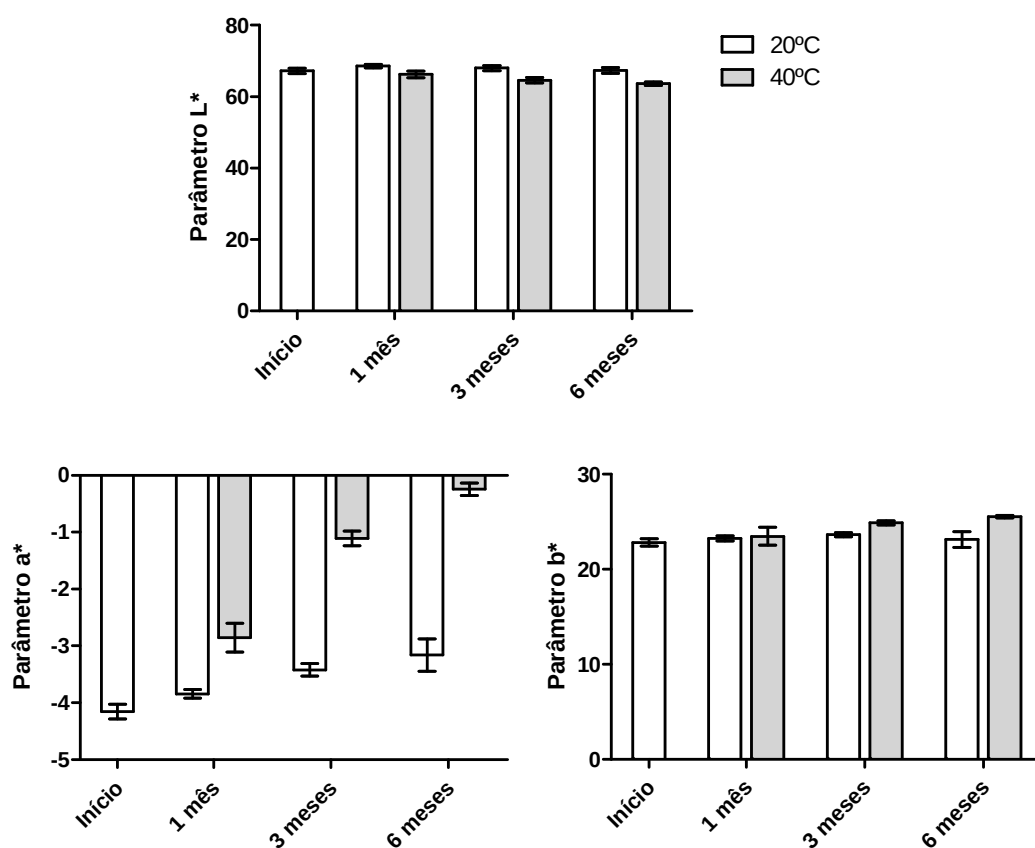


Figura 5.14. Evolução dos parâmetros de cor L*, a* e b* após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. Os resultados exprimem a média dos resultados dos três lotes em que as barras de erro representam o dp.

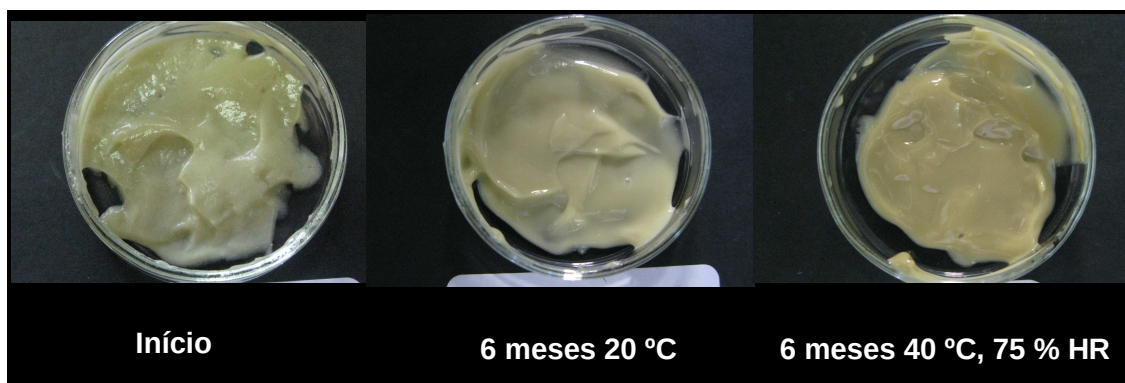


Figura 5.15. Comparação do aspecto do sistema em estudo no início e após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR durante seis meses.

Relativamente às propriedades de textura, notou-se uma ligeira redução da firmeza após armazenamento a 20 °C. Esta alteração não é, aparentemente, perceptível durante a manipulação e aplicação da preparação na pele. Em condições aceleradas esta diminuição foi mais acentuada (Figura 5.16).

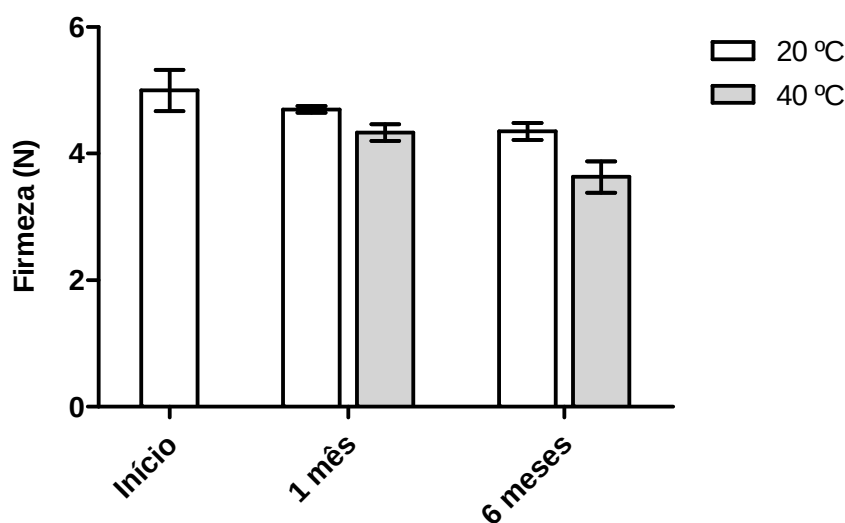


Figura 5.16. Evolução da firmeza após armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. Os resultados exprimem a média dos resultados dos três lotes em que as barras de erro representam o dp.

Ao fim de seis meses de armazenamento em condições aceleradas, observou-se uma variação de 25 % do valor de IC_{50} calculado no ensaio de avaliação da actividade captadora do radical DPPH, enquanto após armazenamento a 20 °C não se detectou alteração apreciável da actividade antioxidante (Figura 5.17).

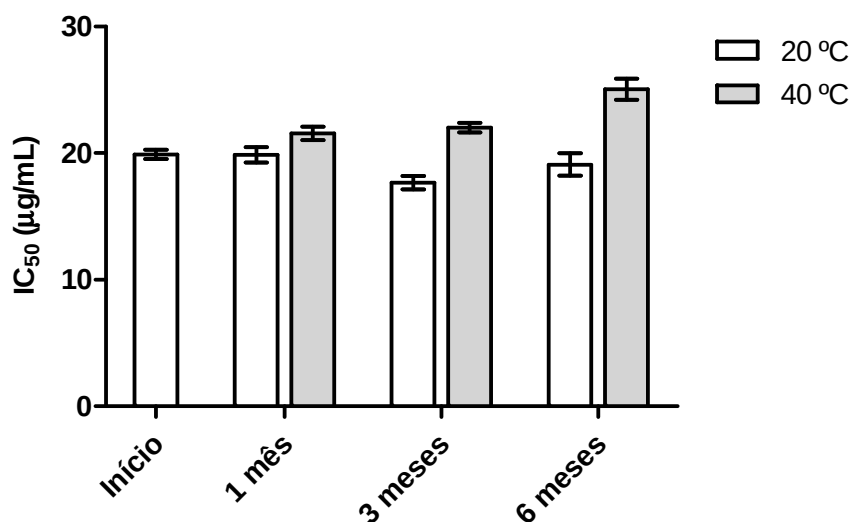


Figura 5.17. Evolução dos valores de IC_{50} calculados no ensaio de captação do radical DPPH após armazenamento a 20 °C e 40 °C e 75 % HR. Os resultados exprimem a média dos resultados dos três lotes preparados em que as barras de erro representam o dp.

O comportamento reológico da preparação desenvolvida pode ser classificado como reofluidificante com tensão de cedência aparente. A Figura 5.18 ilustra a diminuição da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de deformação em corte que caracteriza o comportamento reofluidificante. A área de histerese entre as curvas ascendente e descendente é praticamente inexistente, o que indicia a ausência de comportamento tixotrópico. O valor do índice de escoamento (n) do modelo Herschel-Bulkley ajustado aos valores experimentais (Tabela 5.11.) confirma o tipo de comportamento. Com efeito, quando este valor é idêntico a 1 o comportamento é do tipo newtoniano. Valores inferiores caracterizam o comportamento reofluidificante e valores de $n > 1$ indicam que a viscosidade aparente aumenta com a velocidade de deformação em corte (comportamento reoespessante).

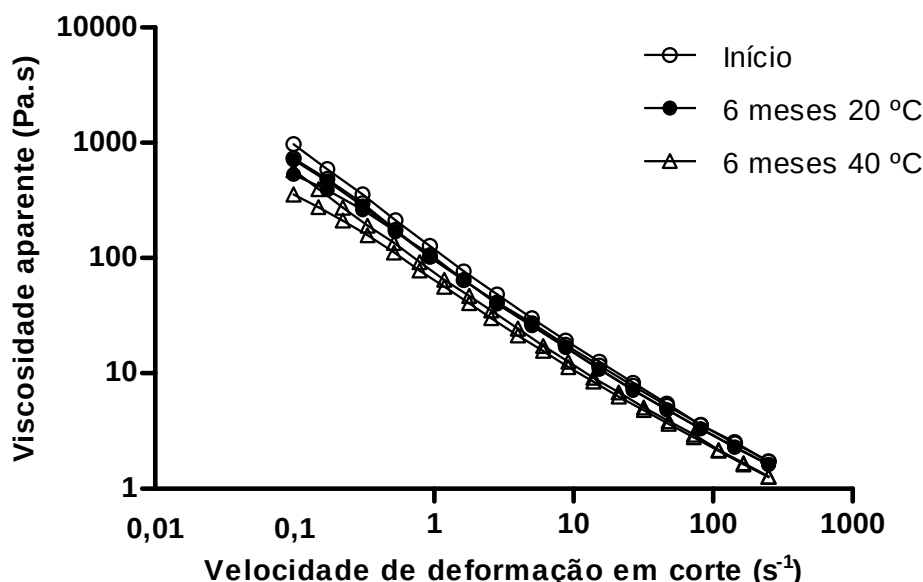


Figura 5.18. Comparação das curvas de viscosidade no início do ensaio de estabilidade e após seis meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. Os resultados representados reportam-se ao lote 2.

O tipo de comportamento reológico não foi alterado no decurso do ensaio de estabilidade, uma vez que se observou para todas as amostras uma redução da viscosidade em função do aumento da velocidade de deformação em corte. Em concordância, os valores do índice de escoamento do modelo Herschel-Bulkley mantiveram-se praticamente inalteráveis (Tabela 5.11.). A redução da viscosidade da preparação semi-sólida armazenada em condições aceleradas é também visível no gráfico que representa tensão de corte *versus* velocidade de deformação em corte

(Figura 5.19), o qual exhibe a presença de uma tensão de cedência aparente (tensão mínima acima da qual se observa escoamento).

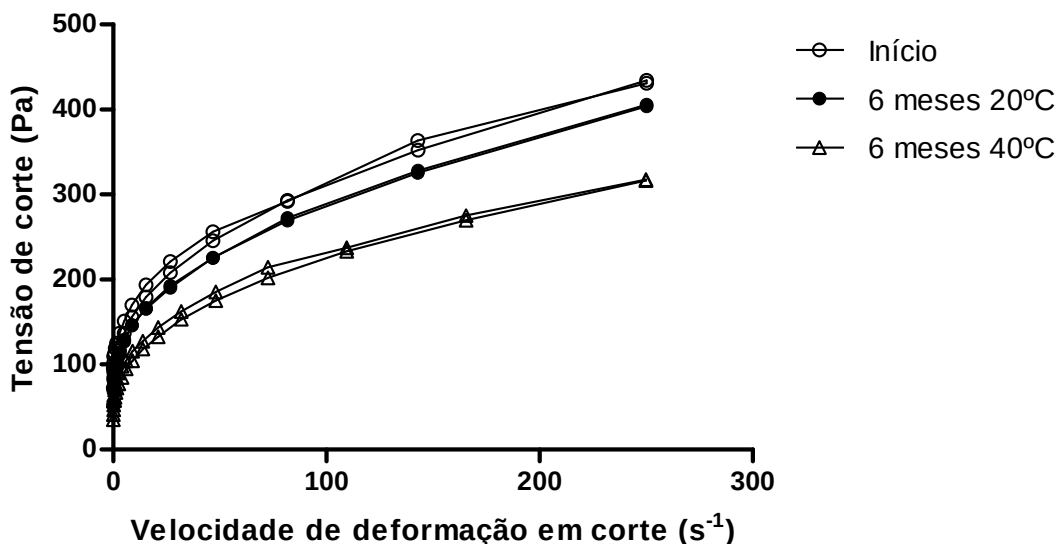


Figura 5.19. Comparação dos reogramas no início do ensaio de estabilidade e após 6 meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. Os resultados representados reportam-se ao lote 2.

A utilização de modelos reológicos facilita a comparação do comportamento reológico. Os parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley estão descritos na Tabela 5.11. A 20 °C o coeficiente de consistência (K) praticamente não se alterou, enquanto a 40 °C e 75 % (HR) ocorreu uma redução importante. A tensão de cedência aparente foi marcadamente inferior para ambas as condições de armazenamento.

Tabela 5.11. Comparação dos parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley obtidos no início do ensaio de estabilidade e após 6 meses de armazenamento a 20 °C e a 40 °C e 75 % HR. (média $\pm$ dp dos três lotes, $n= 3$)

	K (Pa.s ^{n})	n	τ_0 (Pa)
Início	34,67 $\pm$ 0,92	0,42 $\pm$ 0,01	101,34 $\pm$ 24,20
6 meses 20 °C	36,78 $\pm$ 3,78	0,41 $\pm$ 0,01	57,01 $\pm$ 8,36
6 meses 40 °C e 75 % HR	28,01 $\pm$ 1,81	0,42 $\pm$ 0,01	50,31 $\pm$ 10,2

Na súmula dos resultados obtidos, pode concluir-se que o armazenamento em condições aceleradas provocou alterações importantes nas propriedades físicas da

preparação, tendo também efeito na actividade do extracto de *C. sativa* incorporado. Após armazenamento à temperatura de 20 °C, a preparação apresentou uma boa estabilidade física e funcional. As alterações reológicas observadas a 20 °C não são aparentemente perceptíveis durante o manuseamento e a aplicação da preparação.

Após seis meses de armazenamento a 20 °C, as amostras apresentaram uma boa qualidade microbiológica, apresentando contagens de UFC abaixo dos limites estipulados pela FP VIII para o número total de germes aeróbios viáveis de preparações para aplicação local classe 2, que foram usados como referência (no máximo 10² bactérias, fungos e leveduras por grama) (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Número de unidades formadoras de colónias (UFC) de microrganismos totais e bolores e leveduras existentes nos três lotes do sistema em estudo, após 6 meses de armazenamento a 20 °C

	Lote		
	1	2	3
Nº de UFC de microrganismos totais	<10/g	<10/g	<10/g
Nº de UFC de bolores e leveduras	<100/g	<100/g	<100/g

5.2.3 Avaliação da acção preventiva da degradação oxidativa do sistema semi-sólido

Os termogramas obtidos em atmosfera de azoto e atmosfera de oxigénio apresentam um primeiro pico endotérmico próximo de 50 °C, representativo da evaporação da água contida no sistema (Figura 5.20). A grande diferença nos termogramas surge próximo dos 190 °C. Nessa temperatura e em atmosfera de oxigénio, surge um pico exotérmico, reflexo da oxidação da amostra. Dos resultados apresentados pode concluir-se que a preparação semi-sólida sem extracto de *C. sativa* incorporado (base) apresenta degradação oxidativa a uma temperatura próxima de 190 °C.

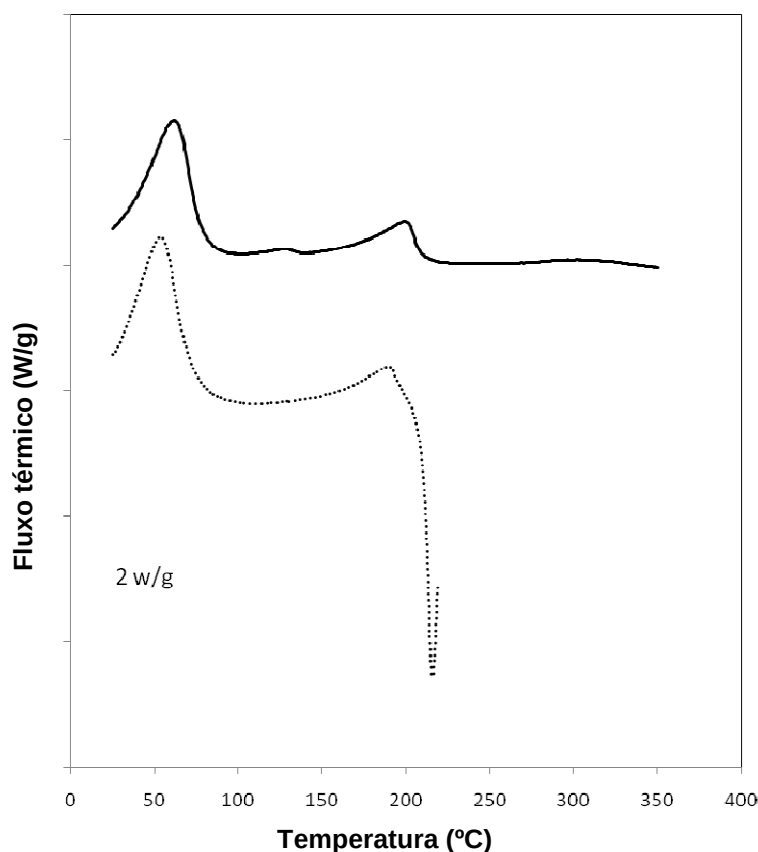


Figura 5.20. Comparação dos termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varrimento em atmosfera de oxigénio (.....) e em atmosfera de azoto (___) da base (preparação sem extracto).

