# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Camila Helena Ferreira Cuelho

Ilex paraguariensis A. St. Hil.: EFEITOS NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB

# Camila Helena Ferreira Cuelho

# Ilex paraguariensis A St. Hil.: EFEITOS NA PRENVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.** 

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melânia Palermo Manfron Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gizele Scotti do Canto

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cuelho, Camila Helena Ferreira Ilex paraguariensis A. St. Hil.: efeitos na prevenção das alterações cutâneas induzidas por radiação UVB / Camila Helena Ferreira Cuelho.- 2016. 151 p.; 30 cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron Coorientadora: Gizele Scotti do Canto Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Metaloproteinases 2. Erva-mate 3. Colágeno 4. Pele 5. Fotoproteção I. Manfron, Melânia Palermo II. Canto, Gizele Scotti do III. Título.

#### © 2016

Todos os direitos autorais reservados a Camila Helena Ferreira Cuelho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: camilahfcuelho@gmail.com

### Camila Helena Ferreira Cuelho

# Ilex paraguariensis A St. Hil.: EFEITOS NA PRENVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.** 

Aprovado em 16 de novembro de 2016:

Melânia Palermo Manfron, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Gizele Scotti do Canto, Dra. (UFSM)

(Co-Orientadora)

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)

Chana de Medeiros da Silva, Drª. (UNISC)

shang M. da silia

Santa Maria, RS 2016

# **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, irmãos, Fefa e luri Bonilha pelo amor e apoio incondicional. À Prof<sup>a</sup>. Melânia pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade concedida para fazer parte do seu grupo de pesquisa.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me guiou dando força e paciência ao longo dessa jornada, assim como em todos os momentos da minha vida.

À minha Família por todo o amor, puro e verdadeiro, de sempre. E, também, pela confiança depositada no meu trabalho.

Ao meu eterno amor, Iuri Bonilha, companheiro na jornada espiritual e profissional, além de um grande sócio, por sua motivação diária, amizade e forte contribuição no trabalho ajudando a torna-lo real. Muito obrigada por tudo, sempre!

À Prof<sup>a</sup> Gizele Scotti do Canto que me acompanha na caminhada científica desde a graduação aconselhando e sempre disposta a ajudar. Muito Obrigada !!!

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e por fornecer os subsídios necessários para o desenvolvimento do projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Vera Pereira Pagliarin e a Rafaela Castro Dornelles pelo profissionalismo durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia: Lucas Marangoni, Rachel de Lima, Juliana Calil Brondani, Débora Lavarda e Vanessa. Obrigada pela convivência e pelos ensinamentos, tanto científicos quanto pessoais. Em especial, a minha IC Marina Lovatto, pelo profissionalismo e maturidade durante todo o mestrado, demonstrando habilidades inerentes a sua personalidade que favorecem o seu crescimento e de toda a equipe envolvida; principalmente pela amizade, conselhos e parceria nos momentos de descontração. Muito obrigada!

Aos meus amigos: Jocieli Kasten, Alexandre Bueno, Lara da Cas, Jocelene Cossetin, Évelin Cogo, Maiara Maziero, Duda, Paulo Guilherme, Eder Raimundi, Marina Lovatto, Iuri Bonilha e Carlinha por todo o apoio incondicional, pela amizade

oferecida nos momentos mais difíceis e nas conquistas, por toda a presença nesses dois anos e durante a vida.

À Prof<sup>a</sup> Roselei Fachinetto por toda a disposição, atenção e disponibilidade durante o desenvolvimento do trabalho, e ao Alcindo Busanello, pela paciência, dedicação e zelo na realização da Zimografia. Muito obrigada!!

À Prof<sup>a</sup> Sara Marchesan e a sua aluna Indiara Brusco, por toda a atenção e zelo na experimentação animal.

Aos professores, Maria Izabel Ugalde e Marcelo Leite da Veiga e a sua aluna Eduarda Rocha, pela atenção, dedicação e dúvidas esclarecidas em relação à Histologia.

À Prof<sup>a</sup> Ivana Cruz e a sua aluna Fernanda Barbisan, por toda a disposição em ajudar nos experimentos de cultivo celular.

Ao Prof. Rafael Taglialegna, de Minas Gerais, que nos ensinou detalhes da técnica utilizada para desenvolver este projeto.

**MUITO OBRIGADA!!** 

"Só sei que nada sei por inteiro Só sei que nada sei por completo.

Só sei que nada sei que só eu saiba. Só sei que nada sei que a outra pessoa não venha a saber. Só sei que nada sei que um dia eu não possa conhecer."

(Sócrates)

### **RESUMO**

# Ilex paraguriensis A. St Hil. EFEITOS NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB

AUTORA: Camila Helena Ferreira Cuelho ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

Diariamente estamos expostos a inúmeros fatores ambientais, tais como: a radiação ultravioleta e a poluição, que são fontes geradoras de radicais livres. Apesar de ser a maior responsável pelos efeitos biológicos relacionados ao câncer de pele e fotoenvelhecimento, a radiação UVB representa apenas 10% do total da radiação UV capaz de chegar a superfície da Terra. Como medida preventiva, os fotoquimioprotetores são produtos tópicos ou de administração oral incorporados de extratos vegetais ou substâncias naturais isoladas com atividade antioxidante, inibidoras de MMPs e/ou anti-inflamatórias. A llex paraguariensis A. St. Hil., conhecida como erva-mate, é uma árvore nativa da América do Sul. Investigações prévias mostraram altos teores de bioativos de interesse cosmético, tais como: ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas triterpenoides. O objetivo do estudo foi investigar o potencial fotoprotetor do EXB das folhas de erva-mate in vitro e in vivo. O EXB foi caracterizado por meio das dosagens dos teores de polifenóis, flavonoides e taninos por métodos espectrofotométricos; identificando quantificando os ácidos clorogênico e cafeico por LC/MS e CLAE; avaliando a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e β-caroteno. A citotoxicidade / fotoestabilidade e atividade inibitória frente à MMP-2 e -9, em diferentes concentrações, foram analisadas in vitro por medida da viabilidade celular em culturas de células de fibroblastos da linhagem HFF-1 e zimografia de substrato, respectivamente. A eficácia fotoprotetora da formulação contendo o extrato foi testada in vivo por medida da atividade de metaloproteinases, mieloperoxidase e degradação do colágeno, usando camundongos heterogênicos expostos ao UVB (0,23 J/cm<sup>2</sup>). Os teores de flavonoides, polifenois e taninos, respectivamente, foram 200 mg EC/g; 265,4 mg EAG/g e 158,7 mg EC/g. Foram quantificados os teores de ácido clorogênico (19,26 mg/g) e ácido cafeico (4,27 mg/g) por CLAE. O potencial antioxidante foi analisado pelos métodos DPPH (IC<sub>50</sub> 39,73 μg/mL) e β-caroteno (50,48% de inibição). Nos testes in vitro o EXB não apresentou citotoxicidade nas células HFF-1. O EXB (50 µg/mL) não irradiado ao UVB (0,23 J/cm<sup>2</sup>) proliferou células HFF-1, sugerindo uma possível fotoinstabilidade do EXB. Os géis incubados com EXB (100 µg/mL), inibiu em 79,31% da atividade da pro-MMP-9, de forma dose dependente. Nos testes in vivo a formulação EXB mostrou eficácia fotoprotetora, inibindo a atividade das MMP-2 (73,08%), pro-MMP-2 (67,71%) e pro-MMP-9 (89,86%), diminuindo a atividade de mieloperoxidase (71,1%) e preservando colágeno diante de uma exposição aguda à radiação UVB. A formulação contendo o extrato apresentou um potencial efeito fotoprotetor e antienvelhecimento.

Palavras-chave: Metaloproteinases. Erva-mate. Colágeno. Pele. Fotoproteção.

### **ABSTRACT**

# Ilex paraguariensis A. St. Hil: EFFECTS IN THE PREVENTION ON UVB IRRADIATION-INDUCED CHANGES SKIN

AUTHOR: CAMILA HELENA FERREIRA CUELHO ADVISOR: MELÂNIA PALERMO MANFRON

Daily basis, we are exposed to many environmental factors such as ultraviolet radiation and pollution, which are sources of free radicals. Although it's the most responsible for the biological effects related to skin cancer and photoagind, UVB radiation is only 10% of the total UV radiation can reach the Earth's surface. As a preventive measure, photo chemoprotectives, are oral or topical products incorporated plant extracts or isolated natural substances with antioxidant activity, inhibitors of MMPs and/or anti-inflamatory. Ilex paraguariensis A. St. Hil, known as yerba mate, is a native plant to South America. Previous studies showed high levels of bioactive cosmetic interest, such as: phenolic acids, flavonoids ant triterpenoid saponins. The main of the study was to investigate the potential photoprotective the crude extract of the leaves of *llex paraquariensis in vitro* e *in vivo*. The EXB was characterized by the dosages of the polyphenols, flavonoids and tannins by spectrophotometric methods; identifying and quantifying the chlorogenic acid and caffeic by LC/MS and HPLC; besides its antioxidant activity by in vitro methods. Cytotoxicity/Photostability and inhibitory activity of MMP-2 and -9 in different concentrations, were analyzed in vitro by measurement of cell viability in fibroblast culture (HFF-1 cells) and substrate zymography, respectively. The photoprotective effect of cream topic treatment containing EXB was evaluated in vivo by measuring the metalloproteinase activity, myeloperoxidase and collagen degradation, using heterogenic mice exposed to UVB (0,23 J/cm<sup>2</sup>). The flavonoid contents, polyphenols and tannins were 200 mg EQ/g; 265,4 mg EAG/g e 158,7 g EC/g. Through the HPLC, the chlorogenic acid content was quantified (19.26 mg/g) and caffeic acid (4.27 mg/g). The antioxidant potential was analyzed by the methods DPPH (IC<sub>50</sub>) 39,73 μg/mL) and β-carotene (50,48% inhibition). In in vitro tests the EXB showed no cytotoxicity in HFF-1 cells. The EXB (50 µg/mL) non-irradiated UVB (0,23 J/cm<sup>2</sup>) proliferated HFF-1 cells, suggesting a possible photo instability the EXB. At the concentration of 100 µg/mL, reduced in vitro, 79,31% of pro-MMP-9 activity in a dose dependent manner. In vivo tests showed EXB formulation photoprotective efficacy by inhibiting the activity of MMP-2 (73,08%), pro-MMP-2 (67,71%) and pro-MMP-9 (89,86%), decreasing myeloperoxidase activity (71,1%) and preserving collagen an acute exposure to UVB radiation. The formulation containing the extract was shown to have a potential effect photoprotective and anti-aging.