A inclusão do extracto de *C. sativa* conduz a um aumento da temperatura de indução da oxidação da preparação de cerca de 11 °C (Figura 5.21). Tal facto permite concluir que o extracto mantém a sua actividade antioxidante após incorporação no sistema semi-sólido e sugere a compatibilidade do extracto com os diversos constituintes da formulação. As suas propriedades físico-químicas (tais como o pH) parecem não inibir a actividade antioxidante do extracto.

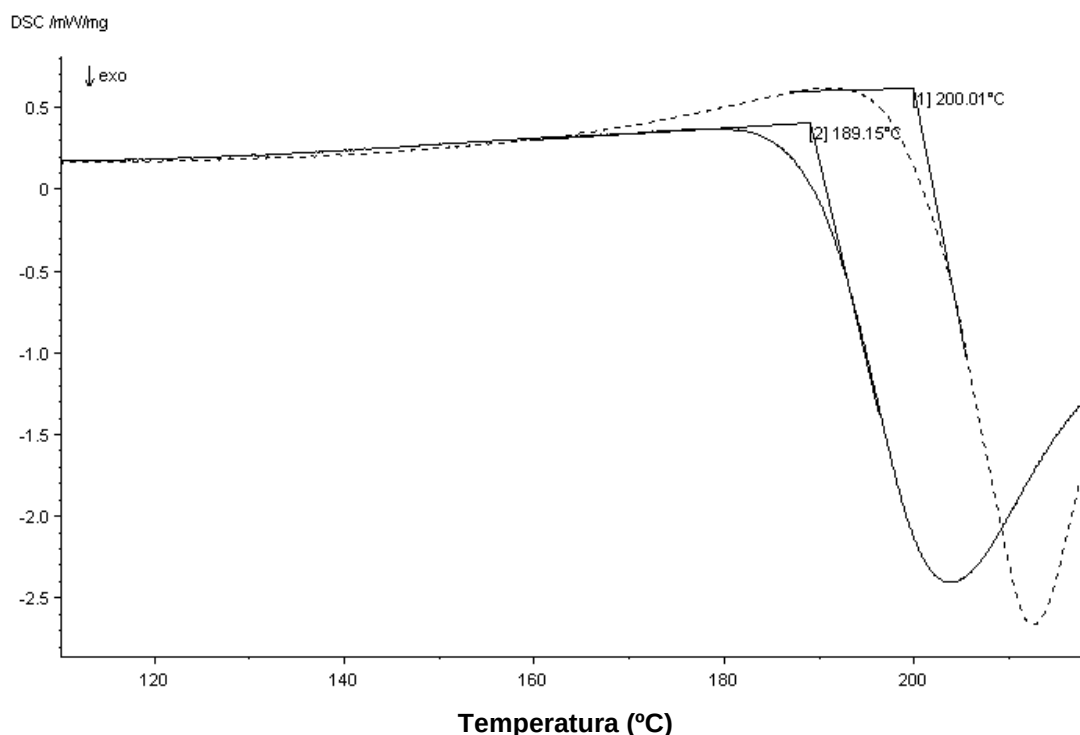


Figura 5.21. Comparação dos termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varrimento em atmosfera de oxigénio da preparação (.....) e da base (preparação sem extracto) (___).

5.2.4 Avaliação do efeito hidratante cutâneo

No final do estudo (4 h), observou-se que quer o controlo positivo, quer as preparações com e sem extracto (base) proporcionaram valores de hidratação cutânea significativamente superiores ao controlo negativo (local sem aplicação de qualquer produto), (Tabela 5.13). Verificou-se uma reduzida diferença entre o efeito hidratante cutâneo proporcionado pela preparação com extracto e pela base (Figura 5.22). Tal facto conduz à conclusão de que é a base a responsável pelo efeito hidratante, associado, pelo menos parcialmente, ao seu conteúdo em glicerina.

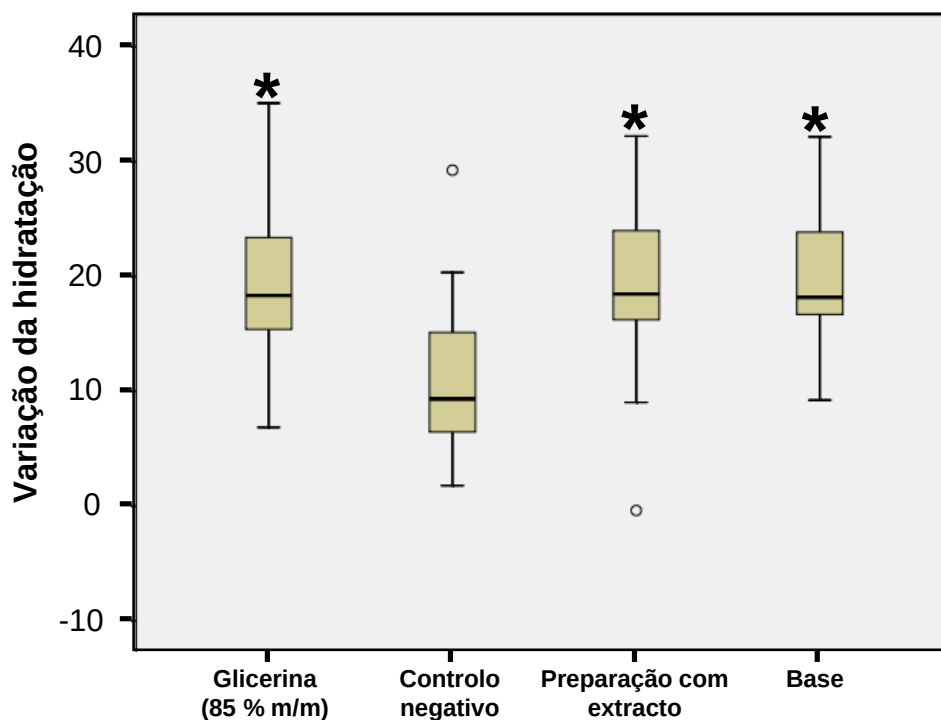


Figura 5.22. Caixa de bigodes representativa da variação dos valores de hidratação cutânea observados para todos o produtos em estudo, 4 horas após a sua aplicação (*valores estatisticamente significativos).

Tabela 5.13. Parâmetros do teste de Dunnett (comparação das variações de TEWL e de hidratação com o controlo negativo 1 e 4 h após aplicação dos produtos, valores de p , $p \leq 0,05$)

	TEWL		Hidratação	
	1 h	4 h	1 h	4 h
Glicerina (85 % m/m)	0,672	0,700	<0,001*	<0,001*
Preparação com extracto de <i>C. sativa</i>	0,434	0,695	<0,001*	<0,001*
Base	0,514	0,390	<0,001*	<0,001*

*valores estatisticamente significativos

Relativamente à TEWL, indicador da integridade da barreira cutânea, não se verificaram diferenças significativas deste parâmetro em comparação com o controlo negativo para nenhum dos produtos em estudo, quer 1 hora quer 4 horas após a sua aplicação (Figura 5.23, Tabela 5.13).

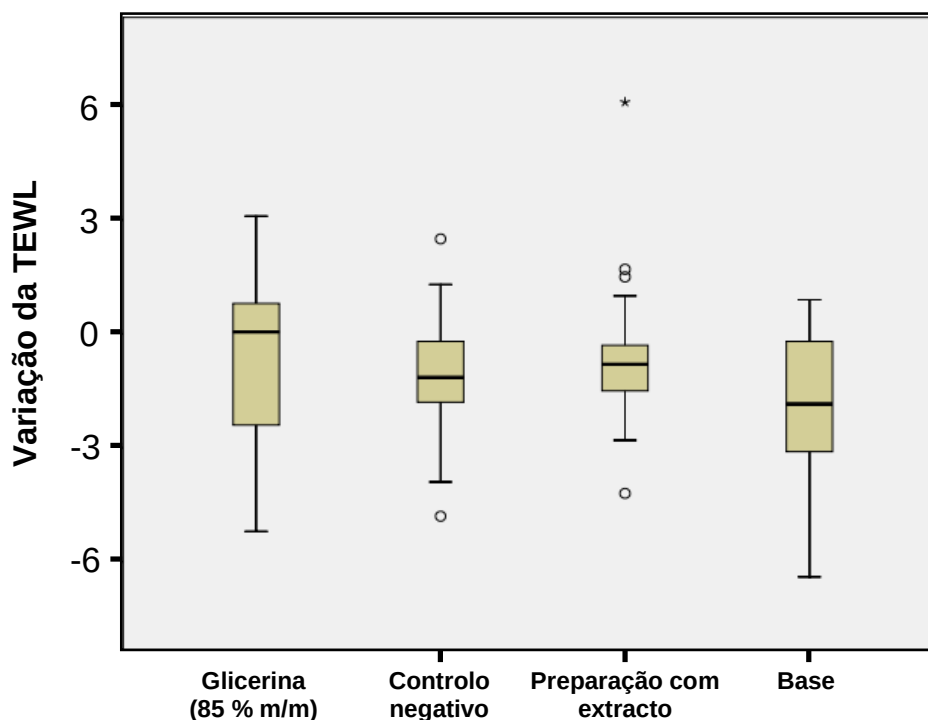


Figura 5.23 Caixa de bigodes representativa da variação dos valores de TEWL observada para todos os produtos em estudo, 4 horas após a sua aplicação.

5.2.5 Caracterização estrutural

As imagens obtidas por microscopia óptica (Figura 5.24) evidenciam a presença de gotículas, aspecto característico de sistemas emulsionados, e de partículas sólidas dispersas na fase externa.

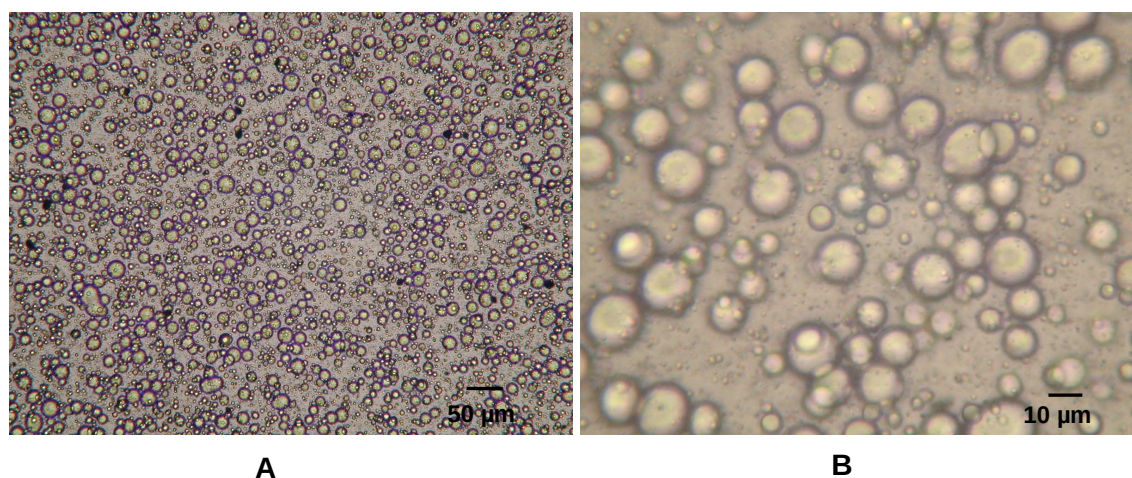


Figura 5.24. Imagens obtidas por microscopia óptica, (A – ampliação 10 X; B -ampliação 40 X).

As imagens de CryoSEM, em concordância, evidenciam a presença de gotículas aproximadamente esféricas inseridas numa matriz de aspecto regular, onde pontualmente se observam partículas de dióxido de titânio, que surgem nestas imagens com cor branca (Figura 5.25).

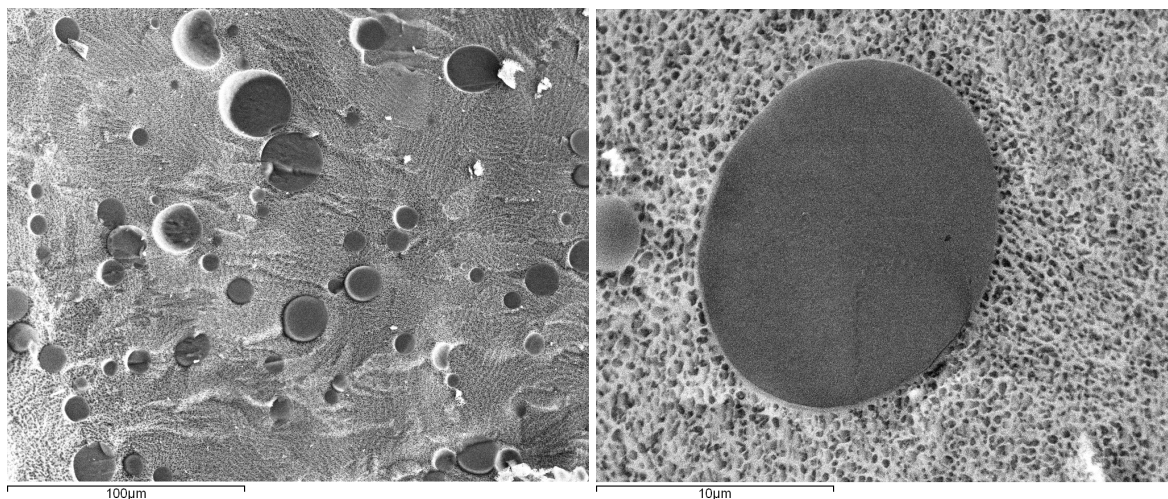


Figura 5.25. Imagens obtidas por CryoSEM com diferentes ampliações.

Estas imagens evidenciam uma continuidade entre a gotícula de parafina líquida e a matriz polimérica, o que sugere uma ligação íntima entre as duas fases, eventualmente com repercussões na estabilidade do sistema. A rede polimérica apresenta-se regular, com o aspecto característico das redes formadas pelos carbómeros. A imagem da estrutura reticular (Figura 5.26) revela uma estrutura semelhante à estrutura tipo “favos de mel” característica dos polímeros do ácido acrílico, em particular para concentrações mais elevadas [409].

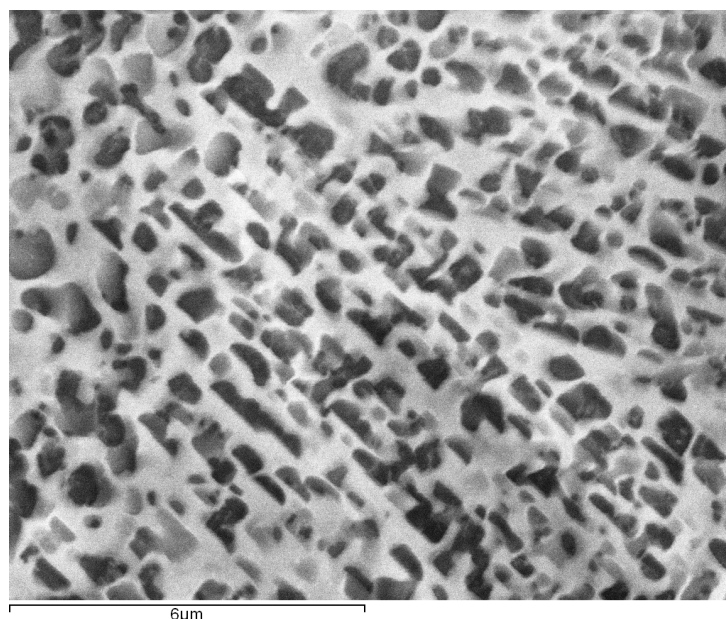


Figura 5.26. Imagem da estrutura tipo “favos de mel” característica dos polímeros do ácido acrílico, obtida por CryoSEM.

5.3 DISCUSSÃO

A influência da fracção volúmica da fase interna na viscosidade de preparações emulsionadas é bem conhecida. Emulsões muito diluídas apresentam comportamento newtoniano enquanto nas emulsões mais concentradas a fracção volúmica exibe uma forte influência, observando-se um aumento praticamente exponencial da viscosidade aparente com o incremento da fracção volúmica. O comportamento reológico nestas condições é não newtoniano. As propriedades de textura reflectem as propriedades reológicas de um produto. As metodologias de avaliação das propriedades de textura procuram reproduzir o uso dos produtos em análise, obtendo-se parâmetros que frequentemente apresentam boa correlação com atributos sensoriais. Jones *et al.* procuraram inclusive definir modelos que permitissem obter parâmetros reológicos a partir dos resultados obtidos na análise de textura [410]. O marcado efeito da parafina líquida na firmeza das formulações está em consonância com o comportamento esperado para um sistema emulsionado. É interessante verificar que variando a percentagem de fase lipófila entre 10 e 30 % não se observou redução da estabilidade física (avaliada por centrifugação), facto que assume especial relevo em face da ausência de agentes emulsivos. A glicerina tem também influência na firmeza do sistema, embora seja menos expressiva. A viscosidade da fase dispersante é outro dos factores que condiciona a viscosidade das preparações emulsionadas. A viscosidade da glicerina a 85 % (m/m), com comportamento newtoniano, é de 109 mPa.s (a 20 °C) e o facto de estar presente

em concentração elevada (entre 20 e 40 %) poderá traduzir-se num efeito viscosificante. No entanto, o papel da glicerina na firmeza deverá estar mais directamente relacionado com o seu envolvimento na formação de pontes de hidrogénio com o polímero gelificante. Estudos reológicos descritos na literatura demonstraram que a glicerina, entre outros polióis, foi o solvente que permitiu a obtenção de geles de Carbopol® ED 2050 mais estruturados, mesmo em comparação com geles aquosos neutralizados [411]. Sendo um triol, a glicerina tem a capacidade de interagir com grupos carboxílicos da mesma cadeia polimérica e simultaneamente com grupos carboxílicos de cadeias adjacentes. No entanto, o tipo de polímero parece influenciar as propriedades reológicas dos geles obtidos com solventes hidrófilos. Dispersões glicéricas de Carbopol® 971 e 974 apresentaram comportamento reológico característico de uma dispersão de polímeros emaranhados, e não de um gel, embora apresentassem elevadas viscosidades [412]. Outro estudo aponta a influência do processo de síntese dos polímeros carboxivinílicos nas propriedades reológicas dos geles glicéricos. A adição de iões potássio durante a síntese leva à ionização parcial do polímero, a qual se traduz num aumento da viscosidade dos geles obtidos por dispersão do polímero em glicerina [381]. O método de preparação das formulações em estudo é simples e praticamente conduzido à temperatura ambiente (com excepção da etapa de dissolução do conservante), o que é favorável do ponto de vista económico. O facto de não serem usadas temperaturas elevadas contribui também para evitar a degradação dos constituintes da formulação, em particular do extracto de *C. sativa*.

A incorporação da glicerina na formulação foi motivada pelo seu papel na estabilidade do extracto de *C. sativa*, o qual foi elucidado nos estudos conduzidos no capítulo 4. Na gama de concentrações testada, não se observou influência das concentrações de glicerina e de parafina líquida nos valores de IC₅₀ calculados no ensaio de avaliação da actividade captadora do radical DPPH. A definição da composição quantitativa foi motivada pela constatação da ausência de influência dos factores estudados na actividade do extracto de *C. sativa* e atendendo ao factor económico. As preparações semi-sólidas de aplicação na pele não cumprem critérios muito restritos no que concerne às propriedades reológicas. É disso exemplo a gama de valores de firmeza encontrada para os três produtos destinados à aplicação facial testados. As propriedades reológicas, em particular dos produtos cosméticos, são muitas vezes seleccionadas em função das características específicas da pele a que se destinam, não existindo assim valores ideais para a firmeza. Praticamente todos os valores de firmeza das 12 formulações do plano experimental estão enquadrados na gama de valores encontrada para as três referências comerciais. Deste modo, apesar da firmeza das formulações em estudo ter apresentado uma assinalável variação em função da composição quantitativa,

a definição das quantidades de glicerina e de parafina líquida não foi orientada pela sua influência na firmeza, tendo sido seleccionada a formulação que incluía 13 % de parafina líquida e 23 % de glicerina. O processo de optimização prosseguiu com a incorporação de um pigmento branco, com o ajuste da concentração do polímero gelificante e com o ajuste do pH. A incorporação de dióxido de titânio cumpriu os objectivos pretendidos, obtendo-se uma formulação com cor mais clara, e não produziu alterações na firmeza (possivelmente devido à baixa concentração usada). O dióxido de titânio poderá teoricamente contribuir para um efeito preventivo dos efeitos nefastos da exposição solar, dado que é um filtro solar físico com capacidade para reflectir e/ou dispersar a radiação incidente. No entanto, a concentração em que é usado (0,5 % m/m), notoriamente inferior à que é usada em protectores solares, não suporta a acção da formulação como protector solar.

O pH tem uma influência selectiva nas propriedades de textura. Para uma variação de pH de 3,11 (não neutralizado) para 4,45 observou-se um aumento de quatro vezes da firmeza, o qual pode ser atribuído a uma ionização parcial dos grupos carboxílicos. Aumentos subsequentes (até pH 5,11) praticamente não produziram alterações. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores que demonstraram que o comportamento reológico de geles de Carbopol® 980 (estruturalmente semelhante ao Carbopol® 940), obtidos em misturas água/glicerina/propilenoglicol, não se alterou apreciavelmente para o intervalo de valores de pH 5,0 – 8,0 [413]. Outros autores reportaram uma influência bifásica do pH nas propriedades reológicas de geles hidroalcoólicos de Carbopol Ultrez 10® em que ocorre um aumento inicial muito pronunciado do índice de consistência dos geles (pH 4 – 5) seguido de incrementos reduzidos no intervalo de valores de pH de 5,5 a 7 [414]. A adição de 0,25 % (m/m) de trietanolamina proporcionou um aumento de cerca de cinco vezes da viscosidade aparente do gel glicérico. O efeito marcado da adição de uma base a um gel glicérico obtido com Carbopol® 974 foi reportado por Proniuk e Blanchard [381]. No estudo referido, constatou-se que a viscosidade dos geles glicéricos é superior à dos geles aquosos na presença de idêntica quantidade de agente alcalinizante, sendo apontado como justificação a associação de dois diferentes mecanismos de gelificação nos geles glicéricos: formação de pontes de hidrogénio e repulsão das cadeias ionizadas do esqueleto polimérico. Analogamente, com base nos resultados obtidos é possível concluir que a gelificação na mistura hidroglicérica, para valores de pH no intervalo 4,5 – 5,0, deverá ocorrer parcialmente devido à formação de pontes de hidrogénio com a glicerina e parcialmente devido à repulsão das cadeias ionizadas.

Optou-se por definir um pH compreendido entre 4,5-5,0, o qual, de acordo com estudos anteriores, é favorável à estabilidade do extracto de *C. sativa* e simultaneamente é compatível com o pH cutâneo. Nesta gama de valores de pH não são esperadas importantes alterações da firmeza. Currant *et al.* reportaram que a viscosidade máxima de geles aquosos de Carbopol® 940 se obtém para o valor de pH de 5 [415]. É conhecido que a concentração de Carbopol® influencia a estrutura dos geles devido ao aumento do número de ligações entre as cadeias do polímero com o aumento da sua concentração. A firmeza do produto semi-sólido desenvolvido neste trabalho aumentou com o incremento da concentração do polímero, em concordância com observações de diferentes autores para este polímero [416] ou polímeros da mesma família [381].

Os estudos preliminares de estabilidade do sistema semi-sólido evidenciaram bons indicadores da estabilidade em tempo real, atendendo em particular a que a ausência de tensioactivo na interfase óleo/água poderia comprometer a estabilidade do sistema. O teste cíclico (com variação da temperatura entre 4 e 40 °C) e o teste vibratório não revelaram problemas de destabilização. A formação de um ligeiro exsudado após centrifugação não é por si só sinónimo de instabilidade, uma vez que a velocidade de centrifugação usada (5000 rpm) é bastante elevada e não ocorreu nenhum outro fenómeno de destabilização, tal como formação de creme, aglomeração, sedimentação ou separação de fases. A adição de 0,5 % (m/m) de extracto de *C. sativa* produziu uma redução da firmeza e um ligeiro decréscimo do pH. A influência de um extracto vegetal nas propriedades físicas de uma forma semi-sólida foi previamente reportada por Bouftira *et al.* que constataram a diminuição da viscosidade e a redução do pH de um creme O/A aniónico após adição de extracto de *Mesembryanthemum crystallinum* [417]. No estudo referido, a incorporação do extracto na preparação semi-sólida reflectiu-se também numa importante redução da actividade antioxidante (avaliada com o ensaio de captação do radical DPPH), que não encontrou paralelo no trabalho desenvolvido na presente tese. Di Mambro *et al.* também referem a redução da viscosidade de preparações semi-sólidas após adição de extractos de plantas [418].

Os estudos conduzidos em tempo real (a 20 °C) revelaram apenas ligeiras alterações das propriedades físico-químicas, que em regra não ultrapassaram uma variação de 13 %. Os geles de Carbopol® são caracterizados por uma boa estabilidade térmica [413], sendo que o Carbopol® 940 (na concentração de 1 % m/m) foi considerado, de entre vários polímeros gelificantes, o que proporciona geles mais estáveis [419]. No entanto, ocorreram alterações mais relevantes das propriedades físicas e também químicas (reflectidas na actividade antioxidante) a 40 °C. A alteração de cor observada na preparação está em consonância com a alteração da cor do extracto observada no

ensaio de fotoestabilidade, associada à elevação de temperatura que acompanha o referido ensaio.

O comportamento reológico (reofluidificante com valor de cedência aparente) é similar ao comportamento dos geles de Carbopol[®], quer em dispersão aquosa quer disperso em solventes hidrófilos [411] sendo também característico de cremes O/A. A diminuta área de histerese indica ausência de comportamento tixotrópico. Este comportamento é semelhante ao descrito para geles de Carbopol[®] 980 obtidos com a mistura água/glicerina/propilenoglicol onde só para elevadas velocidades de deformação em corte se observa histerese [413]. O modelo de Herschel-Bulkley descreveu satisfatoriamente o comportamento reológico do sistema desenvolvido. Este modelo tem sido aplicado para caracterização de cremes com fase externa gelificada com polímeros carboxivinílicos [420] e geles vaginais obtidos com polímeros do ácido acrílico [421], tendo sido inclusive considerado o mais apropriado para descrever as propriedades de escoamento de geles de Carbopol[®] [409]. Os resultados demonstraram que o tipo de comportamento reológico não se alterou nas diferentes condições de armazenamento e que as alterações dos parâmetros reológicos foram mais pronunciadas quando o estudo foi conduzido em condições aceleradas. O parâmetro que sofreu alterações mais importantes foi a tensão de cedência aparente. Segundo alguns autores [422], a existência de um valor de cedência é questionável uma vez que em face do aparecimento de reómetros que permitem utilizar velocidades de corte ou tensões de corte extremamente baixas, foi possível constatar que materiais que aparentam não escoar, na realidade apresentam escoamento para valores de tensão ou velocidade muito baixos. Estes materiais apresentam viscosidades limites muito elevadas, de modo que o escoamento não é detectado visualmente, considerando um dado intervalo de tempo. É no entanto genericamente aceite que o valor de cedência aparente caracteriza a capacidade de um material manter partículas em suspensão e minimizar a ocorrência de formação de creme ou floculação em sistemas emulsionados, fenómenos estes que decorrem a baixos valores de tensão de corte. Pode assim assumir-se que quanto mais elevado for o valor de τ_0 mais estável será o produto. No entanto, valores muito elevados podem dificultar a espalhabilidade na pele, pelo que deve existir um compromisso entre uma adequada estabilidade física e facilidade de aplicação. Embora os valores de τ_0 tenham diminuído após armazenamento em ambas as condições estudadas, continuam a ser valores relativamente elevados. Os valores de τ_0 e K obtidos são notoriamente superiores aos reportados por outros autores (obtidos com o mesmo modelo reológico) para geles aquosos neutralizados com a mesma concentração de Carbopol[®] 941 [409]. Tal facto pode ser interpretado como uma contribuição da presença de glicerina e de uma

fase interna lipófila para um produto mais estruturado. Roso e Brinet reportaram o aumento do carácter elástico após adição de uma fase oleosa a um hidrogel [423].

O facto da glicerina apresentar uma acção hidratante da pele foi um dos argumentos favoráveis à sua inclusão na formulação. Estudos conduzidos com um creme com uma quantidade de glicerina (20 % m/m) semelhante à da formulação em estudo demonstraram um claro efeito na hidratação cutânea após aplicação repetida [382]. Estão também descritas para este poliol propriedades anti-irritantes e reparadoras da barreira cutânea [424]. A acção hidratante das formulações foi bastante notória. O extracto não parece contribuir para o efeito hidratante, uma vez que os resultados obtidos após aplicação da base foram similares aos obtidos com a preparação completa. O efeito na hidratação cutânea estará provavelmente relacionado com o conteúdo em glicerina. Os resultados obtidos com a preparação com extracto são similares aos obtidos com a glicerina (85 % m/m), embora as concentrações do poliol não sejam comparáveis. O efeito cutâneo da glicerina depende da quantidade de humectante absorvida no estrato córneo, pelo que a sua concentração e a composição da formulação são aspectos críticos. Está descrita uma dependência do efeito hidratante da quantidade de glicerina, existindo relatos de efeitos diferentes para concentrações de 5 e 10 % (m/m) [424]. É possível contudo que a partir de determinada concentração seja atingido o efeito máximo, e que aumentos subsequentes da quantidade de glicerina não produzam efeitos adicionais, o que justificaria os resultados obtidos. Embora esteja descrita a redução da TEWL após aplicação única de glicerina, neste trabalho não se observaram alterações significativas da TEWL, o que sugere também a ausência de efeitos oclusivos. Uma ausência de influência neste parâmetro biométrico foi também confirmada num estudo conduzido com um creme com 20 % (m/m) de glicerina, após 10 dias de aplicação [382].

O extracto de *C. sativa* tem a capacidade de prevenir a oxidação da formulação, uma vez que a temperatura de indução da oxidação é aumentada na presença do extracto. Este facto reveste-se de uma especial importância porque constitui um indicador de que os constituintes e as características da formulação não inibem a actividade do extracto. Outros autores encontraram uma importante redução da actividade antioxidante de extractos de plantas após incorporação em cremes [417].

As imagens microscópicas revelaram o aspecto característico das emulsões, com gotículas de parafina líquida dispersas na fase externa e partículas de dióxido de titânio dispersas na preparação. A rede polimérica tem dimensões sub-microscópicas não sendo por isso visível ao microscópio óptico. As imagens de CryoSEM revelaram a estrutura da rede polimérica, que se apresenta homogénea e intimamente ligada às gotículas de parafina líquida e tal como observado por microscopia óptica, revelaram que as partículas de dióxido de titânio se encontram dispersas na fase externa.

Em conclusão, a composição quantitativa (de parafina líquida e de glicerina) da formulação influenciou a firmeza, não tendo afectado a actividade antioxidante do extracto de *C. sativa* incorporado. A incorporação de dióxido de titânio conduziu à obtenção de uma cor mais clara (presumivelmente mais agradável) e não influenciou a firmeza da formulação. O ajuste do pH para um valor próximo de 5 conduziu a um grande aumento da firmeza, desfavorável à espalhabilidade, que foi ultrapassado pela redução da concentração do polímero gelificante, medida esta com consequências positivas na adesividade residual. A preparação desenvolvida após o processo de optimização foi obtida por um processo simples, reproduzível, conduzido a baixa temperatura (importantes atributos do ponto de vista industrial) e revelou bons indicadores de estabilidade nos estudos preliminares. O ensaio de estabilidade em tempo real conduzido a 20 °C confirmou a estabilidade física e funcional. Contudo, o armazenamento a 40 °C e 75 % HR levou à redução da firmeza e da actividade antioxidante bem como a uma degradação da cor, embora o sistema tenha apresentado boa estabilidade à centrifugação e não evidenciasse separação de fases. Estas alterações sugerem que, numa perspectiva de comercialização, devem efectuar-se algumas recomendações das condições de conservação do produto. A preparação desenvolvida apresentou ainda capacidade hidratante após aplicação única, uma propriedade relevante para o potencial uso na pele desidratada em consequência de diferentes factores, incluindo a exposição solar.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Tal como referido no Capítulo 1, a pele está exposta a vários agentes externos que conduzem ao stress oxidativo cutâneo, sendo que a exposição à radiação solar é sem dúvida o que apresenta o papel mais relevante. As radiações UVA e UVB e mesmo a radiação IV estão envolvidas na geração de espécies reactivas, embora por mecanismos distintos, não estando ainda totalmente elucidado o papel da radiação visível. As estratégias de protecção dos efeitos nocivos da radiação solar residem em grande medida no uso de protectores solares. No entanto, vários protectores conduzem *per si* à formação de ROS e de RNS devido à sua fotodegradação ou não asseguram uma prevenção eficaz do stress oxidativo. O uso de antioxidantes, administrados por via cutânea ou oral, afigura-se como uma possível estratégia de minimização da formação de ROS e RNS secundária à exposição ao sol, tendo sido investigados vários compostos e suas associações. Os polifenóis constituem um dos grupos químicos mais estudados com este propósito, estando amplamente descritas as suas propriedades antioxidantes. A flora portuguesa compreende inúmeras espécies vegetais em cuja composição foram identificados este tipo de compostos fenólicos. Frequentemente, algumas partes das plantas ricas em polifenóis não possuem interesse industrial e constituem resíduos não valorizados da indústria agrícola ou alimentar. Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivos primordiais a obtenção de extractos a partir de plantas da flora portuguesa (*J. regia*, *E. globulus*, *C. sativa*, *Q. robur*, *O. europaea*, *F. carica*, *P. persica*, *P. avium*, *H. androsaemum*) com actividade antioxidante e o desenvolvimento de um sistema semi-sólido que assegure a estabilidade e a eficácia do extracto antioxidante nela incorporado. Considerando a perspectiva do uso dos extractos em medicamentos ou em produtos cosméticos e de higiene corporal, a sua preparação efectuou-se com solventes de baixa toxicidade cutânea, nomeadamente a água, o etanol e misturas hidroalcoólicas (EtOH 40° e EtOH 70°). Estas misturas (EtOH 40° e EtOH 70°) foram as que, regra geral, permitiram a obtenção de extractos com actividade antioxidante mais elevada, determinada pelo ensaio de avaliação da actividade captadora do radical DPPH. Os extractos que apresentaram actividade antioxidante mais elevada (IC₅₀ inferior a 50 µg/ml) e teores de compostos fenólicos mais elevados (superiores a 150 EAG mg/g de liofilizado) foram os extractos hidroalcoólicos de *J. regia* (EtOH 40°), *C. sativa* (EtOH 70°), *Q. robur* (EtOH 40°) e *H. androsaemum* (EtOH 40°) e o extracto aquoso de *E. globulus*. Verificou-se que os extractos com actividade antioxidante mais elevada não coincidiram integralmente com os que exibiram os teores mais elevados de compostos fenólicos totais (avaliados com o ensaio de Folin Ciocalteu), o que sugere a contribuição de compostos não fenólicos para a actividade antioxidante. Foi possível estabelecer um

método extractivo comum para as cinco plantas em estudo, conduzido a 40 °C e constituído por cinco etapas extractivas, cada uma com a duração de 10 min, que se revelou, na generalidade, favorável à obtenção de extractos com actividade antioxidante mais elevada.