**Keywords:** Metalloproteinase. Collagen. Yerba mate. Skin. Photoprotection.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura	1 –	Árvore adulta de <i>Ilex paraguariensis</i> 2	25
Figura	2 –	Camadas da pele e seus apêndices	30
Figura	3 –	Fibrilas de colágeno de peles envelhecidas, jovens protegidas e expostas do sol	33
Figura	4 –	Principais danos causados na pele devido à exposição crônica à	
Figura	5 –	Profundidade de penetração das regiões espectrais da radiação UV	34
		na pele	
Figura Figura		Fotoprodutos gerados pela exposição do DNA à radiação UVB	
Figura	8 –	Mecanismo proposto da indução de MT1-MMP para ativação da pro- MMP-2 para MMP-2	43
Figura	9 –	Mecanismo de expressão de MMP-9 via TNF-α e COX-2/PGE <sub>2</sub>	45
Figura	10 –	Representação das folhas (A), flores (B) e frutos (C) de I.	
<b>-</b> :	4.4	paraguariensis	
		Área de ocorrência de <i>I. paraguariensis</i>	
		Estrutura química de derivados do ácido hidroxibenzoico	
_		Estrutura química de derivados do ácido hidroxicinâmico	
_		Fórmula para o cálculo do percentual de inibição da oxidação	59
Figura	15 –	Modelo de curva de decaimento obtida no sistema $\beta$ -caroteno e	
		ácido linoleico, para obtenção das tangentes do cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2	60
Figura	16 –	Fórmula para o cálculo dos fatores F1 e F2	60
Figura	17 –	Fórmula para o cálculo do percentual de inibição do radical DPPH6	61
		Curva padrão do ácido gálico	
Figura	19 –	Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração	75
_		Curva padrão da quercetina (flavonoides)	
		Curva padrão da catequina.	
Figura	22 –	Estruturas do β-caroteno (A) e ácido linoléico (B)	78
		Capacidade antioxidante do EXB pelo método β-caroteno	
		Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante	
Figura	25 _	Capacidade antioxidante pelo método DPPH expressos em % de	
i iguia	20	inibição do EXB de <i>I. paraguariensis</i>	
Figura	26 _	Curva padrão do ácido cafeico por CLAE	9/
		Curva padrão do ácido clorogênico dosado por CLAE	
		Perfil cromatográfico dos ácidos clorogênico e cafeico do EXB de <i>l.</i>	00
rigura	20 –	<u> </u>	06
T:	20	paraguariensis obtido por CLAE-DAD dos padrões e do EXB	00
Figura	29 –	Percentual de viabilidade celular de fibroblastos após 24 horas	
		(linhagem HFF-1) tratadas com EXB irradiado e não irradiado ao	^^
		UVB em uma faixa de concentração de 1 a 100 μg/mL	89
⊦ıgura	30 –	Percentual da proliferação celular após 72 horas de fibroblastos	
		(linhagem HFF-1) tratadas com EXB irradiado e não irradiado ao	
		UVB em uma faixa de concentração de 1 a 100 μg/mL	
_		Resultados das atividades das MMPs na zimografia in vivo	
Figura	32 –	Ancoragem da molécula de ácido cafeico no sítio S1´ da MMP-2	96
Figura	33 –	Atividades das MMPs nos géis incubados com EXB	97

Figura 34 -	Atividade da mieloperoxidase	102
	Fotomicrografia de seções de pele do dorso coradas com picrosirius	
_	red	104

# **LISTA DE TABELAS**

Descrição do gradiente de eluição em função do tempo	.62
Composição do creme base concentrado	.65
Descrição dos grupos utilizados no experimento.	.66
Composição dos géis utilizados na eletroforese (SDS-PAGE)	.67
Valores do percentual de inibição da peroxidação do ácido linoleico e	
dos fatores cinéticos da reação	.80
Valores do percentual de inibição do radical DPPH pelo EXB, ácido	
ascórbico e valores do IC <sub>50</sub>	.83
Atividade enzimática (%) das MMPs nos grupos tratados no ensaio in	
<i>vivo</i>	.95
Atividade enzimática (%) das MMPs nos géis tratados com EXB	.98
	Composição do creme base concentrado.  Descrição dos grupos utilizados no experimento.  Composição dos géis utilizados na eletroforese (SDS-PAGE)  Valores do percentual de inibição da peroxidação do ácido linoleico e dos fatores cinéticos da reação  Valores do percentual de inibição do radical DPPH pelo EXB, ácido ascórbico e valores do IC <sub>50</sub> Atividade enzimática (%) das MMPs nos grupos tratados no ensaio <i>in vivo</i>

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg micrograma

APMA Acetato 4-aminofenilmercúrio

APS Persulfato de amônio

AGEs Produtos finais de glicação avançada

BHT Hidroxitolueno butilado

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD Cromatografia líquida de alta eficiência-Detector de arranjo de diodos

CCD Cromatografia de Camada Delgado

COX-2 Ciclooxigenase-2
DMSO Dimetilsulfóxido

DMEM Meio de cultura modificado Dulbecco's

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EAG Equivalentes de ácido gálico
EC Equivalentes de catequinas
EQ Equivalentes de quercetina
EROs Espécies reativas de oxigênio

EXB Extrato hidroetanólico 40% das folhas de *llex paraguariensis* 

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HOCI Ácido Hipocloroso

HgCl<sub>2</sub> Cloreto de mercúrio

Hpx Domínio hemopexina

IC<sub>50</sub> Concentração Inibitória 50

INCA Instituto Nacional do Câncer

IUV Índice ultravioleta

iNOS Óxido nítrico sintase induzível

IκB Inibidor de kappa BIL-1β Interleucina-1β

MAPK Proteína quinase ativadora de mitose

MEC Matriz extracelular

MMPs Metaloproteinases de matriz

MT-MMP Metaloproteinase do tipo membrana

MPO Mieloperoxidase

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo

NF-kB Fator nuclear kappa B

NaCl Cloreto de sódio

OMS Organização Mundial da Saúde

PGE<sub>2</sub> Prostaglandina E2

pro-MMP Pro-metaloproteinase de matriz

pH Potencial hidrogeniônico

RUV Radiação ultravioleta SDS Dodecil sulfato de sódio

SFB Soro fetal bovino

TEMED Tetrametiletilenodiamina

TIMPs Inibidores teciduais de metaloproteinases

TGF-β Fator de crescimento tecidual beta

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

UV Ultravioleta
UVA Ultravioleta-A
UVB Ultravioleta-B
UVC Ultravioleta-C

UV-DAD Ultravioleta- detector de arranjo de diodos

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.23
1.1 1.1.1 1.1.2	OBJETIVOS Objetivo geral Objetivos específicos	.27
1.2	JUSTIFICATIVA	.27
2	REVISÃO DE LITERATURA	.29
2.1	PELE E FOTOENVELHECIMENTO	.29
2.2	METALOPROTEINASES E VIAS DE SINALIZAÇÃO	.38
2.3 2.3.1 2.3.2 2.3.3	ILEX PARAGUARIENSIS A. ST. HIL. Aspectos gerais Aspectos fenológicos Constituintes químicos e atividade farmacológica	.45 .47 .49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	.55
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	
3.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	
3.3	SOLVENTES, REAGENTES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA	.55
3.4	PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	.57
3.5 3.5.1 3.5.2 3.5.3	DOSAGENS FITOQUÍMICAS  Determinação do teor de polifenóis  Determinação do teor de flavonoides  Determinação do teor de taninos	.57 .58
3.6.1 3.6.1.1 3.6.2	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	.59 . <i>5</i> 9
3.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO E CAFEICO POR CLAE	.61
3.8.1 3.8.2 3.8.2.1 3.8.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FOTOESTABILIDADE DO EXB EM CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS (HFF-1)Linhagem e cultivo celular	.63 .63 .63
3.9 3.9.1 3.9.2	AVALIAÇÃO IN VIVO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA DO EXB E DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXB	.64 .65
3.9.3	Degradação do colágeno	. OÖ

3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA69	9
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO7	1
4.1	RENDIMENTO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>ILEX</i> PARAGUARIENSIS7	
4.1.1	Determinação do teor de polifenóis	
4.1.2 4.1.3	Determinação do teor de flavonoides	
4.2	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>ILEX</i> PARAGUARIENSIS78	
4.2.1	Determinação da capacidade antioxidante do EXB pelo método do β-caroteno	Q
4.2.3	Determinação da capacidade antioxidante do EXB pelo método DPPH	
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO CAFEICO POR CLAE83	3
4.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FOTOESTABILIDADE DO EXB EM CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS87	7
4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA DO EXB E DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXB9	1
4.5.1	Avaliação do EXB e da formulação tópica (in vivo) na atividade de metaloproteinases da pele de camundongos após a exposição	_
4.5.2	aguda à radiação UVB por zimografia92 Avaliação da eficácia anti-inflamatória da formulação adicionada de	2
	EXB por meio da atividade da mieloperoxidase10	
4.5.3	Avaliação da degradação do colágeno por Picrosirius Red	
5	CONCLUSÃO107	
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS109	9
	ANEXO	5
	ANEXO A – ARTIGO125	5
	ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA . 149	9
	ANEXO C – IMAGEM DA EXSICATA15°	1

# 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, podendo atingir 25.000 cm<sup>2</sup> em um homem adulto, e está constantemente exposta a uma ampla variedade de fatores ambientais químicos e físicos. Dependendo da dose, tempo de exposição, comprimento de onda e região exposta, a radiação ultravioleta (RUV) pode causar desde queimaduras na pele e envelhecimento precoce até danos ao DNA celular, câncer e outras doenças inflamatórias cutâneas (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002; SCHARFFETTER-KOCHANEK et al., 1997).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre naturalmente em sistemas biológicos (THOMAS, 2000). A absorção direta de radiação por moléculas fotossensíveis gera as EROs. A partir disso, os mecanismos de regeneração de antioxidantes endógenos comprometem os sistemas de defesa antioxidantes, não enzimáticos e enzimáticos da pele, favorecendo o aumento de espécies próoxidantes no meio celular, condição designada por estresse oxidativo (SILVA, 2007a).

O estresse oxidativo causa dano aos componentes celulares e altera o padrão de expressão gênica, levando às doenças de pele como o câncer, fototoxicidade e fotoenvelhecimento (SILVA, 2007a). A RUV, ao induzir a formação de EROs, desencadeia mecanismos de sinalização capazes de alterar a expressão gênica via MAPquinase (MAPK) por ativação do fator de transcrição AP-1, e contribui para aumentar a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). Os aumentos de expressão e atividade de MMP-2 e -9 são também observados em consequência ao processo inflamatório que acompanha a exposição à RUV (ROPKE et al., 2006; SHINDO et al., 1994).

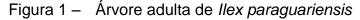
As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases Zn-dependentes, que promovem a degradação da matriz extracelular (MEC), danificando desse modo a integridade estrutural da derme (WOESSNER Jr., 1991). Estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais e nos processos de doenças, como artrite, osteopatias e câncer (destruindo a membrana basal, contribuindo para a metástase) (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002).

A atividade destas enzimas é regulada por uma série de inibidores enzimáticos em níveis de transcrição gênica, sendo a classe de enzimas denominada de inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (JACOBSEN et al., 2010).

A descoberta e o desenvolvimento de produtos que demonstrem, seja por mecanismos diretos e/ou indiretos, atividade inibitória de MMPs torna-se uma alternativa eficaz no retardo do envelhecimento cutâneo e/ou tratamento do câncer. Além disso, a biodiversidade brasileira e a sustentabilidade contribuem para a utilização de extratos vegetais ou seus constituintes químicos para fins terapêuticos. Pesquisas inovadoras estão utilizando extratos vegetais com propriedades antioxidantes conhecidas para avaliar os possíveis efeitos e mecanismos envolvidos sobre as MMPs e na prevenção de danos ocasionados pela exposição à RUV.

Fotoquimioprevenção é o termo que define o uso de agentes capazes de melhorar os efeitos adversos da RUV no tecido cutâneo (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003). A fotoquimioprevenção é um modo viável de reduzir a ocorrência de câncer de pele. Muitos desses compostos naturais também têm encontrado um lugar nos produtos de cuidados para pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). O uso de compostos naturais, especialmente antioxidantes presentes na dieta e em bebidas consumidas pela população, têm recebido considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos para uso humano.

A *Ilex paraguariensis* Aquifoliacea St. Hil. é uma árvore (Figura 1) nativa da América do Sul, que cresce naturalmente e é cultivada na Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. Por meio de suas folhas é preparado o chimarrão, bebida tradicional na Região Sul do Brasil, altamente consumido como tônico e estimulante (GRIGIONI et al., 2004). Investigações prévias desta planta mostram a presença de muitos compostos bioativos como xantinas, derivados do ácido cafeoilquínico, flavonoides e saponinas triterpenoides (ALIKARIDIS, 1987; FILIP et al., 2001; GOSMANN et al., 1995).