Todos os extractos seleccionados exibiram efeito captador das espécies $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\text{ROO}^\bullet$, $\text{NO}^\bullet$ e ONOO^- . No entanto, só os extractos de *C. sativa*, *Q. robur* e *H. androsaemum* exibiram efeitos captadores de $^1\text{O}_2$ superiores a 50 %. Com base neste resultado e na potência da acção antioxidante foram seleccionados os extractos de *C. sativa* e *Q. robur* como os melhores candidatos a antioxidantes de aplicação cutânea. A discriminação dos dois extractos efectuou-se com ensaios complementares tais como a avaliação da actividade quelante de ferro, a avaliação do potencial redox e a avaliação do potencial irritante cutâneo. Os extractos exibiram valores de potencial redox semelhantes e ambos apresentaram actividade quelante de ferro, tendo o extracto de *C. sativa* o valor mais baixo de IC_{50} . Estudos conduzidos em voluntários humanos revelaram que nenhum dos extractos (em dispersão aquosa a 5 % m/V) apresentou efeito irritante cutâneo (num estudo de aplicação única sob oclusão), o que constitui um importante dado quanto à segurança dos extractos em estudo. Relativamente à composição fenólica, verificou-se que os dois extractos possuem na sua composição ácidos fenólicos e flavonóides, os quais poderão ser os responsáveis pela actividade antioxidante evidenciada. O extracto que foi seleccionado para incorporação num sistema semi-sólido foi o de *C. sativa*, em virtude do seu maior efeito quelante de ferro e de uma mais completa caracterização da composição fenólica. O método extractivo usado para a preparação do extracto de *C. sativa* revelou uma boa reprodutibilidade, um atributo crítico para a qualidade do produto final.

Estudos de pré-formulação evidenciaram uma dependência da estabilidade funcional do extracto (avaliada pela actividade captadora do radical DPPH ao longo de três meses) da temperatura e do pH. O extracto de castanheiro apresentou-se mais estável a pH 5 do que a pH 7,1, o que tem implicações na selecção do pH do produto final. A glicerina (85 % m/m) demonstrou ser o solvente que assegurou a maior estabilidade do extracto de *C. sativa*, mesmo à temperatura de 40 °C, sendo este resultado favorável à incorporação deste poliol na preparação a desenvolver. A formulação de uma preparação semi-sólida foi orientada para a obtenção de um sistema com pH compreendido entre 4,5 e 5, estável do ponto de vista físico e microbiológico e que assegurasse a estabilidade funcional do extracto vegetal incorporado. Foi também opção a dispensa de agentes tensioactivos e um efeito hidratante cutâneo. A escolha recaiu num hidrogel hidroglicérico de Carbopol® com uma fase lipófila incorporada. Os resultados obtidos no estudo de optimização (avaliados com a metodologia das

superfícies de resposta) demonstraram a dependência da firmeza da preparação obtida do conteúdo de parafina líquida e de glicerina, tendo influência mais pronunciada a quantidade de fase lipófila. A preparação apresentou-se estável à centrifugação, o que evidencia que a ausência de agentes emulsivos não comprometeu a estabilidade física da preparação. A estabilidade funcional da preparação com o extracto de *C. sativa* incorporado demonstrou ser independente da composição quantitativa de glicerina e de parafina líquida. A preparação foi formulada com 13 % de parafina líquida e 27 % de glicerina (85 % m/m), tendo sido adicionado um pigmento branco para correcção da cor, o qual demonstrou não influenciar a firmeza. Optou-se por uma concentração de 0,5 % m/m de dióxido de titânio, de modo a minimizar o efeito branqueador da pele pós-aplicação. O pH e a concentração de Carbopol® foram ajustados de modo a ser obtida uma preparação semi-sólida de fácil espalhabilidade, com adesividade residual moderada e estável. A preparação final foi submetida a um conjunto de testes preliminares de estabilidade que evidenciaram bons indicadores. Estudos conduzidos durante seis meses a 20 °C evidenciaram resultados positivos no que respeita à estabilidade física e funcional da formulação desenvolvida, bem como uma adequada qualidade microbiológica. O processo de fabrico apresentou uma boa reprodutibilidade, característica favorável do ponto de vista da sua produção industrial. À temperatura de 40 °C notaram-se alterações de cor, da firmeza e da actividade antioxidante, o que sugere a necessidade de se efectuarem recomendações relativas às condições de conservação do produto final. Além da estabilidade evidenciada, o sistema semi-sólido apresentou *in vivo* um efeito hidratante notório, que se prolongou por pelo menos quatro horas após a aplicação. Este efeito hidratante, embora não directamente relacionado com a eficácia antioxidante, é um importante atributo para contrariar a acção dessecante provocada pela exposição excessiva ao sol e poderá contribuir para uma boa aceitabilidade do sistema desenvolvido.

Para a caracterização da preparação efectuaram-se também ensaios de calorimetria diferencial de varrimento que revelaram que a incorporação do extracto de *C. sativa* teve como efeito um aumento da temperatura de indução da oxidação da preparação, o que permite inferir que o extracto exibiu actividade antioxidante mesmo na presença dos outros constituintes. Estruturalmente, o sistema é constituído por gotículas de parafina líquida, de forma aproximadamente esférica, incorporadas numa fase externa gelificada, onde estão dispersas as partículas de dióxido de titânio. Estudos de CryoSEM evidenciaram a continuidade da estrutura da rede polimérica de Carbopol® e a ligação íntima entre as duas fases, provavelmente responsável pela estabilidade do sistema formado.

No futuro, afigura-se importante avaliar, em humanos, a actividade antioxidante da preparação desenvolvida, nomeadamente pela quantificação de marcadores do stress oxidativo cutâneo ou pelo recurso a técnicas espectroscópicas, usando como fonte de radiação a luz solar simulada. O desenvolvimento galénico, na perspectiva de incrementar a estabilidade térmica da formulação, e a caracterização mais detalhada da composição do extracto de *C. sativa* constituem estudos que poderão dar continuidade ao trabalho desenvolvido nesta tese. Estima-se que a associação dos extractos antioxidantes com protectores solares origine uma potenciação da protecção face à radiação solar. A relação de diversas dermatoses com o stress oxidativo cutâneo perspectiva a relevância do estudo da formulação desenvolvida na terapêutica. Será também relevante explorar o uso da preparação-base desenvolvida para incorporação de outros extractos cuja actividade antioxidante foi demonstrada neste estudo.

A presente tese constituiu uma abordagem transdisciplinar dedicada ao desenvolvimento de um sistema semi-sólido para uso cutâneo que incorpora um extracto de *C. sativa* com propriedades antioxidantes, onde foram caracterizados parâmetros de qualidade, segurança e eficácia.

Referências bibliográficas

- [1] Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 10:5-12.
- [2] Schroeder P, Krutmann J. Environmental oxidative stress-Environmental Sources of ROS In: Hutzinger O, ed. *Reactions, Processes Oxidants and Antioxidant Defense Systems.* Berlin/Heidelberg: Springer; 2004. p. 19-31.
- [3] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.
- [4] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142:231-55.
- [5] Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989;70:737-57.
- [6] Droge W. Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2003;543:191-200.
- [7] Nishigori C, Hattori Y, Arima Y, Miyachi Y. Photoaging and oxidative stress. *Exp Dermatol.* 2003;12 Suppl 2:18-21.
- [8] Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health.* 1991;111:172-7.
- [9] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.
- [10] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* 2004;7:97-110.
- [11] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160:1-40.
- [12] Griending KK, Fitzgerald GA. Oxidative Stress and cardiovascular injury Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;108:1912-6.
- [13] Griffiths HR. ROS as signalling molecules in T cells - Evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. *Redox Rep.* 2005;10:273-80.
- [14] Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 β -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: Implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol.* 2003;19:203-14.

- [15] Manton KG, Volovik S, Kulminski A. ROS effects on neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders: on environmental stresses of ionizing radiation. *Curr Alzheimer Res.* 2004;1:277-93.
- [16] Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain and Nerve.* 2008;60:157-70.
- [17] Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780:1362-7.
- [18] Shimosawa T, Yatomi Y, Miyamoto Y, Kaneko T, Matsui H, Uetake Y, Wang H, Mu S, Saito R, Ogura S, Fujita T. Atherosclerosis and oxidative stress. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 2008;45:287-90.
- [19] Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res.* 2006;45:466-86.
- [20] Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* 2007;583:9-24.
- [21] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:343-53.
- [22] <http://health.allrefer.com/pictures-images/skin-layers.html>. [Acedido em 06-04-09]
- [23] Nogueira Prista L, Guedes Bahia MF, Vilar E. *Dermofarmácia e Cosmética*. Lisboa: Associação Nacional das Farmácias; 1992.
- [24] <http://www.eucerin.co.uk/skin2/epidermis.asp>. [Acedido em 06-04-09]
- [25] Cordero AA. *Biología de la piel*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1996.
- [26] Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K, Schmidt HH, Schmidt R. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1000-9.
- [27] Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92:3007-17.
- [28] Stief TW. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses.* 2003;60:567-72.
- [29] Minami Y, Yokoyama K, Bando N, Kawai Y, Terao J. Occurrence of singlet oxygen oxygenation of oleic acid and linoleic acid in the skin of live mice. *Free Radic Res.* 2008;42:197-204.

-
- [30] Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19:221-357.
- [31] Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol.* 1998;31:179-86.
- [32] Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:392-403.
- [33] Gerhard Th K. Antioxidative cosmetic additives for the protection of human skin surface lipids against environmental stress. *Lipid - Fett.* 1999;101:343-6.
- [34] Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Terashima T, Nakamura T, Akamatsu H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: Evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol.* 2003;149:248-54.
- [35] Xia Q, Chou MW, Yin JJ, Howard PC, Yu H, Fu PP. Photoirradiation of representative polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve isomeric methylbenz[a]anthracene with UVA light: formation of lipid peroxidation. *Toxicol Ind Health.* 2006;22:147-56.
- [36] Costa C, Pasquale RD, Silvani V, Barbaro M, Catania S. *In vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:324-31.
- [37] Yin L, Morita A, Tsuji T. Skin premature aging induced by tobacco smoking: the objective evidence of skin replica analysis. *J Dermatol Sci.* 2001;27:26-31.
- [38] Suehara LY, Simone K, Maia M. Avaliação do envelhecimento facial relacionado ao tabagismo. *An Bras Dermatol.* 2006;81.
- [39] Yin L, Morita A, Tsuji T. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001;17:178-83.
- [40] Chuang CH, Hu ML. Synergistic DNA damage and lipid peroxidation in cultured human white blood cells exposed to 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and ultraviolet A. *Environ Mol Mutagen.* 2006;47:73-81.
- [41] Cotovio J, Onno L, Justine P, Lamure S, Catroux P. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following *in vitro* ozone exposure. *Toxicol In Vitro.* 2001;15:357-62.
- [42] Thiele JJ, Traber MG, Tsang K, Cross CE, Packer L. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:385-91.

- [43] Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol*. 2005;153:1096-100.
- [44] Bahia MF. *Protecção Solar: Actualização*. Porto: Universidade do Porto; 2003.
- [45] Schroeder P, Haendeler J, Krutmann J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exp Gerontol*. 2008;629-32.
- [46] Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84:450-62.
- [47] Ou-Yang H, Stamatas G, Saliou C, Kollias N. A chemiluminescence study of UVA-induced oxidative stress in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1020-9.
- [48] Herrling T, Jung K, Fuchs J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2006;63:840-5.
- [49] Herrling T, Jung K, Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2008;69:1429-35.
- [50] Sakurai H, Yasui H, Yamada Y, Nishimura H, Shigemoto M. Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. *Photochem Photobiol Sci*. 2005;4:715-20.
- [51] Takeshita K, Chi C, Hirata H, Ono M, Ozawa T. *In vivo* generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:876-85.
- [52] Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206:474-9.
- [53] Baier J, Maisch T, Maier M, Landthaler M, Baumler W. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1498-506.
- [54] Maglio DHG, Paz ML, Ferrari A, Weill FS, Czerniczyniec A, Leoni J, Bustamante J. Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005;21:311-7.
- [55] Lee SC, Lee JW, Jung JE, Lee HW, Chun SD, Kang IK, Won YH, Kim YP. Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. *Br J Dermatol*. 2000;142:653-9.

-
- [56] Seo SJ, Choi HH, Chung HJ, Hong CK. Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines. *Br J Dermatol*. 2002;147:655-62.
- [57] Paz ML, Gonzalez Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008;24:115-22.
- [58] Hanson KM, Clegg RM. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. *Photochem Photobiol*. 2002;76:57-63.
- [59] Paunel AN, Dejam A, Thelen S, Kirsch M, Horstjann M, Gharini P, Mürtz M, Kelm M, de Groot H, Kolb-Bachofen V, Suschek CV. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:606-15.
- [60] Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:128-35.
- [61] Beak SM, Lee YS, Kim JA. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor-kappaB in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie*. 2004;86:425-9.
- [62] Hornig-Do HT, von Kleist-Retzow JC, Lanz K, Wickenhauser C, Kudin AP, Kunz WS, Wiesner RJ, Schauen M. Human epidermal keratinocytes accumulate superoxide due to low activity of Mn-SOD, leading to mitochondrial functional impairment. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1084-93.
- [63] Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2008;128:214-22.
- [64] Wulf HC, Sandby-Moller J, Kobayasi T, Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. *Micron*. 2004;35:185-91.
- [65] Bando N, Hayashi H, Wakamatsu S, Inakuma T, Miyoshi M, Nagao A, Yamauchi R, Terao J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary beta-carotene: an ex vivo study. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:1854-63.
- [66] Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5:215-37.

- [67] Masaki H, Okano Y, Sakurai H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGE) under ultraviolet light A (UVA) irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235:306-10.
- [68] Gibbs NK, Tye J, Norval M. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology. *Photochem Photobiol Sci*. 2008;7:655-67.
- [69] Shen L, Ji HF. Theoretical investigation of the photosensitization mechanisms of urocanic acid. *J Photochem Photobiol B*. 2008;91:96-8.
- [70] Lopez-Alarcon C, Aspee A, Henriquez C, Campos AM, Lissi EA. Interaction and reactivity of urocanic acid towards peroxy radicals. *Redox Rep*. 2005;10:227-34.
- [71] Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother*. 1999;53:181-92.
- [72] Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91:14S-22S.
- [73] Wood JM, Schallreuter KU. A plaidoyer for cutaneous enzymology: our view of some important unanswered questions on the contributions of selected key enzymes to epidermal homeostasis. *Exp Dermatol*. 2008;17:569-78.
- [74] Vessey DA. The cutaneous antioxidant system. In: Packer Fa, ed. *Oxidative stress in dermatology*. Nova Iorque: Marcel Dekker; 1993.p. 81-104.
- [75] Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol*. 1989;93:769-73.
- [76] Shindo Y, Hashimoto T. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *J Dermatol Sci*. 1997;14:225-32.
- [77] Corstjens H, Declercq L, Hellemans L, Sente I, Maes D. Prevention of oxidative damage that contributes to the loss of bioenergetic capacity in ageing skin. *Exp Gerontol*. 2007;42:924-9.
- [78] Rezvani HR, Mazurier F, Cario-Andre M, Pain C, Ged C, Taieb A, de Verneuil H. Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem*. 2006;281:17999-8007.
- [79] Schallreuter KU, Wood JM. Thioredoxin reductase - its role in epidermal redox status. *J Photochem Photobiol B*. 2001;64:179-84.
- [80] Marrot L, Jones C, Perez P, Meunier JR. The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21:79-88.
- [81] Steenvoorden DP, van Henegouwen GM. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B*. 1997;41:1-10.

-
- [82] Thiele JJ. Oxidative targets in the stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14 Suppl 1:87-91.
- [83] Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ, Packer L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic Biol Med*. 1998;24:55-65.
- [84] Herrling T, Fuchs J, Rehberg J, Groth N. UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:59-67.
- [85] Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*. 2003;278:28220-8.
- [86] Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24:345-51.
- [87] Darvin ME, Gersonde I, Albrecht H, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. *In vivo* Raman spectroscopic analysis of the influence of IR radiation on the carotenoid antioxidant substances beta-carotene and lycopene in the human skin. Formation of free radicals. *Laser Phys Lett*. 2007;4:318-21.
- [88] Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84:539-49.
- [89] Nofsinger JB, Liu Y, Simon JD. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2002;32:720-30.
- [90] Geng J, Tang W, Wan X, Zhou Q, Wang XJ, Shen P, Lei TC, Chen XD. Photoprotection of bacterial-derived melanin against ultraviolet A-induced cell death and its potential application as an active sunscreen. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:852-8.
- [91] Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2565-75.
- [92] Marrot L, Meunier JR. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:S139-48.
- [93] Moriwaki S, Takahashi Y. Photoaging and DNA repair. *J Dermatol Sci*. 2008;50:169-76.
- [94] Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Runger TM. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126:667-75.

- [95] de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63:19-27.
- [96] Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21:361-70.
- [97] Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci*. 2000;23 Suppl 1:S22-6.
- [98] Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J. Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion *in vivo* in normal human skin. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1277-83.
- [99] Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem*. 1999;274:15345-9.
- [100] Steeghs MML, Moeskops BWM, van Swam K, Cristescu SM, Scheepers PTJ, Harren FJM. On-line monitoring of UV-induced lipid peroxidation products from human skin *in vivo* using proton-transfer reaction mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*. 2006;253:58-64.
- [101] Dix TA, Aikens J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol*. 1993;6:2-18.
- [102] Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1482-95.
- [103] Dissemond J, Schneider LA, Brenneisen P, Briviba K, Wenk J, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Protective and determining factors for the overall lipid peroxidation in ultraviolet A1-irradiated fibroblasts: *in vitro* and *in vivo* investigations. *Br J Dermatol*. 2003;149:341-9.
- [104] Minami Y, Kawabata K, Kubo Y, Arase S, Hirasaka K, Nikawa T, Bando N, Kawai Y, Terao J. Peroxidized cholesterol-induced matrix metalloproteinase-9 activation and its suppression by dietary β -carotene in photoaging of hairless mouse skin. *J Nutr Biochem*. 2008.
- [105] Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V. Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ*. 2001;8:515-27.
- [106] Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:378-84.

-
- [107] Sander CS, Chang H, Salzmänn S, Müller CS, Ekanayake-Mudiyansele S, Elsner P, Thiele JJ. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*. 2002;118:618-25.
- [108] Widmer R, Ziaja I, Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radic Res*. 2006;40:1259-68.
- [109] Bulteau AL, Moreau M, Nizard C, Friguet B. Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med*. 2002;32:1157-70.
- [110] Au V, Madison SA. Effects of Singlet Oxygen on the Extracellular Matrix Protein Collagen: Oxidation of the Collagen Crosslink Histidinohydroxylysinonorleucine and Histidine. *Arch Biochem Biophys*. 2000;384:133-42.
- [111] Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol*. 2003;78:43-8.
- [112] Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63:41-51.
- [113] Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002;138:1462-70.
- [114] Rijken F, Kiekens RC, van den Worm E, Lee PL, van Weelden H, Bruijnzeel PL. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5:184-9.
- [115] Clydesdale GJ, Dandie GW, Müller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol*. 2001;79:547-68.
- [116] Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002;138:1462-70.
- [117] Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1 β , IL-10, IL-10r, TNF α and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. *Inflamm Res*. 2000;49:290-6.
- [118] Angst MS, Clark JD, Carvalho B, Tingle M, Schmelz M, Yeomans DC. Cytokine profile in human skin in response to experimental inflammation, noxious stimulation, and administration of a COX-inhibitor: A microdialysis study. *Pain*. 2008.

- [119] Averbeck M, Beilharz S, Bauer M, Gebhardt C, Hartmann A, Hochleitner K, Kauer F, Voith U, Simon JC, Termeer C. In situ profiling and quantification of cytokines released during ultraviolet B-induced inflammation by combining dermal microdialysis and protein microarrays. *Exp Dermatol*. 2006;15:447-54.
- [120] Wu S, Gao J, Dinh QT, Chen C, Fimmel S. IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. *Mol Immunol*. 2008;45:2288-96.
- [121] Skiba B, Neill B, Piva TJ. Gene expression profiles of TNF-alpha, TACE, furin, IL-1beta and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005;21:173-82.
- [122] Terui T, Takahashi K, Funayama M, Terunuma A, Ozawa M, Sasai S, Tagami H. Occurrence of neutrophils and activated Th1 cells in UVB-induced erythema. *Acta Derm Venereol*. 2001;81:8-13.
- [123] Tyrrell RM, Reeve VE. Potential protection of skin by acute UVA irradiation--from cellular to animal models. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92:86-91.
- [124] Reeve VE, Tyrrell RM. Heme oxygenase induction mediates the photoimmunoprotective activity of UVA radiation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9317-21.
- [125] Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:517-9.
- [126] Baz K, Cimen MY, Kokturk A, Yazici AC, Eskandari G, Ikizoglu G, Api H, Atik U. Oxidant / antioxidant status in patients with psoriasis. *Yonsei Med J*. 2003;44:987-90.
- [127] Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed Pharmacother*. 2007;61:412-22.
- [128] Er-raki A, Charveron M, Bonafe JL. Increased superoxide anion production in dermal fibroblasts of psoriatic patients. *Skin Pharmacol*. 1993;6:253-8.
- [129] Wojas-Pelc A, Marcinkiewicz J. What is a role of haeme oxygenase-1 in psoriasis? Current concepts of pathogenesis. *Int J Exp Pathol*. 2007;88:95-102.
- [130] Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003;17:663-9.
- [131] Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: Expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med*. 1996;184:2007-12.

-
- [132] Maria Lucia Dell'Anna MP. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2006;19:406-11.
- [133] Siro Passi MGFMASCL. Epidermal Oxidative Stress in Vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1998;11:81-5.
- [134] Dell'Anna ML, Mastrofrancesco A, Sala R, Venturini M, Ottaviani M, Vidolin AP, Leone G, Calzavara PG, Westerhof W, Picardo M. Antioxidants and narrow band-UVB in the treatment of vitiligo: a double-blind placebo controlled trial. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32:631-6.
- [135] Hadshiew I, Sta F, Untiedt S, Bohnsack K, Rippke F, Hölzle E. Effects of topically applied antioxidants in experimentally provoked polymorphous light eruption. *Dermatology.* 1997;195:362-8.
- [136] Rippke F, Wendt G, Bohnsack K, Dorschner A, Stab F, Holzle E, Moll I. Results of photoprovocation and field studies on the efficacy of a novel topically applied antioxidant in polymorphous light eruption. *J Dermatolog Treat.* 2001;12:3-8.
- [137] Lunet N, Marantes I. Epidemiologia do cancro da pele. *FarmAlliance.* 2003;7:19-24.
- [138] Lund LP, Timmins GS. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: controversies and potential resolutions. *Pharmacol Ther.* 2007;114:198-207.
- [139] Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol.* 2004;43:326-35.
- [140] Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: Progress and promise. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:475-510.
- [141] Maier T, Korting HC. Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol.* 2005;18:253-62.
- [142] Forestier S. Rationale for sunscreen development. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58:S133-8.
- [143] Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res.* 2007;17:117-27.
- [144] Autier P, Boniol M, Doré J-F. Sunscreen use and increased duration of intentional sun exposure: Still a burning issue *Int J Cancer.* 2007;121:1-5.
- [145] Diffey BL. Sunscreens and melanoma: the future looks bright. *Br J Dermatol.* 2005;153:378-81.
- [146] Armeni T, Damiani E, Battino M, Greci L, Principato G. Lack of *in vitro* protection by a common sunscreen ingredient on UVA-induced cytotoxicity in keratinocytes. *Toxicology.* 2004;203:165-78.

- [147] Haywood R, Wardman P, Sanders R, Linge C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma? *J Invest Dermatol.* 2003;121:862-8.
- [148] Scalia S, Molinari A, Casolari A, Maldotti A. Complexation of the sunscreen agent, phenylbenzimidazole sulphonic acid with cyclodextrins: effect on stability and photo-induced free radical formation. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22:241-9.
- [149] Scalia S, Simeoni S, Barbieri A, Sostero S. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1553-8.
- [150] Damiani E, Rosati L, Castagna R, Carloni P, Greci L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. *J Photochem Photobiol B.* 2006;82:204-13.
- [151] Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:1205-12.
- [152] Brezova V, Gabcova S, Dvoranova D, Stasko A. Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J Photochem Photobiol B.* 2005;79:121-34.
- [153] Lapidot N, Gans O, Biagini F, Sosonkin L, Rottman C. Advanced sunscreens: UV absorbers encapsulated in sol-gel glass microcapsules. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2003;26:67-72.
- [154] Hanson KM, Clegg RM. Bioconvertible vitamin antioxidants improve sunscreen photoprotection against UV-induced reactive oxygen species. *J Cosmet Sci.* 2003;54:589-98.
- [155] Edlich RF, Winters KL, Lim HW, Cox MJ, Becker DG, Horowitz JH, Nichter LS, Britt LD, Long WB. Photoprotection by sunscreens with topical antioxidants and systemic antioxidants to reduce sun exposure. *J Long Term Eff Med Implants.* 2004;14:317-40.
- [156] Kroyer GT. Antioxidative cosmetic additives for the protection of human skin surface lipids against environmental stress. *Fett/ Lipid.* 1999;101:343-6.
- [157] Halliday GM, Russo PA, Yuen KS, Robertson BO. Effect of inhibitors of oxygen radical and nitric oxide formation on UV radiation-induced erythema, immunosuppression and carcinogenesis. *Redox Rep.* 1999;4:316-8.
- [158] Damiani E, Astolfi P, Cionna L, Ippoliti F, Greci L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. *Free Radic Res.* 2006;40:485-94.
- [159] Chaudhuri RK, Lascu Z, Puccetti G, Deshpande AA, Paknikar SK. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. *Photochem Photobiol.* 2006;82:823-8.

- [160] Russo PA, Halliday GM. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. *Br J Dermatol*. 2006;155:408-15.
- [161] Di Mambro VM, Fonseca MJ. Assessment of physical and antioxidant activity stability, *in vitro* release and *in vivo* efficacy of formulations added with superoxide dismutase alone or in association with alpha-tocopherol. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66:451-9.
- [162] Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y. Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. *J Invest Dermatol*. 1987;89:111-2.
- [163] Declercq L, Sente I, Hellemans L, Corstjens H, Maes D. Use of the synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-134 to compensate for seasonal antioxidant deficiency by reducing pre-existing lipid peroxides at the human skin surface. *Int J Cosmet Sci*. 2004;26:255-63.
- [164] Miyamoto A, Nakamura K, Ohba Y, Kishikawa N, Nakashima K, Kuroda N. Sequential injection analysis with chemiluminescence detection for the antioxidative activity against singlet oxygen. *Anal Sci*. 2006;22:73-6.
- [165] Yoshimura Y, Inomata T, Nakazawa H, Kubo H, Yamaguchi F, Ariga T. Evaluation of free radical scavenging activities of antioxidants with an H(2)O(2)/NaOH/DMSO system by electron spin resonance. *J Agric Food Chem*. 1999;47:4653-6.
- [166] Wang SY, Jiao H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radical's, and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*. 2000;48:5677-84.
- [167] Regoli F, Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;156:96-105.
- [168] Jin GH, Liu Y, Jin SZ, Liu XD, Liu SZ. UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiat Environ Biophys*. 2007;46:61-8.
- [169] Dreher F, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study *in vivo*. *Br J Dermatol*. 1998;139:332-9.
- [170] Dreher F, Denig N, Gabard B, Schwindt DA, Maibach HI. Effect of topical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. *Dermatology*. 1999;198:52-5.

- [171] Lin JY, Selim, M. A., Shea, C. R. ,Grichnik, J. M., Omar, M. M., Monteiro-Riviere, N. A., Pinnell, S. R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48:866-74.
- [172] Burke KE. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. *Dermatol Ther*. 2007;20:314-21.
- [173] Trommer H, Bottcher R, Poppl A, Hoentsch J, Wartewig S, Neubert RH. Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation. *Pharm Res*. 2002;19:982-90.
- [174] Trommer H, Bottcher R, Huschka C, Wohlrab W, Neubert RH. Further investigations on the role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models after UV exposure. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57:963-72.
- [175] Jurkovic P, Sentjurc M, Kristl J, Pecar S, Gasperlin M. Comparison of two ascorbic acid derivatives effectiveness for scavenging ultraviolet-induced free radicals in the skin. *J Drug Deliv Sci Tec*. 2004;14:229-33.
- [176] Jurkovic P, Sentjurc M, Gasperlin M, Kristl J, Pecar S. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003;56:59-66.
- [177] Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, Peus D. Vitamin C derivative ascorbyl palmitate promotes ultraviolet-B-induced lipid peroxidation and cytotoxicity in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1103-8.
- [178] Ochiai Y, Kaburagi S, Obayashi K, Ujiie N, Hashimoto S, Okano Y, Masaki H, Ichihashi M, Sakurai H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. *J Dermatol Sci*. 2006;44:37-44.
- [179] Leveque N, Robin S, Muret P, Mac-Mary S, Makki S, Humbert P. High iron and low ascorbic acid concentrations in the dermis of atopic dermatitis patients. *Dermatology*. 2003;207:261-4.
- [180] Murad S, Tajima S, Johnson GR. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: Effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol*. 1983;81:158-62.
- [181] Espinal-Perez LE, Moncada B, Castanedo-Cazares JP. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *Int J Dermatol*. 2004;43:604-7.
- [182] McVean M, Liebler DC. Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied alpha-tocopherol. *Carcinogenesis*. 1997;18:1617-22.

-
- [183] Yoshida E, Watanabe T, Takata J, Yamazaki A, Karube Y, Kobayashi S. Topical application of a novel, hydrophilic gamma-tocopherol derivative reduces photo-inflammation in mice skin. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1633-40.
- [184] Fuller B, Smith D, Howerton A, Kern D. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids. *J Cosmet Dermatol*. 2006;5:30-8.
- [185] McDaniel DH, Neudecker BA, DiNardo JC, Lewis JA, Maibach II, Maibach HI. Idebenone: a new antioxidant; Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants. *J Cosmet Dermatol*. 2005;4:10-7.
- [186] McDaniel DH, Neudecker BA, DiNardo JC, Lewis II JA, Maibach HI. Clinical efficacy assessment in photodamaged skin of 0.5% and 1.0% idebenone. *J Cosmet Dermatol*. 2005;4:167-73.
- [187] Tournas JA, Lin FH, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Zielinski JE, Pinnell SR. Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamins C and E with ferulic acid. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1185-7.
- [188] Obermuller-Jevic UC, Schlegel B, Flaccus A, Biesalski HK. The effect of betacarotene on the expression of interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV-irradiated human skin fibroblasts *in vitro*. *FEBS Lett*. 2001;509:186-90.
- [189] Obermuller-Jevic UC, Francz PI, Frank J, Flaccus A, Biesalski HK. Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999;460:212-6.
- [190] Andreassi M, Andreassi L. Antioxidants in dermocosmetology: from the laboratory to clinical application. *J Cosmet Dermatol*. 2003;2:153-60.
- [191] Andersen F, Hedegaard K, Petersen TK, Bindlev-Jensen C, Fullerton A, Andersen KE. Comparison of the effect of glycerol and triamcinolone acetonide on cumulative skin irritation in a randomized trial. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:228-35.
- [192] Proença da Cunha A, ed. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian 2005.
- [193] Svobodova A, Psotova J, Walterova D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003;147:137-45.
- [194] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673-751.

- [195] Kandaswami C, Middleton E, Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol.* 1994;366:351-76.
- [196] Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:253-9.
- [197] Soares VC, Varanda EA, Raddi MS. *In vitro* basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:835-8.
- [198] Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, Elmets CA, Katiyar SK. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1480-7.
- [199] Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:425-32.
- [200] Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis.* 2003;24:927-36.
- [201] Chiu AE, Chan JL, Kern DG, Kohler S, Rehmus WE, Kimball AB. Double-blinded, placebo-controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance of photoaging skin. *Dermatol Surg.* 2005;31:855-60.
- [202] Turkoglu M, Cigirgil N. Evaluation of black tea gel and its protection potential against UV. *Int J Cosmet Sci.* 2007;29:437-42.
- [203] Sevin A, Oztas P, Senen D, Han U, Karaman C, Tarimci N, Kartal M, Erdogan B. Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: an experimental study on rats. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21:650-6.
- [204] Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon SB, Park KC. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:235-41.
- [205] Meeran SM, Katiyar S, Elmets CA, Katiyar SK. Silymarin inhibits UV radiation-induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1660-8.
- [206] Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via a decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. *Carcinogenesis.* 2004;25:1459-65.