Fonte: Gerhardt (2013).

Os polifenóis presentes nas folhas da *I. paraguariensis* destacam-se por serem quimioprotetores e apresentarem atividade terapêutica no tratamento do câncer; prevenção da lipoperoxidação em mamíferos; prevenção de efeitos adversos decorrentes da radiação UV, com redução do dano oxidativo (SILVA et al., 2010). Na classe das saponinas encontram-se as agliconas, ácidos ursólico e oleanólico, responsáveis pelo sabor amargo e pela atividade anti-inflamatória e adstringente da erva-mate (GNOATTO et al., 2008). Além disso, estudos comprovaram a capacidade das saponinas de inibirem enzimas da matriz extracelular (MEC), como as colagenases (RIBEIRO, 2012).

Em decorrência da destruição da camada de ozônio pela poluição, a incidência de RUV sobre a Terra tem aumentado, e consequentemente, o número de casos de câncer de pele tem se elevado a cada ano. Kiguti e colaboradores (2009) destacam que durante vários meses do ano o território brasileiro apresenta,

em condições de céu claro, índice ultravioleta (IUV) considerados extremos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por serem maiores que 9.

A prevenção e o tratamento de neoplasias cutâneas estão sujeitos a altos custos, sendo também necessário um maior entendimento do processo da doença para o desenvolvimento de terapias preventivas e intervenções eficazes.

O carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide são os subtipos mais frequentes das neoplasias originadas no tegumento cutâneo (70% e 25%, respectivamente). Estes carcinomas são conhecidos como câncer de pele não melanoma e são frequentemente encontrados em pessoas de pele clara expostas excessivamente ao sol (MITTELBRONN et al., 1998). De acordo com as estimativas de incidência de câncer para o ano de 2016, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), esperam-se no Brasil 175.760 casos novos de câncer não melanoma, sendo 80.850 em homens e 94.910 casos em mulheres.

Na região Sul do Brasil, esse câncer é o mais incidente entre os homens, correspondendo a 138,75 casos a cada 100 mil homens. Esses dados refletem, em parte, as características da população dessa região, em especial do Rio Grande do Sul, onde grande parte da população descende de imigrantes europeus, sendo esse um dos grupos étnicos mais sensível aos efeitos deletérios da radiação solar. A importância dos compostos naturais na prevenção e tratamento de neoplasias continua sendo largamente sub-explorada, apesar de fortes evidências crescentes mostrando que essas moléculas têm tanto a capacidade quimiopreventiva quanto a quimioterapêutica. A maioria das drogas anti-câncer têm vários efeitos colaterais tóxicos que podem conduzir a uma má qualidade de vida para pacientes. (MUKHERJEE et al., 2013).

A atividade desses compostos naturais parecem agir por meio de múltiplos alvos, que atuam sinergicamente para controlar o crescimento de tumores e da neovascularização (MUKHERJEE et al., 2013). Além disso, agregar valor tecnológico no desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo extratos vegetais, aplicáveis a nichos de mercados inexplorados, favorece, também, o isolamento de novos bioativos que sejam eficazes na prevenção da fotocarcinogênese, tornando-se promissores para o desenvolvimento da região.

#### 1.1 OBJETIVOS

# 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial fotoprotetor do extrato bruto das folhas de *Ilex* paraguariensis como ingrediente para aplicação cosmética em formulações fotoprotetoras e antienvelhecimento, empregando métodos *in vitro* e *in vivo*.

# 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extrato bruto hidroetanólico 40% das folhas de *llex paraguariensis* (EXB) por maceração;
- Determinar os teores de polifenóis, flavonoides e taninos;
- Avaliar a capacidade antioxidante do EXB por métodos in vitro;
- Identificar e determinar quantitativamente ácido clorogênico e ácido cafeico;
- Avaliar a citotoxicidade e a fotoestabilidade do EXB em culturas de células de fibroblastos da linhagem HFF-1;
- Avaliar o efeito do EXB, em diferentes concentrações, na atividade enzimática de metaloproteinases (MMPs) da pele de camundongos expostos ao UVB;
- Avaliar a degradação do colágeno, a atividade de MMPs e mieloperoxidases na pele de camundongos;
- Avaliar a eficácia fotoprotetora da formulação in vivo.

#### 1.2 JUSTIFICATIVA

A procura por novos ativos que sejam eficazes na prevenção da fotocarcinogênese atuando como coadjuvantes na prevenção do câncer e/ou modulando o processo inflamatório, decorrente da exposição à RUV, concomitante com a crescente procura dos consumidores por produtos naturais que minimizem os efeitos do tempo, impulsionam pesquisas por um novo bioativo que seja um potencial inibidor das MMPs.

Neste sentido, torna-se relevante estudar os efeitos *in vitro* do extrato das folhas de erva-mate, conhecida por sua propriedade antioxidante, na atividade enzimática de MMPs; e contribuir para o estudo da prevenção promovida pela formulação tópica contendo esse extrato, nas alterações precoces causadas pela exposição aguda ao UVB, que podem ampliar e reforçar o emprego dessa matéria-prima como agente potencialmente útil na atenuação dos danos provocados por radiação UV.

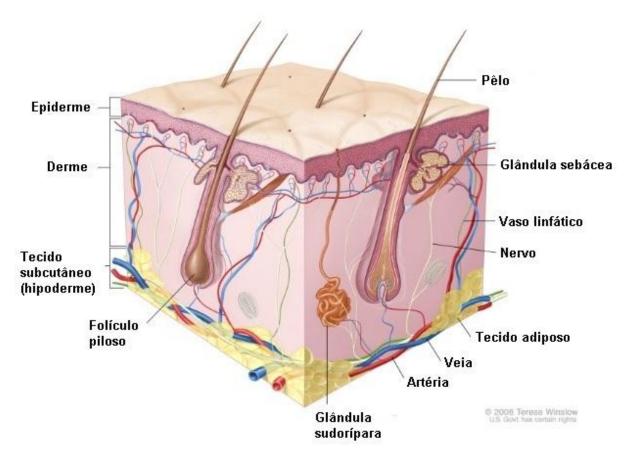
# **2 REVISÃO DE LITERATURA**

#### 2.1 PELE E FOTOENVELHECIMENTO

A pele é o maior órgão do corpo humano e com o passar do tempo, assim como outros órgãos, sofre alterações deletérias associadas às alterações hormonais e dietéticas. Ao contrário da maioria dos outros órgãos, ela é diretamente afetada pela exposição direta ao meio ambiente, especialmente à radiação ultravioleta (RUV). Além de atuar como barreira química, física e bacteriológica, impede a desidratação corporal por evaporação, permite a termorregulação corporal através dos vasos sanguíneos e glândulas sudoríparas. Além dessas funções vitais, medeia o sentido do tato e desempenha um papel importante na vigilância imunológica, produção hormonal e na comunicação social (RITTIÉ; FISHER, 2015).

Esse órgão é complexo e composto por diferentes camadas com estruturas especializadas denominadas de apêndices (folículos pilosos, glândulas sudoríparas, apócrinas, écrinas e glândulas sebáceas) e consiste de tipos heterogêneos de células e componentes extracelulares (ARAÚJO, 2015). Estruturalmente, apresenta uma série de camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 2).

Figura 2 – Camadas da pele e seus apêndices



Fonte: National Library of Medicine (2016).

A epiderme é a camada mais superficial desse tecido, sendo avascular e queratinócitos composta principalmente por organizados em um pavimentoso estratificado. Os queratinócitos são células que produzem queratina, filamentos que proporcionam estabilidade mecânica, e constantemente sofrem diferenciação, para manter a homeostase do orgão. Os queratinócitos com alta taxa de proliferação residem na camada basal, que se apoia na membrana basal da junção dermo-epidérmica. A maturação dos queratinócitos envolve a perda da capacidade proliferativa e sua diferenciação em corneócitos. A diferenciação ocorre na medida em que os queratinócitos migram até a superfície do tegumento cutâneo atravessando o estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (ARAÚJO, 2015; NOTMAN; ANWAR, 2013; QUAN; FISHER, 2015).

O estrato córneo é produzido na fase final da diferenciação da epiderme viável, quando as células epidérmicas são transformadas em corneócitos achatados, ricos em queratina, e uma mistura de lipídios (composto por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres) que são lançadas para o espaço intercelular. Os corneócitos e

lipídios são conhecidos por formar um arranjo do tipo "tijolo e argamassa", sendo os corneócitos ("tijolos") envolvidos pelas camadas contínuas de lipídios ("argamassa") (ARAÚJO, 2015; NOTMAN; ANWAR, 2013; QUAN; FISHER, 2015).

A derme, unida à epiderme por meio da junção dermo-epidérmica, é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. A principal proteína da derme é o colágeno, que juntamente com as proteínas (elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos) formam a MEC (HWANG et al., 2011). As macromoléculas de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (0,1-0,3% do peso seco do tecido), atuam na promoção da hidratação, principalmente através da capacidade do ácido hialurônico de se ligar à água (FRANTZ et al., 2010; HWANG et al., 2011).

O colágeno constitui cerca de 90% do peso seco da pele e 25 a 35% do total de proteínas do corpo humano. O colágeno do tipo I é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo dérmico, que junto com outros tipos de colágeno (III, V e XIV) e outras proteínas da MEC, formam as fibrilas de colágeno. Estas fibrilas fornecem suporte mecânico e sustentação para a fixação celular. O procolágeno tipo I (precursor do colágeno) é secretado pelos fibroblastos no espaço extracelular dérmico, onde sofre um processamento enzimático, organizando-se em uma configuração de tripla hélice. Esses complexos de tripla hélice associam-se com outras proteínas da MEC para formar as estruturas fibrilares. Esse processo resulta na formação da rede de colágeno, responsável pela força e resiliência da estrutura dérmica (QUAN, 2016; RITTIÉ; FISHER, 2002). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como reserva energética (composta por adipócitos), protege contra choques mecânicos e serve como isolante térmico (BARRY, 2001; QUAN, 2016).

O envelhecimento começa desde o nascimento, sendo um processo degenerativo multissistêmico que envolve a pele e os seus sistemas de suporte, como os ossos, cartilagens e compartimentos subcutâneos. Porém, as pessoas estão vivendo por mais tempo, fato decorrente dos avanços na medicina: tecnologias de imunização, transplante de órgãos, redução de infecções e equipamentos de suporte que tornaram-se mais acessíveis à população. Em muitos países, inclusive no Brasil, está ocorrendo uma transição demográfica, que envolve o envelhecimento da população e redução da taxa de natalidade. Com isso, há relevância nas terapias antienvelhecimento, pois as pessoas desejam viver mais possuindo uma aparência mais jovem (SILVEIRA; PEDROSO, 2014).

No entanto, as mudanças no tegumento cutâneo são mais perceptíveis, ocorrendo alterações bioquímicas e estruturais; na permeabilidade; na resposta às lesões; na capacidade de reparação e no aumento da incidência de doenças cutâneas. Diversos fatores influenciam o processo de envelhecimento, tais como: os genéticos, a exposição ambiental (radiação UV, xenobióticos, estresse mecânico), alterações hormonais e os processos metabólicos (geração de compostos químicos reativos como espécies de oxigênio, açúcares e aldeídos) levando às alterações cumulativas na estrutura, função e aparência da pele (SILVEIRA; PEDROSO, 2014.