-
- [207] Bonina F, Puglia C, Tomaino A, Saija A, Mulinacci N, Romani A, Vincieri FF. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. *J Pharm Pharmacol*. 2000;52:1279-85.
- [208] Reuter J, Jocher A, Hornstein S, Mönting JS, Schempp CM. Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema *in vivo*. *Planta Med*. 2007;73:1190-1.
- [209] Spagna G, Tomaino A, Cimino F, Barbagallo RN, Ventura D, Bonina F, Saija A. Chemical analysis and photoprotective effect of an extract of wine from Jacquez grapes. *J Sci Food Agric*. 2002;82:1867-74.
- [210] Cornacchione S, Sadick NS, Neveu M, Talbourdet S, Lazou K, Viron C, Renimel I, de Queral D, Kurfurst R, Schnebert S, Heusele C, Andre P, Perrier E. *In vivo* skin antioxidant effect of a new combination based on a specific *Vitis vinifera* shoot extract and a biotechnological extract. *J Drugs Dermatol*. 2007;6:s8-13.
- [211] Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, Kubota Y. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment Cell Res*. 2003;16:629-38.
- [212] Aziz MH, Afaq F, Ahmad N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochem Photobiol*. 2005;81:25-31.
- [213] Hwang IK, Yoo K-Y, Kim DW, Jeong SJ, Won C-K, Moon W-K, Kim YS, Kwon DY, Won MH, Kim D-W. An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:1181-8.
- [214] Heo MY, Kim SH, Yang HE, Lee SH, Jo BK, Kim HP. Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. *Mutat Res*. 2001;496:47-59.
- [215] Kim YH, Yang HE, Park BK, Heo MY, Jo BK, Kim HP. The extract of the flowers of *Prunus persica*, a new cosmetic ingredient, protects against solar ultraviolet-induced skin damage *in vivo*. *J Cosmet Sci*. 2002;53:27-34.
- [216] Sanchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-Garcia O, Del Bano MJ, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47:386-92.
- [217] Sudel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, Koop U, Sauermann K, Knussman-Hartig E, Moll I, Gercken G, Young AR, Stab F, Wenck

- H, Gallinat S. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol.* 2005;81:581-7.
- [218] Birt DF, Mitchell D, Gold B, Pour P, Pinch HC. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 1997;17:85-91.
- [219] Lin J-Y, Tournas JA, Burch JA, Monteiro-Riviere NA, Zielinski J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24:61-6.
- [220] Wei H, Zhang X, Wang Y, Lebwohl M. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* 2002;185:21-9.
- [221] Middelkamp-Hup MA, Pathak MA, Parrado C, Goukassian D, Rius-Diaz F, Mihm MC, Fitzpatrick TB, Gonzalez S. Oral *Polypodium leucotomos* extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:910-8.
- [222] Siscovick JR, Zapolanski T, Magro C, Carrington K, Prograis S, Nussbaum M, Gonzalez S, Ding W, Granstein RD. *Polypodium leucotomos* inhibits ultraviolet B radiation-induced immunosuppression. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24:134-41.
- [223] Mitani H, Ryu A, Suzuki T, Yamashita M, Arakane K, Koide C. Topical application of plant extracts containing xanthine derivatives can prevent UV-induced wrinkle formation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007; 23:86-94.
- [224] Heinrich U, Neukam K, Tronnier H, Sies H, Stahl W. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr.* 2006;136:1565-9.
- [225] Ozkur MK, Bozkurt MS, Balabanli B, Aricioglu A, Ilter N, Gurer MA, Inaloz HS. The effects of EGb 761 on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in sunburn. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2002;18:117-20.
- [226] Hanamura T, Uchida E, Aoki H. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit on UV-induced pigmentation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72:3211-8.
- [227] Morganti P, Bruno C, Guarneri F, Cardillo A, Del Ciotto P, Valenzano F. Role of topical and nutritional supplement to modifi the oxidative stress. *Int J Cosmet Sci.* 2002;24:331-9.
- [228] Yamada Y, Yasui H, Sakurai H. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin

- of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. *Photochem Photobiol.* 2006;82:1668-76.
- [229] Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, Puglia C, Ventura D, Bonina F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J Ethnopharmacol.* 2002;79:183-91.
- [230] Morquio A, Rivera-Megret F, Dajas F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). *Phytother Res.* 2005;19:486-90.
- [231] Lin JY, Lin FH, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Pinnell SR. Alpha-lipoic acid is ineffective as a topical antioxidant for photoprotection of skin. *J Invest Dermatol.* 2004;123:996-8.
- [232] Sime S, Reeve VE. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol.* 2004;79:193-8.
- [233] Krutmann J. The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92:105-7.
- [234] Kitazawa M, Iwasaki K. Reduction of ultraviolet light-induced oxidative stress by amino acid-based iron chelators. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999;1473:400-8.
- [235] Bissett DL, McBride JF. Synergistic topical photoprotection by a combination of the iron chelator 2-furildioxime and sunscreen. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:546-9.
- [236] Koo SW, Casper KA, Otto KB, Gira AK, Swerlick RA. Iron chelators inhibit VCAM-1 expression in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 2003;120:871-9.
- [237] Ahn SM, Hwang JS, Lee SH. Fructose 1,6-diphosphate alleviates UV-induced oxidative skin damage in hairless mice. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:692-7.
- [238] Lenz H, Schmidt M, Welge V, Schlattner U, Wallimann T, Elsasser HP, Wittern KP, Wenck H, Stab F, Blatt T. The creatine kinase system in human skin: protective effects of creatine against oxidative and UV damage *in vitro* and *in vivo*. *J Invest Dermatol.* 2005;124:443-52.
- [239] Ichihashi M, Ahmed NU, Budiyanto A, Wu A, Bito T, Ueda M, Osawa T. Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *J Dermatol Sci.* 2000;23 Suppl 1:S45-50.
- [240] Bonina F, Puglia C, Avogadro M, Baranelli E, Cravotto G. The topical protective effect of soybean-germ oil against UVB-induced cutaneous erythema: an *in vivo* evaluation. *Arch Pharm (Weinheim).* 2005;338:598-601.

- [241] Trommer H, Neubert RH. Screening for new antioxidative compounds for topical administration using skin lipid model systems. *J Pharm Pharm Sci.* 2005; 8:494-506.
- [242] Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 2002;79:307-13.
- [243] Lin JY, Selim MA, Shea CR, Grichnik JM, Omar MM, Monteiro-Riviere NA, Pinnell SR. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:866-74.
- [244] Lin JY, Selim, M. A., Shea, C. R. ,Grichnik, J. M., Omar, M. M., Monteiro-Riviere, N. A., Pinnell, S. R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:866-74.
- [245] Lin FH, Lin JY, Gupta RD, Tournas JA, Burch JA, Selim MA, Monteiro-Riviere NA, Grichnik JM, Zielinski J, Pinnell SR. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *J Invest Dermatol.* 2005; 125:826-32.
- [246] Pelle E, Muizzuddin N, Mammone T, Marenus K, Maes D. Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999;15:115-9.
- [247] Maia Campos PM, Gianeti MD, Kanashiro A, Lucisano-Valim YM, Gaspar LR. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. *Photochem Photobiol.* 2006;82:683-8.
- [248] Kaur IP, Kapila M, Agrawal R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Res Rev.* 2007.
- [249] Swindells K, Rhodes LE. Influence of oral antioxidants on ultraviolet radiation-induced skin damage in humans. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004;20:297-304.
- [250] Greul AK, Grundmann JU, Heinrich F, Pfitzner I, Bernhardt J, Ambach A, Biesalski HK, Gollnick H. Photoprotection of UV-irradiated human skin: an antioxidative combination of vitamins E and C, carotenoids, selenium and proanthocyanidins. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2002;15:307-15.
- [251] McArdle F, Rhodes LE, Parslew R, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ. UVR-induced oxidative stress in human skin *in vivo*: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1355-62.
- [252] Werninghaus K, Meydani M, Bhawan J, Margolis R, Blumberg JB, Gilchrest BA. Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch Dermatol.* 1994;130:1257-61.

-
- [253] McArdle F, Rhodes LE, Parslew RA, Close GL, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ. Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1270-5.
- [254] Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W. Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr.* 2003;133:98-101.
- [255] Mireles-Rocha H, Galindo I, Huerta M, Trujillo-Hernandez B, Elizalde A, Cortes-Franco R. UVB photoprotection with antioxidants: effects of oral therapy with d-alpha-tocopherol and ascorbic acid on the minimal erythema dose. *Acta Derm Venereol.* 2002;82:21-4.
- [256] Fuchs J, Kern H. Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:1006-12.
- [257] Cesarini JP, Michel L, Maurette JM, Adhoute H, Bejot M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:182-9.
- [258] Placzek M, Gaube S, Kerkmann U, Gilbertz KP, Herzinger T, Haen E, Przybilla B. Ultraviolet B-induced DNA damage in human epidermis is modified by the antioxidants ascorbic acid and D-alpha-tocopherol. *J Invest Dermatol.* 2005;124:304-7.
- [259] Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:45-8.
- [260] Segredos e virtudes das plantas medicinais. Lisboa: Selecções do Reader's Digest; 1983.
- [261] Proença da Cunha A, Silva AP, Roque OR. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2003.
- [262] Proença da Cunha A, Silva AP, Roque OR, Cunha E. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2004.
- [263] Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa: Ministério da Saúde – INFARMED; 2005.
- [264] Plants in cosmetics. Estrasburgo: Conselho da Europa; 2002.
- [265] Conde E, Cadahia E, Garcia-Vallejo MC. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Phytochem Anal.* 1997;8:186-93.
- [266] Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr.* 2005;56:287-91.

- [267] Cadahia E, Conde E, Garcia-Vallejo MC, Fernandez De Simon B. High pressure liquid chromatographic analysis of polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*: Proanthocyanidins, ellagitannins and flavonol glycosides. *Phytochem Anal.* 1997;8:78-83.
- [268] Hou AJ, Liu YZ, Yang H, Lin ZW, Sun HD. Hydrolyzable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. *J Asian Nat Prod Res.* 2000;2:205-12.
- [269] Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Duroux JL. *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: an electronic spin resonance study. *J Agric Food Chem.* 2005;53:282-8.
- [270] Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo Cobianchi R, Vuotto ML, Ferrara L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia.* 2000;71 Suppl 1:S110-6.
- [271] Salminen JP, Roslin T, Karonen M, Sinkkonen J, Pihlaja K, Pulkkinen P. Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J Chem Ecol.* 2004;30:1693-711.
- [272] Amaral JS, Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Pereira JA, Ferreres F. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chem.* 2004;88:373-9.
- [273] Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentao P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:2287-95.
- [274] Oliveira Feijão R. *Medicina pelas plantas*. Lisboa: Livraria Progresso Editora; 1986.
- [275] Henning W, Herrmann K. Flavonol tetraglycosides from the leaves of *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Phytochemistry.* 1980;19:2727-9.
- [276] PDR for Herbal Medicines. Nova Jersey: Medical Economics Company; 1998.
- [277] Telles Palhinha R. *Flora de Portugal*. Lisboa: Bertrand; 1939.
- [278] Teixeira DM, Patao RF, Coelho AV, da Costa CT. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *J Chromatogr A.* 2006;1103:22-8.
- [279] Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000;68:457-62.
- [280] Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules.* 2007;12:1153-62.

-
- [281] Pieroni A, Heimler D, Pieters L, van Poel B, Vlietinck AJ. *In vitro* anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie*. 1996;51:765-8.
- [282] Meirinhos J, Silva BM, Valentao P, Seabra RM, Pereira JA, Dias A, Andrade PB, Ferreres F. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. *Nat Prod Res*. 2005;19:189-95.
- [283] de Laurentis N, Stefanizzi L, Milillo MA, Tantillo G. Flavonoids from leaves of *Olea europaea* L. cultivars. *Ann Pharm Fr*. 1998;56:268-73.
- [284] Liakopoulos G, Stavrianakou S, Karabourniotis G. Analysis of epicuticular phenolics of *prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata. *Ann Bot*. 2001;87:641-8.
- [285] Costa AF. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1977.
- [286] Valentão P, Dias A, Ferreira M, Silva B, Andrade PB, Bastos ML, Seabra RM. Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Nat Prod Res*. 2003;17:135-40.
- [287] Dias ACP, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from *in vivo* and *in vitro* biomass of *Hypericum* species. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 1999;22:215-27.
- [288] Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
- [289] Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000;48:3597-604.
- [290] Harborne JB. General procedures and measurement of total phenols. In: Harborne JB, Dey, P.M., ed. *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press 1989. p. 87-112.
- [291] George S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*. 2005;53:1370-3.
- [292] Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng*. 2007;81:200-8.
- [293] Madhujith T, Shahidi F. Optimization of the extraction of antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidant properties. *J Agric Food Chem*. 2006;54:8048-57.
- [294] Nepote V, Grosso NR, Guzmán CA. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *J Sci Food Agric*. 2005;85:33-8.

- [295] Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Sep Purif Technol.* 2007; 55:217-25.
- [296] Luthria DL, Mukhopadhyay S, Kwansa AL. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *J Sci Food Agric.* 2006;86:1350-8.
- [297] Costa AF. *Farmacognosia*. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2000.
- [298] Nogueira Prista L, Correia Alves A, Morgado R. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1981.
- [299] Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez M, Sineiro J, Dominguez H, Núñez MJ, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem Toxicol.* 2001;73:145-71.
- [300] Larrauri JA, Ruperez P, Saura-Calixto F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J Agric Food Chem.* 1997;45:1390-3.
- [301] Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, Perry NB. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chem.* 2007;101:1417-24.
- [302] Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng.* 2007;81:236-42.
- [303] Hinneburg I, Neubert RH. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *J Agric Food Chem.* 2005;53:3-7.
- [304] Fernandes E, Toste SA, Lima JL, Reis S. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:1008-17.
- [305] Costa D, Gomes A, Reis S, Lima JL, Fernandes E. Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 2005;76:2841-8.
- [306] Fernandes E, Costa D, Toste SA, Lima JL, Reis S. *In vitro* scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1895-905.
- [307] Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987;165:215-9.

-
- [308] Aruoma OI, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochem J.* 1987;241:273-8.
- [309] Aruoma OI, Halliwell B. The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica.* 1988;18:459-70.
- [310] Parij N, Nagy AM, Neve J. Linear and non linear competition plots in the deoxyribose assay for determination of rate constants for reaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with hydroxyl radicals. *Free Radic Res.* 1995;23:571-9.
- [311] Costa D, Fernandes E, Santos JL, Pinto DC, Silva AM, Lima JL. New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387:2071-81.
- [312] Fernandes E, Gomes A, Costa D, Lima JL. Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species. *Life Sci.* 2005;77:1983-92.
- [313] Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1994;16:149-56.
- [314] Silva BM, Andrade PB, Ferreres F, Domingues AL, Seabra RM, Ferreira MA. Phenolic profile of quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller) (pulp and peel). *J Agric Food Chem.* 2002;50:4615-8.
- [315] Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem.* 2000;48:5512-6.
- [316] Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol Cell Biochem.* 2003;247:205-10.
- [317] Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:753-8.
- [318] Aaby K, Hvattum E, Skrede G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2004;52:4595-603.
- [319] Foley S, Navaratnam S, McGarvey DJ, Land EJ, Truscott TG, Rice-Evans CA. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1202-8.
- [320] Kim AR, Zou YN, Park TH, Shim KH, Kim MS, Kim ND, Kim JD, Bae SJ, Choi JS, Chung HY. Active components from *Artemisia iwayomogi* displaying ONOO(-) scavenging activity. *Phytother Res.* 2004;18:1-7.

- [321] Gerhauser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauf J, Liu GY, Sitthimonchai S, Frank N. Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003;523-524:163-72.
- [322] Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2004;52:5032-9.
- [323] Aboul-Enein HY, Kruk I, Kladna A, Lichtszeld K, Michalska T. Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers.* 2007;86:222-30.
- [324] Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK, Jung HA. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother Res.* 2002;16:232-5.
- [325] Marzouk MS, Moharram FA, Haggag EG, Ibrahim MT, Badary OA. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytother Res.* 2006;20:200-5.
- [326] Cos P, Rajan P, Vedernikova I, Calomme M, Pieters L, Vlietinck AJ, Augustyns K, Haemers A, Vanden Berghe D. *In vitro* antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radic Res.* 2002;36:711-6.
- [327] Benkeblia N. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Braz Arch Biol Technol.* 2005;48:753-9.
- [328] Nagai S, Ohara K, Mukai K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J Phys Chem B.* 2005;109:4234-40.
- [329] van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214:755-9.
- [330] Santos MR, Mira L. Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine. *Free Radic Res.* 2004;38:1011-8.
- [331] Draelos ZD. Botanicals as topical agents. *Clin Dermatol.* 2001;19:474-7.
- [332] Yarnell E, Ballen K. Botanical medicines for dermatologic conditions. *Altern Complement Ther.* 1999;5:106-9.
- [333] Plants in cosmetics. Estrasburgo: Conselho da Europa; 2001.
- [334] Patri G, Crippa F. Functional phytocosmetics: A european reality. *Boll Chim Farm.* 1991;130:247-55.
- [335] Saito ST, Gosmann G, Saffi J, Presser M, Richter MF, Bergold AM. Characterization of the constituents and antioxidant activity of Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 cultivar) extracts. *J Agric Food Chem.* 2007;55:9409-14.
- [336] Genena AK, Hense H, Smânia Jr A, De Souza SM. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of

- extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008;28:463-9.
- [337] Ho KY, Tsai CC, Chen CP, Huang JS, Lin CC. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001;15:127-30.
- [338] El-Agbar ZA, Shakya AK, Khalaf NA, Al-Haroon M. Comparative antioxidant activity of some edible plants. *Turk J Biol.* 2008;32:193-6.
- [339] Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:391-400.
- [340] Silva MM, Santos MR, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic Res.* 2002;36:1219-27.
- [341] Bors W, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:57-69.
- [342] Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine.* 2001;8:401-9.
- [343] de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr.* 2008;47 Suppl 2:51-9.
- [344] Gilbert B, Alves LF. Synergy in plant medicines. *Curr Med Chem.* 2003;10:13-20.
- [345] Almeida IF, Fernandes E, Lima JL, Valentao P, Andrade PB, Seabra RM, Costa PC, Bahia MF. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *J Med Food.* 2009;12:175-83.
- [346] Polla AS, Polla LL, Polla BS. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev.* 2003;2:25-37.
- [347] Mitani H, Koshiishi I, Sumita T, Imanari T. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. *Eur J Pharmacol.* 2001;411:169-74.
- [348] Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP. Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol.* 1991;54:215-23.
- [349] Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. *Chem Pharm Bull.* 2001;49:747-51.

- [350] Yakovleva KE, Kurzeev SA, Stepanova EV, Fedorova TV, Kuznetsov BA, Koroleva OV. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Appl Biochem Microbiol.* 2007;43:661-8.
- [351] Woods B, Calnan CD. Toxic woods. *Br J Dermatol.* 1976;94:1-97.
- [352] Agner T, Held E, West W, Gray J. Evaluation of an experimental patch test model for the detection of irritant skin reactions to moisturisers. *Skin Res Technol.* 2000;6:250-4.
- [353] Basketter DA, Chamberlain M, Griffiths HA, Rowson M, Whittle E, York M. The classification of skin irritants by human patch test. *Food Chem Toxicol.* 1997;35:845-52.
- [354] Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994;315:161-9.
- [355] De Souza D, Machado SAS, Avaca LA. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Quim Nova.* 2003;26:81-9.
- [356] Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 2008;613:1-19.
- [357] Agner T, Serup J. Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions--clinical evaluation and quantification by bioengineering methods. *Clin Exp Dermatol.* 1990;15:29-33.
- [358] Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, Serup J. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1997;37:53-69.
- [359] Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact dermatitis.* 1996;35:1-10.
- [360] Pinnagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1990;22:164-78.
- [361] Basketter D, Reynolds F, Rowson M, Talbot C, Whittle E. Visual assessment of human skin irritation: a sensitive and reproducible tool. *Contact Dermatitis.* 1997;37:218-20.

- [362] Jibry N, Murdan S. *In vivo* investigation, in mice and in man, into the irritation potential of novel amphiphilic gels being studied as transdermal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:107-19.
- [363] ICH, 1996. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
- [364] Marquele-Oliveira F, Fonseca YM, de Freitas O, Fonseca MJ. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and *in vivo* studies. *Int J Pharm.* 2007;342:40-8.
- [365] Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jr., Jabor JR, Santos AC, Fonseca MJ. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7:E10.
- [366] Vile GF, Tyrrell RM. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:721-30.
- [367] Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:6751-6.
- [368] Bissett DL, Oelrich DM, Hannon DP. Evaluation of a topical iron chelator in animals and in human beings: short-term photoprotection by 2-furildioxime. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31:572-8.
- [369] Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem.* 2002;92:105-11.
- [370] Rios JL, Bas E, Recio MC. Effects of natural products on contact dermatitis. *Curr Med Chem: Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents.* 2005;4:65-80.
- [371] Thomson KF, Wilkinson SM. Allergic contact dermatitis to plant extracts in patients with cosmetic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2000;142:84-8.
- [372] Paulsen E. Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis.* 2002;47:189-98.
- [373] Ortiz KJ, Yiannias JA. Contact dermatitis to cosmetics, fragrances, and botanicals. *Dermatol Ther.* 2004;17:264-71.
- [374] Lim H, Park H, Kim HP. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. *Arch Pharm Res.* 2004;27:442-8.
- [375] Gao J, Sanchez-Medina A, Pendry BA, Hughes MJ, Webb GP, Corcoran O. Validation of a HPLC method for flavonoid biomarkers in skullcap (*Scutellaria*) and

- its use to illustrate wide variability in the quality of commercial tinctures. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11:77-87.
- [376] Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jr., Borin MF, Lopez RF, Fonseca MJ. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *Int J Pharm.* 2007;328:183-90.
- [377] Friedman M, Jurgens HS. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000;48:2101-10.
- [378] Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20:3229-35.
- [379] van der Sluis AA, Dekker M, van Boekel MA. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *J Agric Food Chem.* 2005;53:1073-80.
- [380] Handbook of pharmaceutical excipients Londres; Washington: Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association; 2005
- [381] Proniuk S, Blanchard J. Anhydrous Carbopol polymer gels for the topical delivery of oxygen/water sensitive compounds. *Pharm Dev Technol.* 2002;7:249-55.
- [382] Lodén M, Wessman W. The influence of a cream containing 20% glycerin and its vehicle on skin barrier properties *Int J Cosmet Sci.* 2001;23:115-9.
- [383] Rawlings AV, Canestrari DA, Dobkowski B. Moisturizer technology versus clinical performance. *Dermatol Ther.* 2004;17 Suppl 1:49-56.
- [384] Semkina OA. Ointments, gels, liniments, and creams containing phytopreparations (A review). *Pharm Chem J.* 2005;39:369-74.
- [385] Gebre-Mariam T, Asres K, Getie M, Endale A, Neubert R, Schmidt PC. *In vitro* availability of kaempferol glycosides from cream formulations of methanolic extract of the leaves of *Melilotus elegans*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60:31-8.
- [386] Walters KA, Brain KA. Dermatological Formulation and Transdermal Systems. In: Dekker M, ed. *Dermatological and Transdermal Formulations.* Nova Iorque,/Basel: Marcel Dekker; 2002. p. 319-400.
- [387] Lim SH, Kim SM, Lee YW, Ahn KJ, Choe YB. Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation-induced photodamage in Koreans. *Skin Res Technol.* 2008;14:93-102.
- [388] Tagami H. Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Arch Dermatol Res.* 2007.
- [389] Almeida IF, Gaio AR, Bahia MF. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: Comparison with other topical formulations *J Sens Stud.* 2008; 23:92-113.

- [390] Schwarz K, Huang SW, German JB, Tiersch B, Hartmann J, Frankel EN. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J Agric Food Chem*. 2000;48:4874-82.
- [391] Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1925-41.
- [392] Turkoglu M, Pekmezci E, Sakr A. Evaluation of irritation potential of surfactant mixtures. *Int J Cosmet Sci*. 1999;21:371-82.
- [393] Gabard B, Chatelain E, Bieli E, Haas S. Surfactant irritation: *In vitro* corneorosurfametry and *in vivo* bioengineering. *Skin Res Technol*. 2001;7:49-55.
- [394] Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:747-58.
- [395] Sakai T. Surfactant-free emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2008;13:228-35.
- [396] Rodríguez-Abreu C, Lazzari M. Emulsions with structured continuous phases. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2008;13:198-205.
- [397] Fernández-Montes EA. Técnicas y procedimientos em formulación magistral e dermatológica Madrid: E. Aliá; 2005.
- [398] Tiwari BK, Muthukumarappan K, O'Donnell CP, Cullen PJ. Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT-Food Sci Technol*. 2008;41:1876-83.
- [399] Deshpande RP, Chinnan MS, McWatters KH. Optimization of a chocolate-flavored, peanut-soy beverage using response surface methodology (RSM) as applied to consumer acceptability data. *LWT-Food Sci Technol*. 2008;41:1485-92.
- [400] Wang L, Liu L, Holmes J, Huang J, Kerry JF, Kerry JP. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of whey protein isolate-based films using response surface methodology. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:787-96.
- [401] Claeys-Bruno M, Lamant J, Blasco L, Phan-Tan-Luu R, Sargent M. Development of a skin care formulation using experimental designs. *Chemom Intell Lab Syst*. 2008.
- [402] Moulai Mostefa N, Hadj Sadok A, Sabri N, Hadji A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modelling. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28:211-8.
- [403] Lewis G, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. Pharmaceutical experimental design. Nova Iorque; Basel: Marcel Dekker; 1999.
- [404] Cannell JS. Fundamentals of stability testing. *Int J Cosmet Sci*. 1985;7:291-303.

- [405] Blank IH. Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1952;18:433-40.
- [406] Black D, Del Pozo A, Lagarde JM, Gall Y. Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Res Technol.* 2000;6:70-6.
- [407] Kim E, Nam GW, Kim S, Lee H, Moon S, Chang I. Influence of polyol and oil concentration in cosmetic products on skin moisturization and skin surface roughness. *Skin Res Technol.* 2007;13:417-24.
- [408] Berardesca E, Masson P, Rodrigues L, Berardesca E, Gummer CL, Leïveï,que JL, Loden M, Pielïard G, Rogiers V, Salter D, Sauermann G, Serup J, Trevethan MA. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: Electrical methods. *Skin Res Technol.* 1997;3:126-32.
- [409] Kim JY, Song JY, Lee EJ, Park SK. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid Polym Sci.* 2003;281:614-23.
- [410] Jones DS, Lawlor MS, Woolfson AD. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): rheological and mathematical interpretation of textural parameters. *J Pharm Sci.* 2002;91:2090-101.
- [411] Jones DS, Muldoon BC, Woolfson AD, Sanderson FD. An examination of the rheological and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) organogels designed as platforms for local drug delivery to the oral cavity. *J Pharm Sci.* 2007; 96:2632-46.
- [412] Bonacucina G, Martelli S, Palmieri GF. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. *Int J Pharm.* 2004; 282:115-30.
- [413] Islam MT, Rodriguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm Res.* 2004;21:1192-9.
- [414] Fresno Contreras MJ, Ramírez Diéguez A, Jiménez Soriano MM. Rheological characterization of hydroalcoholic gels - 15% ethanol - of Carbopol® Ultrez10. *Farmaco.* 2001;56:437-41.
- [415] Curran SJ, Hayes RE, Afacan A, Williams MC, Tanguy PA. Properties of carbopol solutions as models for yield-stress fluids. *J Food Sci.* 2002;67:176-80.
- [416] Sasutjarit R, Sirivat A, Vayumhasuwan P. Viscoelastic properties of Carbopol 940 gels and their relationships to piroxicam diffusion coefficients in gel bases. *Pharm Res.* 2005;22:2134-40.

- [417] Bouftira I, Abdelly C, Sfar S. Characterization of cosmetic cream with *Mesembryanthemum crystallinum* plant extract: influence of formulation composition on physical stability and anti-oxidant activity. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30:443-52.
- [418] Di Mambro VM, Fonseca MJ. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37:287-95.
- [419] Singh MV, Dias LO, Baldini NLF, Silveira D, Zago E. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extracto aquoso de camomila para uso bucal. *Rev Bras Farm.* 2008;89:134-7.
- [420] Welin-Berger K, Neelissen JA, Bergenstahl B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13:309-18.
- [421] das Neves J, da Silva MV, Goncalves MP, Amaral MH, Bahia MF. Rheological properties of vaginal hydrophilic polymer gels. *Curr Drug Deliv.* 2009;6:83-92.
- [422] Barnes HA, Hutton JF, Walters K. An introduction to rheology. Elsevier; 1989.
- [423] Roso A, Brinet R. Rheology and texture analysis used together to improve raw materials choices. *Cosmet Toil.* 2004;119:53-60.
- [424] Fluhr JW, Darlenski R, Surber C. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol.* 2008;159:23-34.

ANEXOS

Anexo I – Listagem de matérias-primas e reagentes

Matérias-primas e reagentes	Origem
AAPH	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
Acetato de sódio	Merck, Darmstadt, Alemanha
Ácido acético glacial	Pronalab, Lisboa, Portugal
Ácido ascórbico	Merck, Darmstadt, Alemanha
Ácido clorídrico	Panreac, Barcelona, Espanha
Ácido clorogénico	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Ácido elágico	Extrasynthèse, Genay, França
Ácido gálhico	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Ácido tiobarbitúrico	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Ácido tricloroacético	Panreac, Barcelona, Espanha
Bicarbonato de sódio	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Carbopol® 940	J.M. Vaz Pereira S.A., Sintra, Portugal
Cloreto de ferro (II) tetrahidratado	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Cloreto de potássio	J.M. Vaz Pereira S. A., Sintra, Portugal
Cloreto de sódio	J.M. Vaz Pereira S.A., Sintra, Portugal
Cloreto férrico	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Cloridrato de quinina	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
DAF-2	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Desoxiribose	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Dihidrodamina 123	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Dimetilformamida	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Dimetilsulfóxido	Merck, Darmstadt, Alemanha
Dióxido de titânio	J.M. Vaz Pereira S.A., Sintra, Portugal
DPPH	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
EDTA sal dissódico (Titrplex® III)	Merck, Darmstadt, Alemanha

Matérias-primas e reagentes	Origem
Ferrozina	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Fluoresceína	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Fosfato dissódico	Merck, Darmstadt, Alemanha
Fosfato trissódico	Merck, Darmstadt, Alemanha
Glicerina (85 % m/m)	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
Hidrogenofosfato de potássio	Merck, Darmstadt, Alemanha
Hidróxido de potássio	Carlo Erba, Ródano, Itália
Hidróxido de sódio	Merck, Darmstadt, Alemanha
Hiperósido	Extrasynthèse, Genay, França
Histidina	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Alemanha
Lucigenina	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
Manitol	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Metanol	Merck, Darmstadt, Alemanha
Metilparabeno	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
NADH	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
NBT	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
NOC-5	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Parafina líquida	J.M. Vaz Pereira S. A., Sintra, Portugal
PMS	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Quercetina	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Quercitrina	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Reagente de Folin Ciocalteu	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Rutina	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA
Solução de H ₂ O ₂ a 30 %	Merck, Darmstadt, Alemanha
Sulfato de laurilo e sódio (99%)	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
Trietanolamina	J.M. Vaz Pereira S. A., Sintra, Portugal
Tris(hidroximetil)aminometano	Merck, Darmstadt, Alemanha

Matérias-primas e reagentes	Origem
Trolox	Fluka Chemie, Buchs, Suíça
α -tocoferol	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, EUA

Anexo II – Termos de aceitação**Termo de aceitação de participação voluntária em estudo do potencial irritante cutâneo dos extractos de *Castanea sativa* e *Quercus robur*****Nome:****Sexo:****Nº:****Data de nascimento:**

Declaro que fui informado acerca das condições e do objectivo do presente estudo, das instruções a cumprir pelos voluntários e dos possíveis riscos associados com o uso dos produtos em avaliação.

Fui informado da possibilidade de desistência, sem qualquer penalização.

Estou ciente de que os dados obtidos neste estudo serão registados e poderão ser publicados numa revista científica, sendo contudo mantido o anonimato dos voluntários.

Declaro que concordo em participar no estudo e em cumprir as instruções que me foram fornecidas.

I have been informed of the nature and purposes of this trial and the instructions which volunteers must follow, together with possible risks associated with the use of the products tested.

I have been informed that I may withdraw my consent at any time, and that such withdrawal will involve no penalty.

I am aware that the results of this study may be published in a scientific journal and that my identity will remain anonymous.

I hereby agree to participate in the trial and to follow the instructions I have received.

Assinatura

Data

Termo de aceitação de participação voluntária em estudo da influência da aplicação tópica de formulação com extracto de *Castanea sativa* nos parâmetros biométricos cutâneos

Nome:

Sexo:

Nº:

Data de nascimento:

BI:

Declaro que fui informado acerca das condições e do objectivo do presente estudo, das instruções a cumprir pelos voluntários e dos possíveis riscos associados com o uso dos produtos em avaliação.

Fui informado da possibilidade de desistência, sem qualquer penalização.

Estou ciente de que os dados obtidos neste estudo serão registados e poderão ser publicados numa revista científica, sendo contudo mantido o anonimato dos voluntários.

Declaro que concordo em participar no estudo e em cumprir as instruções que me foram fornecidas.

I have been informed of the nature and purposes of this trial and the instructions which volunteers must follow, together with possible risks associated with the use of the products tested.

I have been informed that I may withdraw my consent at any time, and that such withdrawal will involve no penalty.

I am aware that the results of this study may be published in a scientific journal and that my identity will remain anonymous.

I hereby agree to participate in the trial and to follow the instructions I have received.

Assinatura

Data

Anexo III – Análise estatística dos resultados

Resultados do teste t de *student* para amostras independentes aplicado à comparação da actividade antioxidante (avaliada com o ensaio de captação do radical DPPH) e teor de compostos fenólicos totais (avaliado com o teste de Folin Ciocalteu) antes e após optimização do processo extractivo.

Eucalyptus globulus

Group Statistics

Método	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Folin otimizado	3	311,2222	20,23573	11,68310
Inicial	3	289,6111	1,39222	,80380
DPPH otimizado	3	11,9867	1,58437	,91474
Inicial	3	16,1233	,47290	,27303

Tests of Normality

Método	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Folin otimizado	,337	3	.	,853	3	,250
Inicial	,198	3	.	,995	3	,868
DPPH otimizado	,337	3	.	,855	3	,254
Inicial	,272	3	.	,946	3	,553

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
Folin	Equal variances assumed	12,044	,026	1,845	4	,139	21,61111	11,71072	-10,90306 54,12528
	Equal variances not assumed			1,845	2,019	,205	21,61111	11,71072	-28,32593 71,54815
DPPH	Equal variances assumed	6,178	,068	-4,333	4	,012	-4,13667	,95461	-6,78710 -1,48623
	Equal variances not assumed			-4,333	2,354	,037	-4,13667	,95461	-7,70591 -,56743

Castanea sativa

Group Statistics

Método	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Folin otimizado	3	283,7963	15,14603	8,74457
Inicial	3	245,3519	4,67768	2,70066
DPPH otimizado	4	12,5825	1,08905	,54452
Inicial	3	13,8667	1,33425	,77033

Tests of Normality

Método	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Folin optimizado	,181	3	.	,999	3	,941
Folin Inicial	,346	3	.	,836	3	,205
DPPH optimizado	,244	3	.	,971	3	,676
DPPH Inicial	,350	3	.	,829	3	,186

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Folin	Equal variances assumed	1,820	,249	4,201	4	,014	38,44444	9,15210	13,03414	63,85475
	Equal variances not assumed			4,201	2,378	,038	38,44444	9,15210	4,49709	72,39180
DPPH	Equal variances assumed	,261	,631	-1,409	5	,218	-1,28417	,91132	-3,62678	1,05845
	Equal variances not assumed			-1,361	3,856	,248	-1,28417	,94335	-3,94232	1,37399

Quercus robur

Group Statistics

Método		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Folin	optimizado	3	346,3333	6,65833	3,84419
	Inicial	3	302,3889	12,35746	7,13458
DPPH	optimizado	3	7,5267	,70543	,40728
	Inicial	3	10,7500	1,30288	,75222

Tests of Normality

Método	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Folin optimizado	,358	3	.	,812	3	,144
Folin Inicial	,312	3	.	,896	3	,372
DPPH optimizado	,298	3	.	,916	3	,437
DPPH Inicial	,197	3	.	,996	3	,873

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Folin	Equal variances assumed	1,967	,233	5,422	4	,006	43,94444	8,10432	21,44324	66,44565
	Equal variances not assumed			5,422	3,071	,012	43,94444	8,10432	18,48694	69,40195
DPPH	Equal variances assumed	,737	,439	-3,768	4	,020	-3,22333	,85540	-5,59831	-,84836
	Equal variances not assumed			-3,768	3,080	,031	-3,22333	,85540	-5,90612	-,54055

Juglans regia**Group Statistics**

	Método	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Folin	optimizado	3	269,8889	4,81638	2,78074
	Inicial	3	274,5000	3,58150	2,06778
DPPH	optimizado	3	16,6500	1,00145	,57819
	Inicial	3	19,6933	,97705	,56410

Tests of Normality

	Método	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Folin	optimizado	,369	3	.	,789	3	,088
	Inicial	,346	3	.	,838	3	,208
DPPH	optimizado	,347	3	.	,835	3	,201
	Inicial	,312	3	.	,896	3	,374

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Folin	Equal variances assumed	,665	,460	-1,331	4	,254	-4,61111	3,46529	-14,23230	5,01007
	Equal variances not assumed			-1,331	3,694	,259	-4,61111	3,46529	-14,55504	5,33282
DPPH	Equal variances assumed	,010	,926	-3,768	4	,020	-3,04333	,80778	-5,28609	-,80057
	Equal variances not assumed			-3,768	3,998	,020	-3,04333	,80778	-5,28663	-,80003

Hypericum androsaemum**Group Statistics**

	Método	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Folin	optimizado	3	280,8704	3,82541	2,20860
	Inicial	3	276,6852	6,83363	3,94540
DPPH	optimizado	3	11,2500	1,13318	,65424
	Inicial	3	11,2367	1,48944	,85993