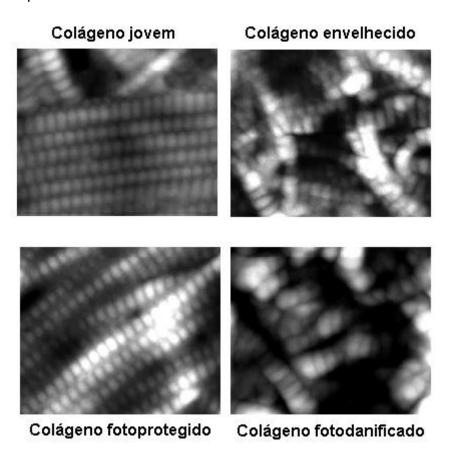
O fotoenvelhecimento ou envelhecimento extrínseco pode ser descrito como um acréscimo de danos induzidos pela radiação UV ao envelhecimento intrínseco ou cronológico (FISHER et al., 2002; YAAR; GILCHREST, 2013). Embora a aparência das peles fotoenvelhecida e envelhecida cronologicamente sejam distintas, os mecanismos moleculares que levam ao processo são semelhantes. A concordância dos mecanismos sugere que a RUV acelera os processos que desencadeiam o envelhecimento intrínseco. Ao contrário do envelhecimento intrínseco, que é prédeterminado pela predisposição do indivíduo, o fotoenvelhecimento depende do grau de exposição solar e da quantidade de melanina na pele. Pessoas que vivem em regiões ensolaradas com intensa exposição ao sol e que possuem pele clara irão apresentar mais intensamente as consequências do fotoenvelhecimento (PANDEL et al., 2013; RITTIÉ; FISHER, 2002).

Análises histológicas mostram que as principais alterações na estrutura cutânea fotoenvelhecida ocorrem no tecido conjuntivo da derme, principalmente nas estruturas do colágeno e elastina (FISHER et al., 1997; 1998). Como a elastina e o colágeno são os responsáveis por proporcionar elasticidade e força ao tecido, a degeneração desses faz com que ela se torne frágil e facilmente danificada. Histologicamente, danos no tecido conjuntivo causados por RUV manifestam-se por desorganização das fibrilas de colágeno e acumulação maciça de material elastótico amorfo. No entanto, a pele naturalmente envelhecida difere da fotoenvelhecida, possuindo um menor acúmulo dessas alterações e, quando comparada a pele naturalmente envelhecida e a pele jovem, há uma diminuição na produção de colágeno com o passar do tempo (FISHER et al., 2009; QUAN; FISHER, 2015).

A Figura 3 mostra imagens de fibrilas de colágeno por microscopia de força atômica. Em peles jovens (20 – 30 anos) ou protegidas do sol (50 – 60 anos) as fibrilas de colágeno são intactas e bem organizadas. No entanto, em peles idosas (+

80 anos) ou expostas ao sol (50 – 60 anos), as fibrilas de colágeno são fragmentadas e desorganizadas (QUAN, 2016).

Figura 3 – Fibrilas de colágeno de peles envelhecidas, jovens protegidas e expostas do sol



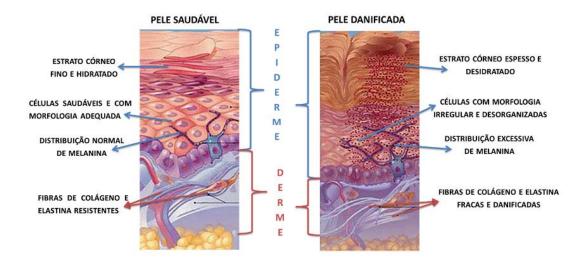
Fonte: (QUAN, 2016).

Sendo assim, o tecido naturalmente envelhecido e fotoenvelhecido compartilham características moleculares comuns, caracterizada por redução na produção e aumento da degradação do colágeno. Essa homeostase alterada do colágeno caracteriza o envelhecimento do tecido conjuntivo, reduzindo a integridade estrutural e mecânica e provocando doenças relacionadas com a idade, causadas pela função prejudicada dos fibroblastos dérmicos (QUAN, 2016).

As alterações cutâneas são influenciadas por diversos fatores (a incidência solar, o tempo de exposição) que implicam em consequências deletérias ao tecido. A exposição aguda provoca queimaduras solares, alterações na pigmentação, inflamação e imunossupressão. A exposição crônica (Figura 4) leva ao acúmulo

desses efeitos e causa o rompimento da arquitetura normal da pele, causando o envelhecimento prematuro e câncer (QUAN et al., 2009; 2016).

Figura 4 – Principais danos causados na pele devido à exposição crônica à RUV



Fonte: Siqueira (2014).

A epiderme é diretamente exposta à RUV, podendo ocorrer a presença de células de queimadura solar (*sunburn cells*), caracterizando um carcinoma de origem epidermal. Além disso, a derme também é alterada pela formação de elastose solar e desorganização da MEC, que ocorre durante o fotoenvelhecimento (SIQUEIRA, 2014).

A RUV pode ser dividida em três regiões espectrais, UVA (315-400 nm), UVB (290-315 nm) e UVC (200-290 nm). As principais regiões espectrais envolvidas no fotoenvelhecimento são as radiações UVA e UVB, pois a radiação UVC é quase totalmente absorvida pela camada de ozônio (Figura 5) (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006). Considerando que a quantidade de energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, UVB emite mais energia que o UVA. Assim, a radiação de menor comprimento de onda, possui maior energia, sendo potencialmente mais prejudicial. No entanto, a UVA possui um maior poder de penetração e atinge as camadas mais profundas, considerando que o UVB afeta principalmente a epiderme e a derme papilar (DUPONT; BILODEAU, 2013; SILVEIRA; PEDROSO, 2014).

ESPECTRO SOLAR

DINORO DE LA LUZ VISIVEL

ESTRATO CÓRNEO

P

E

L

E

H

U

M

A

N

A

Odin

Od

Figura 5 – Profundidade de penetração das regiões espectrais da radiação UV na pele

Fonte: Siqueira (2014).

A capacidade da luz UV em induzir a formação de fotoprodutos de DNA diminui exponencialmente com o aumento do comprimento de onda, sugerindo que a radiação UVA ainda é capaz de gerar danos ao DNA, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FREEMAN e col., 1987; MATSUNAGA e col., 1991; KIELBASSA e col. 1997; LEY; FOURTANIER, 2000). A absorção da radiação UVB pelo DNA resulta principalmente na formação de fotoprodutos como os dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD) e de pirimidina-pirimidona [(6-4) PD] (Figura 6); enquanto que a radiação UVA promove indiretamente o dano ao DNA pela oxidação de resíduos de guanina, formando o fotoproduto 8-oxo-7,8-diidro-2' -deoxiguanosina (8-oxo-dG) (WONDRAK e col., 2006).

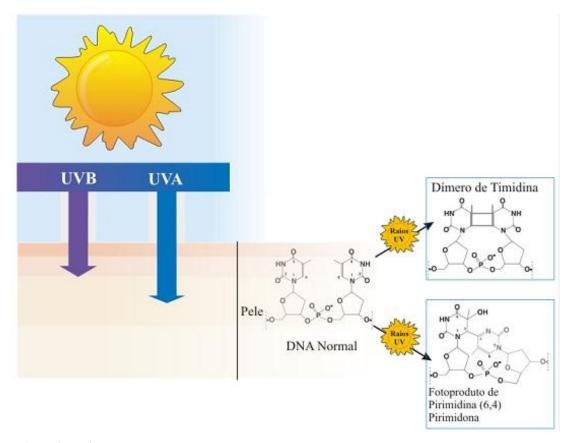


Figura 6 – Fotoprodutos gerados pela exposição do DNA à radiação UVB

Fonte: Barg (2014).

O principal modo de ação da radiação UVA se dá pelo dano indireto ao DNA, gerando EROs e estimulando a produção de melanina, que leva ao bronzeamento da pele; podendo, inclusive, induzir alterações no compartimento dérmico. A radiação UVB afeta diretamente a epiderme, danificando o DNA e ocasionando queimadura solar, contribuindo para alterações dérmicas através de mecanismos indiretos, como a liberação de fatores de crescimento (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

Dependendo do tempo de exposição, comprimento de onda e da região exposta, essas interações podem produzir, direta ou indiretamente, efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células da pele (DE GRUIJL, 2002). A RUV desencadeia reações fotoquímicas a partir da excitação de elétrons em moléculas cromóforas, podendo interagir diretamente com substratos moleculares, como o DNA (reações de fotossensibilização tipo I) ou indiretamente, gerando oxigênio molecular (reações de fotossensibilização tipo II) e produzindo EROs (WONDRAK et al., 2006).

O estresse oxidativo promovido pela RUV (foto-oxidação) ocorre devido à formação de EROs por cromóforos endógenos, atuando como fotossensibilizadores (SCHARFFETTER-KOCHANEK e col., 1997). Apesar das EROs serem rapidamente removidas por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, tioredoxina redutase e glutationa peroxidase) e não-enzimáticos (tocoferol, glutationa e ácido ascórbico), a sua exacerbação na pele pode resultar na deterioração estrutural e funcional das células, levando ao estresse e dano oxidativo fótico de proteínas e outras macromoléculas (SANDER et al., 2002).

O estresse foto-oxidativo apresenta papel central no início e na condução da resposta celular (RITTIÉ et al., 2002), ativando vias de sinalização celular como a indução da proteína p53 (MÉPLAN et al., 2000) e das proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPK) (ASSEFA et al., 1997; IORDANOV et al., 1998); além de influenciar na resposta inflamatória e nas MMPs (INOMATA et al., 2003; ONOUE et al., 2003; RITTIÉ et al., 2002).

Além do estresse oxidativo, a formação de EROs pode induzir a degradação oxidativa de membranas lipídicas e consequente liberação de ácido araquidônico. Simultaneamente, a radiação UVB leva ao aumento da expressão gênica e proteica de ciclooxigenase (COX)-2 em culturas de queratinócitos, promovendo a proliferação de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) reforçando a resposta inflamatória (BUCKMAN et al., 1998).

O aumento da COX-2 atua como inibidor da apoptose, aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (TSUJII et al., 1995). Devido a isso, a produção de COX-2 pode ser utilizada como marcador de tumorigênese da pele (BUCKMAN et al., 1998). A inibição de COX-2 após a exposição de queratinócito à RUV diminuiu a proliferação e diferenciação de queratinócitos e aumentou a apoptose de células danificadas (TRIPP et al., 2003). Sendo assim, a inibição de COX-2 pode representar uma boa alternativa com valor terapêutico na prevenção de neoplasias cutâneas induzidas por RUV (ASSEFA et al., 2005).

Li e colaboradores (2015), investigaram os efeitos benéficos potenciais de drogas anti-inflamatórias não esteroidais para a deficiência de colágeno em peles envelhecidas de biópsias humanas, afim de avaliar agentes que poderiam retardar a deficiência de colágeno relacionado com a idade via a inibição da síntese e ação de PGE<sub>2</sub>. Concluíram que os RNAm da PGE<sub>2</sub> sintase e COX-2 aumentaram 3,4 vezes e 2,7 vezes, respectivamente, na derme dos idosos (>80 anos) e dos jovens (21-30

anos). A inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> por diclofenaco melhorou a produção de colágeno em culturas de peles. Além disso, a redução da força mecânica de fibroblastos elevou a produção de PGE<sub>2</sub>, contribuindo para a redução de colágeno.

## 2.2 METALOPROTEINASES E VIAS DE SINALIZAÇÃO

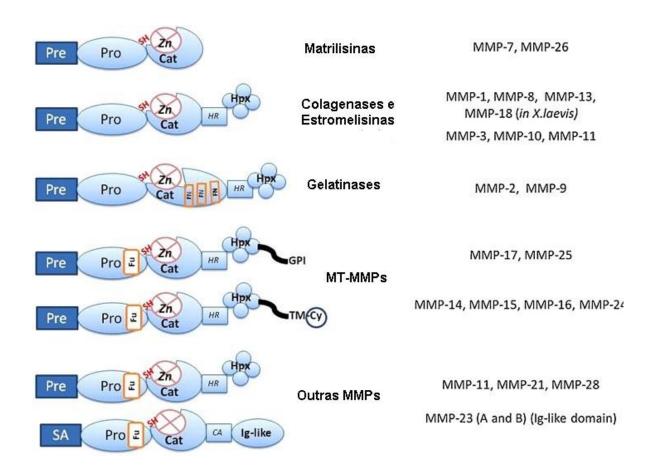
Uma única exposição à RUV, equivalentes à 2 MED (dose eritematosa mínima), provoca a perda quase completa da síntese de procolágeno, que persiste por 24 horas e recupera após 48 a 72 horas da exposição (FISHER et al., 2000). Esta redução na síntese de procolágeno ocorre provavelmente por mediação da via de sinalização do fator de crescimento tecidual β (TGF-β), que controla a expressão de procolágeno (QUAN et al., 2005). Os principais mediadores da degradação do colágeno observados na pele fotoenvelhecida são as metaloproteinases (QUAN; FISHER, 2009).

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases cálcio e zinco-dependentes, pertencente ao clã das metzincinas das metalopeptidases. São produzidas por várias células e secretadas como zimógenos (enzimas inativas) ou pró-metaloproteinases (pro-MMPs) (CHOI et al., 2016). São compostas por 30 membros, entre esses as colagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelisinas (MMP-3, -10, -11), MMPs tipo membrana ou MT-MMPs (MMP-14, -15, -17) e matrilisinas (MMP-7, -16) (DORMÁN et al., 2010). Estas enzimas degradam os componentes da matriz extracelular (MEC) tanto em processos fisiológicos (embriogênese, reprodução e remodelação tecidual) quanto patológicos (artrite, osteopatias, inflamação e câncer) (MANOSROI et al., 2012; SAITO et al., 2016).

Com relação à estrutura das MMPs (Figura 7), todas possuem três domínios em comum: um peptídeo N-terminal; pró-domínio ou pró-peptídeo, que contém aproximadamente 80 aminoácidos, grupo tiol (-SH) e um sítio de clivagem furina; e um domínio catalítico (Cat) que contém o íon zinco (Zn²+). Este íon situa-se em uma fenda grande e relativamente rasa, o que facilita a ligação de inibidores e substratos. O pró-domínio (Pro, 160 – 170 aminoácidos) contém uma sequência de aminoácidos denominada "cysteine switch". A interação do grupo tiol da cisteína 99 (Cys99) do pró-domínio com o íon zinco do domínio catalítico mantém a enzima como um

zimógeno inativo (pro-MMP) (MANNELLO; MEDDA, 2012; VANDOOREN et al., 2013).

Figura 7 – Estrutura dos domínios das MMPs.



Pre: sequência aminoterminal. Pro: pró-domínio. SH: grupo tiol. Zn: sítio de ligação do zinco. Fu: furina. Cy: domínio citoplásmico. TM: domínio transmembrana. GPI: glicosilfosfatidilinositol. SA: âncora aminoterminal. FN: fibronectina. Cat: domínio catalítico. Hpx: domínio hemopexina. Fonte: Mannello e Medda (2012).

Além destes domínios em comum, a maioria das MMPs (exceto as matrilisinas) possuem um domínio hemopexina C-terminal (Hpx), que contém uma ligação dissulfeto (S-S) entre o primeiro e último subdomínio, que é vinculado ao domínio catalítico. O domínio Hpx está relacionado com a especificidade pelo substrato e interage com inibidores e receptores celulares (MANNELLO; MEDDA, 2012; VANDOOREN et al., 2013).

As gelatinases (MMP-2 e -9) possuem exclusivamente três unidades de fibronectina II localizadas no domínio catalítico. Essas unidades servem como um domínio de ligação com alta afinidade pela cadeia α1 do colágeno tipo IV, elastina e

gelatina, induzindo o desenrolamento da tripla-hélice do colágeno. Excepcionalmente, a MMP-9 possui um domínio O-glicosilado, anteriormente denominado de domínio do colágeno tipo V, por possuir uma sequência semelhante de aminoácidos. Está localizado entre o domínio CAT e o domínio Hpx, sendo importante para a flexibilidade e função da MMP-9 (LÖFFEK et al., 2011; MANNELLO; MEDDA, 2012; SELA-PASSWELL et al., 2010; VANDOOREN et al., 2013).

As atividades dessas enzimas são fortemente controladas por quatro mecanismos diferentes: (1) expressão gênica com regulação transcricional e póstranscricional; (2) acumulação pericelular das MMPs, denominado compartimentalização; (3) ativação da pró-enzima (pro-MMP) por remoção do pródomínio e (4) inibição por inibidores específicos (inibidores teciduais de MMPs – TIMPs) e inespecíficos (α-macroglobulina, etc.) (LÖFFEK et al., 2011; SELA-PASSWELL et al., 2010).

As MMPs podem ser ativadas por outras proteinases ou por agentes químicos que modificam o radical tiol (APMA, HgCl<sub>2</sub>), glutationa oxidada, SDS, agentes caotrópicos e EROs. O rápido aquecimento e pH baixo também podem promover a ativação, alterando a ligação do zinco com a cisteína do "cysteine switch". A ativação proteolítica das MMPs ocorre de forma gradual, na região exposta do pró-peptídeo. Uma parte deste pró-peptídeo é removida, desestabilizando o restante do domínio, inclusive a interação entre o zinco catalítico e a cisteína, permitindo o processamento molecular por outras MMPs ativas. Este sistema de ativação progressiva permite que ocorra a regulação da ativação pelas TIMPs, que interage com a MMP parcialmente ativa inibindo sua ativação total (MANNELLO; MEDDA, 2012).

A maioria das pro-MMPs são secretadas nas células e ativadas extracelularmente por clivagem proteolítica do domínio amino-terminal (pró-domínio) ou mudança conformacional (CHOI et al., 2016). A ativação pode ser realizada por outras MMPs ativas que podem clivar as ligações peptídicas do pró-domínio. No entanto, a pro-MMP-2 é refratária à ação das serinas proteinases, sendo ativadas na superfície celular através de um caminho com várias etapas envolvendo as MT-MMPs (MANNELLO; MEDDA, 2012).

A MT1-MMP liga-se ao domínio N-terminal da TIMP-2, sendo assim inibida O domínio C-terminal do TIMP-2 atua como um receptor da hemopexina da pro-MMP-2

e uma MT1-MMP adjacente cliva e ativa a pro-MMP-2. Após a clivagem, uma parte residual do pró-domínio da MMP-2 é removida por outra MMP-2 para produzir a sua forma ativa. (MANNELLO; MEDDA, 2012).

As enzimas podem ser ativadas indiretamente também pelo excesso de produção de EROs, que podem causar danos ao DNA e indiretamente induzirem a liberação das MMPs. Inclusive, sendo capazes de inibir as enzimas que são as inibidoras endógenas das MMPs (TIMPs), por uma reação oxidativa direta, contribuindo assim com o progresso de tumores e o fotoenvelhecimento (MA et al., 2001). Reduzir o estresse oxidativo pode ser uma das mais importantes alternativas de redução e prevenção de doenças, como o câncer. No entanto, sabe-se que a ativação de algumas pró-enzimas como, por exemplo, da pro-MMP-2, não depende apenas das EROs, mas também da MMP tipo membrana-1 (MT1-MMP) e TIMP-2 (ALMEIDA et al., 2008; HAN et al., 2001; MANOSROI et al., 2012).

O equilíbrio entre a produção das MMPs ativas e sua inibição são fundamentais para evitar a desregulação da homeostase das proteínas da MEC, do crescimento celular e inflamação. Sendo assim, as MMPs possuem dois principais inibidores endógenos, que são a α2-macroglobulina (inibidor nos fluidos corporais) e as TIMPs (inibidores teciduais) (LÖFFEK et al., 2011).

Várias classes de compostos sintéticos agem como inibidores das MMPs, principalmente os que possuem ácido hidroxâmico em sua estrutura, possuindo a capacidade de quelar o zinco; ácido carboxílico ou grupo tiol anexado a um fragmento de peptídeo pequeno com capacidade de se ligar aos sítios das MMPs. Os compostos biologicamente ativos de fontes naturais também possuem a capacidade de inibir as MMPs, como epigalocatequina galato (chá verde), resveratrol, curcumina, entre outros (MANNELLO; MEDDA, 2012; ZHANG; KIM, 2009). Os antioxidantes naturais, aplicados topicamente ou administrados oralmente apresentam uma perspectiva promissora de prevenção destas doenças por enriquecer o sistema de proteção cutâneo endógeno.

Gelatinase B (MMP-9 ou 92 kD gelatinase) e gelatinase A (MMP-2 ou 72 kD gelatinase) são dois membros intimamente relacionados da família que degradam colágeno desnaturado, gelatina e outras proteínas da MEC como colágeno tipos IV, V e XI; laminina e agrecanos. No entanto, somente a MMP-2 é capaz de degradar colágeno tipos I, II e III similarmente às colagenases, porém com atividade mais fraca (MURPHY et al., 2008; VISSE; NAGASE, 2003). A atividade colagenolítica

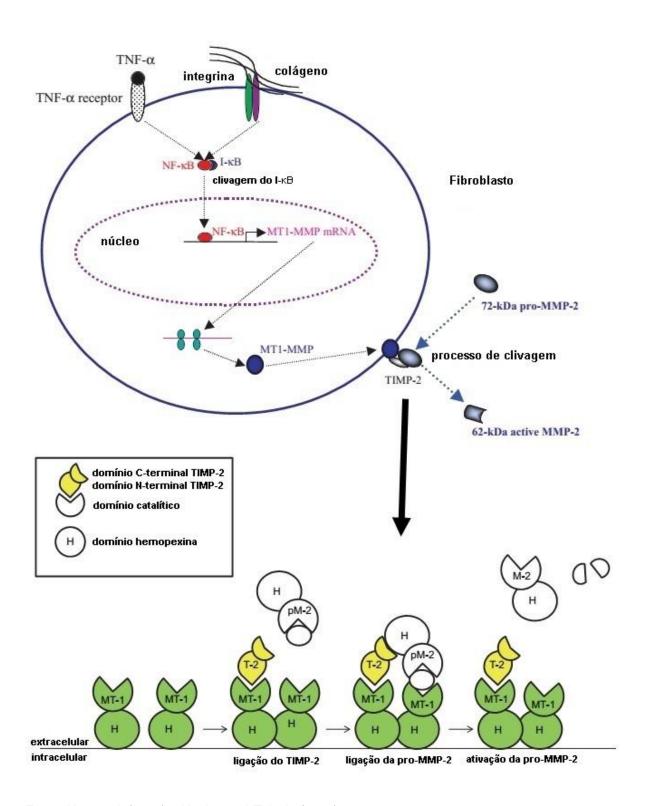
menor da MMP-2 se deve ao fato de que a pro-MMP-2 é recrutada para a superfície celular e ativada pelas MT-MMPs (exceto MT4-MMP), que podem apresentar atividade colagenolítica razoável sobre ou perto da superfície celular (NAGASE et al., 2006).

Expressos prontamente no desenvolvimento embrionário, MMP-9 é em grande parte silenciosa em muitos tecidos humanos, enquanto a MMP-2 é constitutivamente expressa em tecidos saudáveis (ZHOU et al., 2009). O aumento da expressão e atividade de MMPs 2 e 9 são, também, observados em consequência do processo inflamatório que acompanha a exposição a radiações UV (ROPKE et al., 2006). Estas enzimas são as responsáveis pela transdução dos sinais do fotoenvelhecimento cutâneo e a inibição das suas atividades poderia abrandar o processo de envelhecimento cutâneo (LEE et al., 2016). A indução de MMP-2 é mediada por fenômenos acelerados na pele humana envelhecida, levando à perda da elasticidade e o aparecimento de rugas. Com isso, o controle sobre o metabolismo do colágeno é útil para uma variedade de aplicações terapêuticas e cosméticas (MANOSROI et al., 2012).