Tests of Normality

	Método	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Folin	optimizado	,296	3	.	,919	3	,448
	Inicial	,275	3	.	,944	3	,543
DPPH	optimizado	,268	3	.	,951	3	,573
	Inicial	,218	3	.	,987	3	,785

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Folin	Equal variances assumed	1,329	,313	,926	4	,407	4,18519	4,52152	-8,36855	16,73892
	Equal variances not assumed			,926	3,141	,420	4,18519	4,52152	-9,84477	18,21514
DPPH	Equal variances assumed	,177	,696	,012	4	,991	,01333	1,08051	-2,98666	3,01332
	Equal variances not assumed			,012	3,734	,991	,01333	1,08051	-3,07275	3,09942

Resultados do teste de Friedman e teste de Wilcoxon aplicados à comparação da variação dos valores de eritema e de TEWL após ensaio de aplicação única sob oclusão do extracto de *Q. robur* e de *C. sativa*, 2 e 24 h após remoção das câmaras de oclusão

2 h após remoção da câmara de oclusão

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Eritema	Água desionizada	20	1,2350	1,53289	,34277	,5176	1,9524	-1,70	4,70
	Extracto de Q. robur	19	,2368	1,13686	,26081	-,3111	,7848	-2,30	2,30
	Extracto de C. sativa	20	-,6450	1,21025	,27062	-1,2114	-,0786	-3,00	1,70
	SLS 2 %	20	1,9450	2,08389	,46597	,9697	2,9203	-1,70	6,00
	Total	79	,6987	1,80892	,20352	,2936	1,1039	-3,00	6,00
TEWL	Água desionizada	20	3,410	3,0859	,6900	1,966	4,854	-,8	12,5
	Extracto de Q. robur	19	2,611	2,4223	,5557	1,443	3,778	-,6	8,8
	Extracto de C. sativa	20	2,475	1,8691	,4179	1,600	3,350	,2	5,8
	SLS 2 %	20	24,135	12,8825	2,8806	18,106	30,164	8,3	58,3
	Total	79	8,228	11,4872	1,2924	5,655	10,801	-,8	58,3

Tests of Normality

Produto		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Eritema	Água desionizada	,144	20	,200 [*]	,950	20	,369
	Extracto de <i>Q. robur</i>	,109	19	,200 [*]	,974	19	,856
	Extracto de <i>C. sativa</i>	,115	20	,200 [*]	,977	20	,882
	SLS 2 %	,118	20	,200 [*]	,968	20	,711
TEWL	Água desionizada	,200	20	,036	,850	20	,005
	Extracto de <i>Q. robur</i>	,153	19	,200 [*]	,933	19	,199
	Extracto de <i>C. sativa</i>	,135	20	,200 [*]	,905	20	,052
	SLS 2 %	,152	20	,200 [*]	,912	20	,070

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Eritema	3,074	3	75	,033
TEWL	22,382	3	75	,000

TEWL**Ranks**

	Mean Rank
Água_desionizada	2,24
Q.robur	1,87
C.sativa	1,89
SLS	4,00

Test Statistics^a

N	19,000
Chi-Square	35,349
df	3,000
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Q.robur - Água_desionizada	Negative Ranks	12 ^a	10,17	122,00
	Positive Ranks	6 ^b	8,17	49,00
	Ties	1 ^c		
	Total	19		
C.sativa - Água_desionizada	Negative Ranks	11 ^d	11,45	126,00
	Positive Ranks	9 ^e	9,33	84,00
	Ties	0 ^f		
	Total	20		
SLS - Água_desionizada	Negative Ranks	0 ^g	,00	,00
	Positive Ranks	20 ^h	10,50	210,00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	20		

Test Statistics^c

	Q.robur - Água_ desionizada	C.sativa - Água_ desionizada	SLS - Água_ desionizada
Z	-1,591 ^a	-,785 ^a	-3,920 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,112	,433	,000

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Eritema**Ranks**

	Mean Rank
Água_desionizada	3,08
Q.robur	2,24
C.sativa	1,26
SLS	3,42

Test Statistics^a

N	19,000
Chi-Square	32,755
df	3,000
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Q.robur - Água_desionizada	Negative Ranks	15 ^a	11,40	171,00
	Positive Ranks	4 ^b	4,75	19,00
	Ties	0 ^c		
	Total	19		
C.sativa - Água_desionizada	Negative Ranks	18 ^d	9,81	176,50
	Positive Ranks	1 ^e	13,50	13,50
	Ties	1 ^f		
	Total	20		
SLS - Água_desionizada	Negative Ranks	7 ^g	7,07	49,50
	Positive Ranks	11 ^h	11,05	121,50
	Ties	2 ⁱ		
	Total	20		

Test Statistics^c

	Q.robur - Água_ desionizada	C.sativa - Água_ desionizada	SLS - Água_ desionizada
Z	-3,062 ^a	-3,282 ^a	-1,571 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002	,001	,116

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

24 h após remoção da câmara de oclusão

Tests of Normality

Produto	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Eritema Água desionizada	,148	20	,200*	,961	20	,566
Extracto de Q. robur	,147	19	,200*	,952	19	,422
Extracto de C. sativa	,162	20	,181	,949	20	,357
SLS 2 %	,159	20	,197	,952	20	,397
TEWL Água desionizada	,236	20	,005	,767	20	,000
Extracto de Q. robur	,107	19	,200*	,968	19	,735
Extracto de C. sativa	,134	20	,200*	,951	20	,379
SLS 2 %	,175	20	,108	,888	20	,025

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Eritema Água desionizada	20	1,7100	1,16434	,26035	1,1651	2,2549	-,30	3,70
Extracto de Q. robur	19	,9632	1,14417	,26249	,4117	1,5146	-2,00	3,00
Extracto de C. sativa	20	1,1350	1,40386	,31391	,4780	1,7920	-1,30	4,00
SLS 2 %	20	3,6750	2,84751	,63672	2,3423	5,0077	-2,00	8,70
Total	79	1,8823	2,06595	,23244	1,4195	2,3450	-2,00	8,70
TEWL Água desionizada	20	1,735	2,5113	,5615	,560	2,910	-1,6	10,5
Extracto de Q. robur	19	,895	1,3665	,3135	,236	1,553	-1,2	3,5
Extracto de C. sativa	20	,525	1,3034	,2914	-,085	1,135	-1,6	3,9
SLS 2 %	20	27,610	16,7346	3,7420	19,778	35,442	8,8	70,2
Total	79	7,777	14,3471	1,6142	4,564	10,991	-1,6	70,2

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Eritema	5,182	3	75	,003
TEWL	26,965	3	75	,000

TEWL

Ranks

	Mean Rank
Água_desionizada	2,45
Q.robur	1,95
C.sativa	1,61
SLS	4,00

Test Statistics^a

N	19,000
Chi-Square	38,904
df	3,000
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Q.robur - Água_desionizada	Negative Ranks	12 ^a	11,25	135,00
	Positive Ranks	6 ^b	6,00	36,00
	Ties	1 ^c		
	Total	19		
C.sativa - Água_desionizada	Negative Ranks	14 ^d	10,89	152,50
	Positive Ranks	5 ^e	7,50	37,50
	Ties	1 ^f		
	Total	20		
SLS - Água_desionizada	Negative Ranks	0 ^g	,00	,00
	Positive Ranks	20 ^h	10,50	210,00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	20		

Test Statistics^c

	Q.robur - Água_ desionizada	C.sativa - Água_ desionizada	SLS - Água_ desionizada
Z	-2,158 ^a	-2,315 ^a	-3,920 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,031	,021	,000

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Eritema**Ranks**

	Mean Rank
Água_desionizada	2,82
Q.robur	1,68
C.sativa	1,95
SLS	3,55

Test Statistics^a

N	19,000
Chi-Square	25,787
df	3,000
Asymp. Sig.	,000

a. Friedman Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Q.robur - Água_desionizada	Negative Ranks	15 ^a	9,80	147,00
	Positive Ranks	3 ^b	8,00	24,00
	Ties	1 ^c		
	Total	19		
C.sativa - Água_desionizada	Negative Ranks	14 ^d	9,64	135,00
	Positive Ranks	4 ^e	9,00	36,00
	Ties	2 ^f		
	Total	20		
SLS - Água_desionizada	Negative Ranks	4 ^g	6,25	25,00
	Positive Ranks	14 ^h	10,43	146,00
	Ties	2 ⁱ		
	Total	20		

Test Statistics^c

	Q.robur - Água_ desionizada	C.sativa - Água_ desionizada	SLS - Água_ desionizada
Z	-2,684 ^a	-2,162 ^a	-2,636 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007	,031	,008

a. Based on positive ranks.

b. Based on negative ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Resultados do teste t de *student* para amostras emparelhadas aplicado à comparação da actividade antioxidante (avaliada com o ensaio de captação do radical DPPH) antes e após execução do teste de fotoestabilidade

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Antes	16,95	5	1,677	,750
	Apos	17,64	5	3,785	1,693
Pair 2	Antes	16,95	5	1,677	,750
	controlo	15,4036	5	2,92738	1,30916

Tests of Normality

id		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apos	apos	,229	5	,200*	,947	5	,713
	controlo	,282	6	,147	,845	6	,142
	antes	,238	6	,200*	,904	6	,400

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Paired Samples Test

		Paired Differences						
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df
					Lower	Upper		
Pair 1	Antes - Apos	-,693	3,533	1,580	-5,080	3,694	-,439	4
Pair 2	Antes - controlo	1,54640	2,49191	1,11442	-1,54772	4,64052	1,388	4

Resultados do teste t de *student* para amostras independentes aplicado à comparação da actividade antioxidante (avaliada com o ensaio de captação do radical DPPH), do teor de compostos fenólicos totais (avaliado com o teste de Folin Ciocalteu) e teores do ácido clorogénico, hiperósido+rutina+isoquercitrina e ácido elágico avaliados após preparação e após 12 meses de armazenamento

Group Statistics

tempo		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Accloro	Início	3	2,2542	,06469	,03735
	12 meses	3	2,3556	,04321	,02495
hiperrutiso	Início	3	14,5382	,06932	,04002
	12 meses	3	13,4427	,15758	,09098
Acelag	Início	3	3,1992	,03576	,02064
	12 meses	3	2,8468	,03605	,02082
DPPH	Início	3	12,9533	1,08786	,62807
	12 meses	4	11,8725	1,40058	,70029
Folin	Início	3	273,9444	3,20638	1,85120
	12 meses	3	258,5926	2,26510	1,30775

Tests of Normality

tempo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Accloro	Início	,261	3	.	,957	3	,601
	12 meses	,342	3	.	,846	3	,229
hiperrutiso	Início	,184	3	.	,999	3	,929
	12 meses	,220	3	.	,986	3	,776
Acelag	Início	,357	3	.	,814	3	,149
	12 meses	,239	3	.	,975	3	,696
DPPH	Início	,249	3	.	,967	3	,653
	12 meses	,206	3	.	,993	3	,838
Folin	Início	,334	3	.	,859	3	,266
	12 meses	,279	3	.	,939	3	,522

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Accloro	Equal variances assumed	,585	,487	-2,259	4	,087	-,10148	,04492	-,22618	,02323
	Equal variances not assumed			-2,259	3,488	,097	-,10148	,04492	-,23374	,03079
hiperrutiso	Equal variances assumed	1,615	,273	11,022	4	,000	1,09545	,09939	,81949	1,37140
	Equal variances not assumed			11,022	2,746	,002	1,09545	,09939	,76194	1,42896
Acelag	Equal variances assumed	,015	,907	12,020	4	,000	,35237	,02932	,27097	,43376
	Equal variances not assumed			12,020	4,000	,000	,35237	,02932	,27097	,43376
DPPH	Equal variances assumed	,862	,396	1,102	5	,321	1,08083	,98117	-1,44136	3,60302
	Equal variances not assumed			1,149	4,957	,303	1,08083	,94068	-1,34364	3,50530
Folin	Equal variances assumed	,792	,424	6,773	4	,002	15,35185	2,26653	9,05895	21,64476
	Equal variances not assumed			6,773	3,598	,004	15,35185	2,26653	8,77186	21,93184

Resultados do teste de Kruskal Wallis aplicado à comparação da actividade antioxidante do extracto de *C. sativa*, avaliada com três diferentes métodos do ensaio de captação do radical DPPH)

Descriptives

IC									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
EtOH96		4	5,6957	,62353	,31176	4,7036	6,6879	4,98	6,50
EtOH70		9	5,2678	,88500	,29500	4,5875	5,9480	4,41	6,93
DMSO:ISO		6	6,1633	1,76255	,71956	4,3136	8,0130	4,37	8,46
Total		19	5,6407	1,19879	,27502	5,0629	6,2185	4,37	8,46

Test of Homogeneity of Variances

IC	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	7,207	2	16	,006

Tests of Normality

Solvente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC EtOH96	,273	4	.	,943	4	,676
EtOH70	,299	9	,020	,850	9	,075
DMSO:ISO	,244	6	,200*	,881	6	,276

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Ranks

Solvente	N	Mean Rank
IC EtOH96	4	11,00
EtOH70	9	8,67
DMSO:ISO	6	11,33
Total	19	

Test Statistics^{a,b}

	IC
Chi-Square	,968
df	2
Asymp. Sig.	,616

a. Kruskal Wallis Test

Resultados do teste Anova, com post-hoc Dunnett (comparações com controlo negativo) aplicado à comparação das variações de hidratação e de TEWL observadas 1 h e 4 h após aplicação cutânea dos produtos

1 hora após início do ensaio

Descriptive Statistics

Controlo negativo	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	6,5695	1,34631	6,31474
Diffewl	22	-1,2273	,26711	1,25288
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Glicerina 85%	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	25,9750	2,16822	10,16986
Diffewl	22	-,6364	,49116	2,30373
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Formulação com extracto	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	26,7568	1,68967	7,92525
Diffewl	22	-,4136	,56259	2,63878
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Base	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	26,2841	1,60444	7,52550
Diffewl	22	-1,9636	,41396	1,94166
Valid N (listwise)	22			

Tests of Normality

Produto		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Difhidra	Glicerina 85%	,113	22	,200 [*]	,936	22	,163
	Controlo negativo	,226	22	,005	,846	22	,003
	Formulação com extracto	,106	22	,200 [*]	,964	22	,564
	Base	,094	22	,200 [*]	,980	22	,920
Diffewl	Glicerina 85%	,130	22	,200 [*]	,950	22	,318
	Controlo negativo	,093	22	,200 [*]	,978	22	,888
	Formulação com extracto	,210	22	,012	,805	22	,001
	Base	,114	22	,200 [*]	,971	22	,729

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Difhidra	1,034	3	84	,382
Diffewl	1,852	3	84	,144

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Difhidra	Between Groups	6455,302	3	2151,767	32,758	,000
	Within Groups	5517,637	84	65,686		
	Total	11972,939	87			
Diffewl	Between Groups	31,719	3	10,573	2,402	,073
	Within Groups	369,811	84	4,403		
	Total	401,531	87			

Multiple Comparisons

Dunnnett t (2-sided)

Dependent Variable	(I) Código	(J) Código	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Difhidra	Glicerina 85%	Controlo negativo	19,40545 [*]	2,44366	,000	13,5596	25,2513
	Formulação com extracto	Controlo negativo	20,18727 [*]	2,44366	,000	14,3414	26,0331
	Base	Controlo negativo	19,71455 [*]	2,44366	,000	13,8687	25,5604
Diffewl	Glicerina 85%	Controlo negativo	,59091	,63264	,672	-,9225	2,1043
	Formulação com extracto	Controlo negativo	,81364	,63264	,434	-,6998	2,3271
	Base	Controlo negativo	-,73636	,63264	,514	-2,2498	,7771

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4 h após início do ensaio

Descriptive Statistics

Controlo negativo	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	11,0759	1,37726	6,45991
Diftewl	22	-1,1091	,35266	1,65412
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Glicerina 85%	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	19,7541	1,35336	6,34780
Diftewl	22	-,5591	,50618	2,37420
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Formulação com extracto	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	19,1227	1,61677	7,58334
Diftewl	22	-,5545	,42664	2,00113
Valid N (listwise)	22			

Descriptive Statistics

Base	N	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
Difhidra	22	19,8118	1,36606	6,40738
Diftewl	22	-1,9455	,44106	2,06875
Valid N (listwise)	22			

Tests of Normality

Produto		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Difhidra	Glicerina 85%	,134	22	,200 [*]	,947	22	,271
	Controlo negativo	,190	22	,037	,879	22	,012
	Formulação com extracto	,125	22	,200 [*]	,962	22	,522
	Base	,127	22	,200 [*]	,950	22	,319
Diftewl	Glicerina 85%	,151	22	,200 [*]	,949	22	,298
	Controlo negativo	,111	22	,200 [*]	,986	22	,982
	Formulação com extracto	,222	22	,006	,862	22	,006
	Base	,131	22	,200 [*]	,926	22	,101

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Difhidra	,103	3	84	,958
Diftewl	1,331	3	84	,270

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Difhidra	Between Groups	1194,903	3	398,301	8,822	,000
	Within Groups	3792,317	84	45,147		
	Total	4987,219	87			
Diftewl	Between Groups	28,414	3	9,471	2,274	,086
	Within Groups	349,800	84	4,164		
	Total	378,214	87			

Multiple Comparisons

Dunnett t (2-sided)

Dependent Variable	(I) Codigo	(J) Codigo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Difhidra	Glicerina 85%	Controlo negativo	8,67818 [*]	2,02589	,000	3,8318	13,5246
	Formulação com extracto	Controlo negativo	8,04682 [*]	2,02589	,000	3,2004	12,8932
	Base	Controlo negativo	8,73591 [*]	2,02589	,000	3,8895	13,5823
Diftewl	Glicerina 85%	Controlo negativo	,55000	,61528	,700	-,9219	2,0219
	Formulação com extracto	Controlo negativo	,55455	,61528	,695	-,9174	2,0265
	Base	Controlo negativo	-,83636	,61528	,390	-2,3083	,6355

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.