O fator de necrose tumoral-α (TNF-α) é uma citocina muito importante no processo de fotoenvelhecimento. A secreção desta citocina por queratinócitos e fibroblastos é induzida pela radiação UVB. TNF-α medeia a inflamação e a resposta imune ativando a cascata de sinalização do NF-κB, que na pele regula a expressão de muitos genes que estão envolvidos no início da resposta inflamatória, incluindo citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas, MMPs e a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (BASHIR et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

Com isso, o possível mecanismo de indução ou ativação da MMP-2 foi proposto por Han e colaboradores (2001). Segundo os autores, o TNF-α promove a ativação da pro-MMP-2 em cultura de pele humana. TNF-α também medeia a ativação em cultura de fibroblastos dérmicos, mas somente quando esses foram cultivados com colágeno tipo I, sugerindo que o microambiente da MEC também é importante para a regulação da atividade enzimática. Os autores mostraram também que a estimulação da via de sinalização do fator nuclear-κB (NF-κB) é essencial para que o TNF-α possa induzir a MT1-MMP pelos fibroblastos para que estes possam ativar a pro-MMP-2 (Figura 8).

Figura 8 – Mecanismo proposto da indução de MT1-MMP para ativação da pro-MMP-2 para MMP-2



Fonte: Han et al. (2001) e Honkavuori-Toivola (2014).

A ligação do TNF-α e do colágeno tipo I aos seus respectivos receptores ativa a via de sinalização do NF-κB, induzindo a inibição de IκB (inibidor de NF-κB). NF-κB

transloca-se do citosol para o núcleo promovendo a transcrição do gene do MT1-MMP (*mt1-mmp*). A proteína de MT1-MMP gerada é translocada para a membrana plasmática, formando um complexo funcional com TIMP-2. Em contrapartida, o gene de transcrição da MMP-2 (*mmp2*) é constitutivamente ativa em fibroblastos e a pro-MMP-2 acumula-se no meio extracelular. A quantidade aumentada de MT1-MMP na membrana provoca a clivagem do pró-domínio N-terminal da pro-MMP-2, aumentando assim a quantidade de MMP-2 ativa (HAN et al., 2001).

A MMP-9 possui um papel importante na regulação da biologia de leucócitos no contexto da resposta inflamatória (OPDENAKKER et al., 2001; ROSARIO et al., 2004). Neutrófilos estão presentes na derme 6 h após a irradiação e seu número aumenta significativamente após 24 h da irradiação (LEE et al., 2008; SCHOMAGEL et al., 2004). Assim, a liberação de MMP-9 após exposição à radiação UV é uma combinação da liberação por queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos infiltrados na pele, e o desenvolvimento de inibidores de MMP é um importante foco para prevenir as lesões induzidas pela radiação solar (VAYALIL e col., 2004).

A expressão de pro-MMP-9 é regulada por muitos mediadores como TNF-α, IL-1β, TGF-β, oncogenes e promotores de tumores (HAN et al., 2001b). Na pele, a MMP-9 é muito pouco expressa e a TIMP-1 é constantemente expressa. Durante os processos inflamatórios, TGF-β induz a expressão de pro-MMP-9, e esta indução é potencializada pela associação com o TNF-α (HAN et al., 2002).

No entanto, o mecanismo de expressão de pro-MMP-9 mais aceitável foi o mostrado por Steenport e colaboradores (2009). Os autores demonstraram que a MMP-1 (colagenase-1) e MMP-3 (estromelisina-1), comumente presentes em tecidos inflamados e neoplásicos, em contato com macrófagos, estimulam estas células a expressarem MMP-9 através da liberação de TNF-α e subsequente indução de COX-2, bem como a ligação de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) com receptores EP4, promovendo a liberação de MMP-9 (Figura 9). O bloqueio ou inibição de qualquer um destes mediadores e citocinas prejudica a liberação de MMP-9. Todavia, o mecanismo é totalmente dependente de TNF-α, pois não há indução de MMP-9 pelas proteinases nos macrófagos com bloqueio da liberação de TNF-α. Neste estudo foi utilizado também o celecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, o qual foi pré-incubado com os macrófagos, impedindo a expressão de MMP-9.

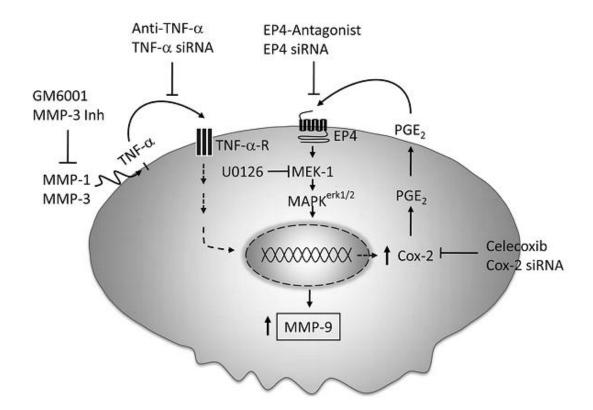


Figura 9 – Mecanismo de expressão de MMP-9 via TNF-α e COX-2/PGE<sub>2</sub>

Fonte: Steenport et al. (2009).

#### 2.3 ILEX PARAGUARIENSIS A. ST. HIL.

#### 2.3.1 Aspectos gerais

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate) é uma planta arbórea de folhas perenes, umbrófila e da família Aquifoliacea (MASUCHOWSKI, 1991; RESENDE et al., 2002). Existem cerca de 550 a 600 espécies do gênero *Ilex* (KARAS, 1982; MAZUCHOWSKI, 1991), sendo a maioria de origem asiática (ALIKARIDIS, 1987).

*llex paraguariensis* A. St. Hil, é o nome científico da erva-mate, que foi classificada em 1822 pelo viajante e pesquisador francês Auguste de Saint-Hilarie (1779-1853) no início do século XIX. Atualmente, os conceitos de erva-mate e mate são polissêmicos, ou seja, a erva-mate pode significar tanto a planta quanto o produto final, que é o pó resultante do beneficiamento das folhas, pecíolos e ramos (MAZUCHOWISKI, 1991; MOLINA, Javier; MOLINA, José, 2004).

Em relação a origem etimológica, erva-mate, provém de "mate", que na língua indígena significa porongo, cuia ou cabaça, recipiente feito do fruto maduro da

cucurbitácea *Legenaria vulgaris*. Ou seja, o nome "erva-mate" vem do recipiente que contêm a bebida (chimarrão). Os maiores consumidores do chimarrão, os índios guaranis, a denominavam caiguá, nome que corresponde a caá (erva), i (água) e guá (recipiente), deste modo, recipiente para a água da erva (MAZUCHOWISKI, 1991; MOLINA, Javier; MOLINA, José, 2004).

Ao considerar sistemas agrícolas atuais com adensamentos e podas regulares, a árvore de erva-mate atinge em torno de 2 metros, no entanto, sob condições favoráveis, pode atingir até 15 metros (BRAGAGNOLO, 1980; MAZUCHOWSKI, 1991; VALDUGA, 2002).

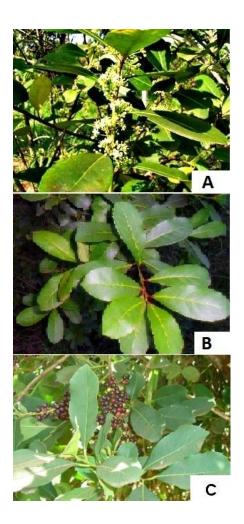
O tronco da erva-mate é cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, a copa é baixa e com folhagem verde escura (FERREIRA FILHO, 1957). Os ramos são cilíndricos ou subcilíndricos, cinzentos com 20 a 25 mm de diâmetro, podendo alcançar até 50 mm. As suas folhas (10B) mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice, medem de 8 a 10 cm de comprimento por 4 a 5 cm de largura; suas bordas apresentam pequenos dentes, visíveis principalmente na metade do limbo para a extremidade (BRAGAGNOLO, 1980; MAZUCHOWSKI, 1991). Estas folhas são alternas, geralmente estipuladas, subcoriáceas, glabras, verde-escuras em cima e claras em baixo; limbo foliar obovado com 5 a 10 cm de comprimento, por 3 a 4 cm de largura; margem irregular serrilhada ou dentada; pecíolo relativamente curto com 7 a 15 mm de comprimento (CARVALHO, 2003).

O cultivo da erva-mate é realizado por pequenos produtores rurais ou pelas próprias indústrias ervateiras (RESENDE et al., 2000), aparecendo como uma das espécies arbóreas naturais de maior importância econômica nas regiões de ocorrência. O seu valor socioeconômico está atribuído ao fato de ser uma das espécies que sofre pouco com as oscilações climáticas, quando comparada aos cultivos agrícolas em geral, apresentando, portanto, grande relevância para a fixação do homem ao campo (VIDOR et al., 2002). A área de dispersão natural da erva-mate abrange aproximadamente 540.000 km², compreendendo às regiões tropicais e subtropicais do Brasil, Argentina e Paraguai. Situada entre as latitudes de 21º e 30º sul e longitudes de 48º e 56º oeste, com altitudes variáveis entre 200 e 1200 metros, podendo ocorrer, em pontos isolados, fora destes limites (OLIVEIRA; ROTTA, 1985).

#### 2.3.2 Aspectos fenológicos

A erva-mate floresce (Figura 10A) no mês de outubro e frutifica entre janeiro e abril. O fruto (Figura 10C) muda de cor durante a formação e maturação, que não ocorre simultaneamente, passando do verde, ao vermelho e ao preto. As sementes, em número de quatro por fruto, são tão pequenas que é necessário reunir cerca de 140.000 delas para somar um quilograma (GERHARDT, 2013).

Figura 10 – Representação das folhas (A), flores (B) e frutos (C) de *I. paraguariensis* 



Fonte: Gerhardt (2013).

A dormência é uma adaptação da planta ao ambiente, uma condição especial de suspensão do crescimento. O embrião dormente de uma semente pode ser ativado apenas por certos sinais do ambiente, como o frio. A semente da erva-mate tem dois mecanismos de suspensão: um está ligado à resistência da casca

(tegumento) e o outro está associado à imaturidade do embrião (GERHARDT, 2013).

A passagem da semente de *Ilex paraguariensis* pelo sistema digestivo de algum animal e/ou sua permanência no solo por cinco meses ou mais, são condições naturais para que a dormência seja superada. Pelos frutos maturarem irregularmente no verão e início do outono, estes contêm sementes que permanecem em dormência durante o inverno e germinam na primavera, época na qual as condições são mais favoráveis ao desenvolvimento da nova planta. Mesmo assim, somente uma parte das sementes germinam (GERHARDT, 2013).

A erva-mate dentro da sua biodiversidade e as complexas interações que ocorrem no ecossistema que ela integra, também podem ser analisadas na dimensão dos vegetais. A ocorrência da erva-mate é endêmica, ou seja, existiu na forma silvestre exclusivamente em uma região florestal do Sul da América, com concentração em uma área que corresponde hoje a parte do território dos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, à província de Misiones na Argentina e ao Leste do Paraguai (GERHARDT, 2013). A área de ocorrência da erva-mate está representada na Figura 11.

Esta área coincide aproximadamente com as grandes bacias hidrográficas dos rios Paraná, Paraguai, Iguaçu e Uruguai e com algumas de suas sub-bacias, como as dos rios Ijuí e Turvo no Rio Grande do Sul e a do rio Negro, na divisa entre Santa Catarina e Paraná. A ocorrência também está associada à altitude, com maior presença da erva-mate em terrenos situados entre 400 e 800 metros acima do nível do mar. Romario Martins, uma das autoridades no estudo do mate, relata a ocorrência silvestre também nos estados brasileiros de Minas Gerais e São Paulo (GERHARDT, 2013). Os autores Reitz, Klein e Reis (1988) afirmaram a ocorrência florestal da erva-mate em países como: Uruguai, Colômbia, Bolívia, Peru e Equador.

MAPA DO BRASIL

Estados em que ocorre
a Erva-mate.

Figura 11 – Área de ocorrência de I. paraguariensis

Fonte: Gerhardt (2013).

#### 2.3.3 Constituintes químicos e atividade farmacológica

Quanto a composição química das folhas de *I. paraguariensis*, destaca-se a presença de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), flavonóides (rutina, quercetina e isoquercitrina), taninos, saponinas, metabólitos primários (vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e C), ácido nicotínico, carotenos, colina, trigonelina, açúcares, ácidos graxos normais do butírico ao esteárico e aproximadamente 250 constituintes voláteis, com altos níveis de 2-butoxietanol e linalol, o que caracteriza o aroma da erva-mate (KRAEMER, 1997).

Os compostos fenólicos presentes nas folhas de *I. paraguariensis*, são os flavonóides como a quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercitrina), canferol-3-O-glicosídeo, canferol-3-O-rutinosídeo e quercetina livre, juntamente com os ácidos clorogênico, neoclorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e isoclorogênico, sendo este, uma mistura dos ácidos 4,5-3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico (KRAEMER, 1997).

As saponinas nas folhas de erva-mate foram investigadas por Shenckel e colaboradores (1997) observando que estas representam 5 a 10% do peso seco total e são glicosídeos do ácido oleanólico e do ácido ursólico, opondo-se a outras espécies de *Ilex* que apresentam baixos teores de saponinas. Em outro estudo, foram avaliados os perfis das frações saponosídicas de folhas e de frutos, identificando e isolando esses bioativos. Foram identificados cinco compostos: três sapogeninas e duas saponinas, que não foram detectadas nas folhas desta espécie. Entre as sapogeninas está o ácido ursólico, o ácido 3-β-acetóxiursólico e o ácido 23-hidróxiursólico, sendo a primeira notificação de sapogenina 23-hidroxilada descrita para a espécie. Das saponinas isoladas e identificadas, o glicosídeo I-*Ziyu* e o ilexosídeo II já haviam sido relatados para outras espécies de *Ilex* (TAKETA, 2001).

No fruto da *I. paraguariensis* foi verificado por Taketa, Breitmaier e Schenkel (2004) a presença do composto ilexosídeo II, uma das saponinas majoritárias econtrada nos frutos e ausente nas folhas. Os autores sugerem que o uso dos frutos alteraria significativamente o sabor do produto erva-mate e também poderia produzir efeitos fisiológicos ainda não conhecidos.

A composição química de plantas para chás, bem como a erva-mate, apresenta oscilação de acordo com a espécie, sazonalidade, idade da planta e das folhas, clima, tipo de cultivo e processamento (ESMELINDRO et al., 2002; LIN et al., 1996; LIN et al., 2003). Ao pesquisarem sete espécies do gênero Ilex na América do Sul, Filip e colaboradores (2001) concluíram que a espécie *paraguariensis* é a que apresenta maior teor de derivados do ácido cafeico. Streit e colaboradores (2007) pesquisaram as folhas de *I. paraguariensis* do estado de Santa Catarina e observaram teores significativamente superiores em ácido gálico e cafeína do que as do estado do Rio Grande do Sul.

O teor dos componentes minerais nas folhas e ramos da erva-mate "in natura" foi avaliado por Ribeiro (2005) onde os ramos apresentaram teores elevados de cálcio e menores de minerais. Giulian e colaboradores (2009) avaliaram o teor de minerais entre folhas processadas e ramos processados, encontraram resultados semelhantes, observando maior concentração de minerais nas folhas, exceto para o cálcio, zinco e titânio.

O teor de polifenóis, cafeína e teobromina nos talos presentes no produto erva-mate para chimarrão foram verificadas por D' Ávila e colaboradores (2007)

onde compararam a concentração destes compostos no período de inverno e verão, e não houve diferença estatísitica.

O conteúdo de cafeína, teobromina e teofilina foram estudadas em outras partes do vegetal como a casca, bem como em folhas adultas e jovens, no cortex e em frutos maduros e imaturos da planta (*I. paraguariensis*). Teofilina não foi detectada na casca, assim como no córtex e frutos. A cafeína foi sempre detectada em maiores níveis em tecidos novos. Na casca, a concentração de cafeína encontrada foi de 1484 mg/kg, sendo que o seu teor oscilou entre as partes da planta, no fruto maduro de 132 mg/kg até 9147 mg/kg para as folhas jovens. A concentração de teobromina na casca foi de 695 mg/kg, não sendo encontrada em frutos maduros. A maior concentração de teobromina ocorreu em folhas adultas sombreadas (4320 mg/kg) e o menor teor no córtex (151 mg/kg) (MAZZAFERA, 1994).

Compostos com propriedades antioxidantes, no caso dos polifenóis naturais, apresentam efeitos benéficos na prevenção do câncer (AGARWAL et al., 1993). A presença de grupos hidroxilas em arranjo catecol (posição para) no anel aromático e de grupamentos doadores de prótons (como exemplo hidroxilas, carboxílico, tiol) são estruturas que permitem aos polifenóis apresentarem atividade antioxidante (LU et al., 2006; LEE et al., 2007; RICE-EVANS et al., 1997).

Na planta erva-mate, dentro da classe dos compostos fenólicos, os ácidos fenólicos são os que mais se destacam (BASTOS et al., 2006; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; FILIP et al., 2001; HECK; SCHMALKO; MEJIA, 2008; MAZZAFERA, 1997), ao contrário do que é observado para outras plantas ricas em compostos fenólicos, como a *Camelia sinensis*, que apresenta elevada concentração de flavonoides (CHANDRA; MEJIA, 2004; YAO et al., 2004).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: os derivados do ácido hidroxibenzoico (Figura 12) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 13). Esses têm como característica um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Os derivados do ácido hidroxibenzoico têm como estrutura comum C6 – C1 (Figura 12) e incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, elágico e siríngico, sendo que dos ácidos fenólicos desse grupo, o ácido gálico é o mais referenciado pela literatura para a erva-mate (CHANDRA; MEJIA, 2004; HECK; MEJIA, 2007; STREIT et al., 2007).

Figura 12 – Estrutura química de derivados do ácido hidroxibenzoico

Fonte: Gerhardt (2013).

Quanto aos derivados do ácido hidroxicinâmico, possuem estrutura comum C6 – C3 (Figura 13) e entre os mais comuns estão os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BRAVO, 1998). A planta erva-mate é reportada por apresentar elevada concentração de compostos do grupo do ácido hidroxicinâmico, com destaque para os derivados do ácido caféico: ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP et al., 2001; HECK; SCHMALKO; MEJIA, 2008; MARQUES; FARAH, 2009).

Figura 13 – Estrutura química de derivados do ácido hidroxicinâmico

Fonte: Gerhardt (2013).

Os índios preparavam na forma de infusão a folha da erva-mate e empiricamente a mascavam atribuindo ao seu consumo um efeito estimulante, com aumento na resistência em trabalhos de força e em longas caminhadas. Há estudos científicos que atribuem às infusões ou extratos desta planta, propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central (MENDES; CARLINI, 2007). A erva-mate apresenta diversas propriedades cientificamente comprovadas, tais como: propriedade digestiva e hepatoprotetora (GORZALCZANY et al., 2001); inibição do estresse oxidativo (GUGLIUCCI, 1996; GUGLIUCCI; MENINI, 2002); e efeito quimiopreventivo (MEJIA et al., 2005). Prediger e colaboradores (2008) sugerem que a erva-mate pode atuar na prevenção de problemas neurodegenerativos.

As propriedades protetoras do extrato de erva-mate, foram avaliados via administração oral e tópica, sobre a prevenção do dano oxidativo em ratos submetidos a radiação UVA e UVB. O tratamento tópico e oral com erva-mate preveniu o dano ao DNA e a peroxidação lipídica, entretanto, apenas o tratamento tópico contendo extrato da erva-mate preveniu o aumento na carbonilação de proteínas causado pela radiação UV (BARG et al., 2014).

Outro estudo analisou o efeito na formação de produtos finais de glicação (AGEs) dos extratos aquosos de *I. paraguariensis* ricos em polifenóis, que poderiam demonstrar um efeito antiglicante, comparando o potencial desses extratos com os extratos de chá verde e com um agente antiglicante padrão, a aminoguanidina. Os resultados revelaram um significativo efeito dose-dependente dos extratos aquosos

de *I. paraguariensis* na inibição da formação de AGEs em modelos *in vitro*, sendo comparado ao obtido por concentrações milimolares do agente antiglicante padrão, enquanto o chá verde não apresentou efeitos significativos (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005).

A atividade antioxidante e o efeito protetor do extrato aquoso da erva-mate no dano ao DNA induzido por  $H_2O_2$  e o reparo do DNA em camundongos foram avaliados em outro estudo. Os resultados mostraram que o chá mate não é genotóxico para as células do fígado, rim e bexiga. Além disso, a ingestão regular do chá de erva-mate aumentou a resistência do DNA para a quebra de DNA induzida por  $H_2O_2$  provocadas nas células do fígado, independente da dose ingerida (MIRANDA et al., 2008).

A utilização do extrato de erva-mate como um ingrediente potencial em formulações cosméticas é uma tendência no mercado atual. O potencial de irritação dérmica *in vivo* produzida pelo extrato bruto e fração de saponinas dos frutos imaturos, foram avaliados por Canto (2007). Os resultados demonstraram que tanto o extrato bruto como as frações de saponinas foram classificadas como produtos não-irritantes mediante o teste *in vivo* de irritação dérmica primária de Draize (1944).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

## 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. foram coletadas em setembro de 2014, no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) localizado sob a coordenada 29°42'58,95" latitude Sul e 58° 43' 25,45 longitude Oeste. O material foi identificado pelo Prof<sup>o</sup>. Dr. Renato Aquino Záchia, e um exemplar (Voucher) encontra-se registrado no Herbário do Departamento de Botânica da UFSM, sob a exsicata SMDB 15.449.

### 3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Balança eletrônica- ACCULAB® V-400 (capacidade 400 g, precisão 0,1 g)
- Banho ultrassônico
- Cromatofolha de sílica gel GF<sub>254</sub>
- Cromatógrafo líquido Shimadzu
- Equipamento para Eletroforese
- Espectrofotômetro Ultravioleta/Vísivel Schimadzu UV
- Evaporador Rotatório acoplado a banho d' água
- Estufa de ar seco circulante
- Estufa a 37°C
- Lâmpada UVB
- Leitor de microplacas de ELISA
- Moinho de facas com tamis malha 0,86 µm Willey
- Vidrarias de laboratório

## 3.3 SOLVENTES, REAGENTES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Foram empregados solventes, reagentes e substâncias de referência das marcas Sigma® e Merck®.

- Ácido Acético glacial PA
- Ácido Clorídrico PA
- Álcool etílico PA

- Ácido fórmico
- Ácido Linoléico
- Acrilamida
- Azida sódica
- Bis-acrilamida
- β-caroteno
- Bromophenol Blue
- Corante Sirius Red
- Cloreto de Cálcio
- Comassie blue
- Cloreto de sódio
- Cloroformio
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Dodecil sulfato de sódio
- EDTA
- Folin-Ciocalteu
- Gelatina
- Glicerol
- Glicina
- Metanol
- Solução de sal de tetrazolium (MTT)
- Peróxido de hidrogênio
- Persulfato de amônio (APS)
- TEMED
- Polioxietileno sorbitan monopalmitato (Tween 40)
- Tris base
- Tris-HCL 1,5 M pH 8,8
- Tris -HCL 0,5 M pH 6,8
- Triton- X100
- Ácido clorogênico
- Ácido caféico
- Ácido ascórbico

- Ácido gálico
- Nimesulida
- Catequina
- Quercetina

#### 3.4 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

O material coletado foi desidratado em estufa com circulação de ar (± 45°C) pulverizado em moinhos de facas e armazenado em frasco âmbar.

A obtenção dos extratos ocorreu no Laboratório de Investigações Fitoquímicas (LABINFITO) da UFSM. Duzentos gramas das folhas previamente secas foram maceradas em um recipiente contendo o líquido extrator, visando a redução da utilização de solventes orgânicos, contribuindo com a sustentabilidade, foi escolhido o líquido extrator etanol 40% (1:10, planta: solvente, m/v) e colocadas em repouso, em dias alternados o recipiente foi vigorosamente agitado, sendo o solvente renovado a cada semana durante 30 dias. Após esse período, os extratos foram recolhidos, e o solvente evaporado a 45°C sob pressão reduzida em rotavapor, e após liofilizados. O extrato liofilizado foi armazenado em frasco âmbar e realizou-se o cálculo do rendimento. O rendimento do extrato bruto das folhas de *I. paraguariensis* (EXB) foi calculado pela razão entre a massa de extrato final (extrato liofilizado) e a massa de matéria-prima (massa de pó das folhas de *Ilex paraguariensis*).

#### 3.5 DOSAGENS FITOQUÍMICAS

#### 3.5.1 Determinação do teor de polifenóis

O teor de polifenóis foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteau modificado (CHANDRA; MEJIA, 2004). A partir do EXB foi preparada uma solução aquosa 0,01% da qual foi tomada uma alíquota de 1 mL e adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteau. A mistura ficou em repouso no escuro (5 min) e após foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 20% deixando reagir por 10 minutos no escuro novamente. Como branco foi utilizado água destilada. Uma curva padrão foi realizada com o ácido gálico nas concentrações de 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40 e 50

μg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Schimadzu UV 1021 a 730 nm. O teor de polifenóis foi determinado por interpolação da absorbância das amostras com a curva de calibração do padrão e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g).

#### 3.5.2 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com Zhishen e colaboradores (1999). A partir de uma amostra de EXB na concentração 0,1% em metanol foi retirado 500 μL, adicionando em tubo de ensaio com 1 mL de água destilada e 150 μL de Nitrito de Sódio 5% (NaNO<sub>2</sub>), os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Então, adicionou-se 150 μL de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) 10% e novamente repouso por 6 min. Após, adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 4% e completou-se o volume (5 mL) com água destilada , os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 15 min. O branco foi preparado do mesmo modo, porém sem a adição de NaOH 4%. Uma curva padrão foi preparada com a quercetina nas concentrações de 40, 80, 120, 160, 200 μg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Schimadzu UV 1021 a 510 nm. O teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorbância das amostras com a curva de calibração com a catequina e expressos como mg de equivalentes de catequina por g de extrato (mg EC/g).

#### 3.5.3 Determinação do teor de taninos

Os taninos foram determinados segundo o método da Vanilina (AGOSTINI-COSTA et al., 1999). O EXB foi diluído a 0,4% com metanol 80% e uma solução de vanilina a 4% foi preparada com HCI:metanol (10:86). Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL do EXB 0,4% e 5 mL de solução de vanilina. Uma curva padrão de catequina foi preparada nas concentrações de 25, 50, 150, 300, 450, 600, 800, 900 e 950 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e a leitura em espectrofotômetro Schimadzu UV 1021 a 490 nm. O teor de taninos foi obtido por interpolação da absorbância das amostras com a curva de calibração da catequina e expressos como mg de equivalentes de catequina por g de extrato (mg EC/g).

## 3.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.6.1 Capacidade antioxidante pelo método do β-caroteno

A capacidade antioxidante seguiu a metodologia de Mokbel e Hashinaga (2006) com modificações. Uma emulsão foi preparada contendo 3,34 mg de β-caroteno diluído em 1 mL de clorofórmio, 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween-20, bem homogeneizados. Primeiramente, o β-caroteno foi diluído em clorofórmio e após adicionado ácido linoléico e Tween-20. A partir dessa solução, o solvente foi removido em rotavapor à pressão reduzida a 40°C e logo em seguida da evaporação, foi adicionado 100 mL de peróxido de hidrogênio 0,01 M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sob agitação vigorosa. Alíquotas de 2 mL da emulsão foram transferidos para diferentes tubos de ensaio contendo 0,1 mL de cada amostra (nas concentrações de 50; 25 e 12,5 µg/mL) solubilizada em metanol. O padrão utilizado foi o butil-hidróxi-tolueno (BHT), nas mesmas concentrações das amostras. O controle foi realizado com 2 mL da emulsão adicionado de 0,1 mL de metanol; e uma outra emulsão foi preparada sem a adição de β-caroteno, que foi utilizando como branco. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 470 nm, em intervalos de 15 min totalizando 120 minutos de reação. As amostras foram preparadas em triplicatas e mantidas em banho-maria a 50°C até o momento da leitura. Os resultados foram expressos em percentual de inibição, conforme a seguinte equação (Figura 14).

Figura 14 – Fórmula para o cálculo do percentual de inibição da oxidação

$$\%I = \left[1 - \left(\frac{A_{A(0)} - A_{A(120)}}{A_{C(0)} - A_{C(120)}}\right)\right]x \ 100$$

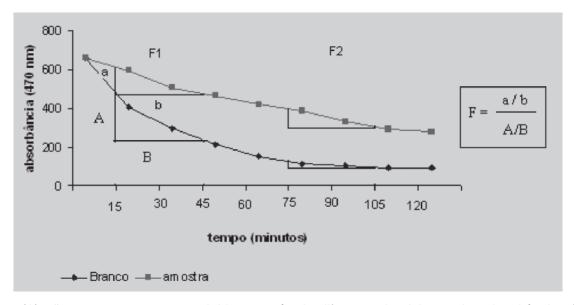
 $A_{c(0)}$  = absorbância do controle no tempo de 0 minutos  $A_{A(0)}$  = absorbância da amostra no tempo de 0 minutos  $A_{A(120)}$  = absorbância da amostra no tempo de 120 minutos  $A_{c(120)}$  = absorbância do controle no tempo de 120 minutos Fonte: Mokbel e Hashinaga (2006).

#### 3.6.1.1 Estudo cinético da capacidade antioxidante no método do β-caroteno

Utilizando o método das tangentes em duas partes das curvas cinéticas, pode ser estimado a eficiência da capacidade antioxidante da amostra. O método foi

descrito por Yanishlieva e Marinova (1995), que se baseia no cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2. Os valores dos fatores são obtidos pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato (amostra) e o branco ou controle (sem extrato) (Figuras 15 e 16).

Figura 15 – Modelo de curva de decaimento obtida no sistema β-caroteno e ácido linoleico, para obtenção das tangentes do cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2



(a) e (A) são os catetos opostos, obtidos através da diferença das leituras das absorbâncias (da amostra e do branco, respectivamente); (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos através das diferenças entre os tempos (respectivamente, da amostra e do branco), de acordo com o fator cinético calculado.

Fonte: Jardini e Mancini Filho (2007).

Figura 16 – Fórmula para o cálculo dos fatores F1 e F2

$$F_{1} = \frac{A_{A(45min)} - A_{A(15min)}}{45 - 15} = \frac{A_{A(105min)} - A_{A(75min)}}{A_{C(45min)} - A_{C(15min)}} = F_{2} = \frac{A_{A(105min)} - A_{A(75min)}}{A_{C(105min)} - A_{C(75min)}} = \frac{A_{A(105min)} - A_{A(75min)}}{105 - 75}$$

 $A_A$  = absorbância da amostra.

A<sub>c</sub> = absorbância do controle sem antioxidante (branco).

Fonte: Jardini e Mancini Filho (2007).

Na primeira parte da curva (entre 15 e 45 minutos após o início da reação), é medida a eficiência antioxidante no bloqueio da reação em cadeia através da interação com os radicais peróxido, sendo o tempo responsável pelo período de

indução (fator F1). Na segunda parte da curva (entre 75 e 105 minutos após o início da reação), é mensurada a capacidade do antioxidante em participar de reações secundárias durante o processo oxidativo (fator F2), que formam outros produtos, como aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros. Estes produtos são gerados durante a fase de propagação do processo oxidativo e são espécies radicalares que aceleram o processo oxidativo do sistema. O resultado obtido para F1 e F2 pode ser maior ou menor que 1. Se o resultado for maior que 1, o antioxidante pode ter um efeito oposto, ou seja, agir como um pró-oxidante para as reações oxidativas (GIADA, 2008; SILVA et al., 2013).

#### 3.6.2 Capacidade antioxidante por DPPH

Para a capacidade antioxidante foi utilizada a metodologia seguida por Choi e colaboradores (2002). Foram preparadas soluções do EXB e do padrão ácido ascórbico nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 μg/mL em etanol. Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5 mL de cada solução juntamente com 1 mL de solução de DPPH 0,3 mM em etanol, deixando em repouso, num ambiente escuro à temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi feita a leitura em 518 nm. Como branco foi utilizado o EXB sem a adição do DPPH. Como controle negativo foi utilizado 1 mL de DPPH adicionado de 2,5 mL de etanol em tubo de ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata e calculado a capacidade antioxidante (% de inibicão), conforme a seguinte equação (Figura 18).

Figura 17 – Fórmula para o cálculo do percentual de inibição do radical DPPH

$$\%I = 100 - \left[ \frac{(A_{amostra} - A_{branco})x \ 100}{A_{controle \ negativo}} \right]$$

Fonte: Choi et al. (2002).

## 3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO E CAFEICO POR CLAE

A metodologia utilizada seguiu o protocolo de Silva (2007a) com modificações. A amostra e o padrão foram injetados no cromatógrafo líquido de alta

eficiência Shimadzu Kyoto/Japan acoplado ao detector de arraste de diodo (SPD DAD-M20A) UV/vis com a bomba LC-20AT e auto injetor SIL. A coluna analítica usada foi Shimadzu CLC-ODS(M) - pack (4.6 mm x 150 mm, 5μm). Foi preparada uma solução-mãe com 1000 μg de ácido clorogênico e ácido cafeico, após completou-se o balão volumétrico de 10 mL com metanol:água (1:1). Uma curva padrão de ácido clorogênico e do ácido cafeico foram realizadas nas concentrações de 30, 50, 100, 150, 200, 250 μg/mL.

Foi preparada uma amostra com 0,075g de EXB e após completou-se o balão volumétrico de 5 mL com metanol: água (1:1). Dessa solução, uma alíquota de 2 mL foi retirada e completou-se com solução de metanol: água (1:1) para um balão volumétrico de 10 mL. O padrão e as amostras foram filtrados na membrana de 0,45 μm. O método analítico empregado consistia de um sistema gradiente linear composto de (A) 2% ácido acético (v/v); (B) metanol: água 50 % (m/m). As análises foram realizadas empregando fluxo de eluição de 0,6 mL/min, seguindo o gradiente demonstrado na Tabela 1. O comprimento de onda utilizado foi de 327 nm e o volume injetado 20 μL.

Tabela 1 – Descrição do gradiente de eluição em função do tempo

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	69	31
10,0	69	31
25,0	44	56
33,0	44	56
45,0	23	77
50,0	44	56
55,0	69	31

A: ácido acético 2% (v/v); B: metanol:água 50% (m/m). Fonte: Silva (2007a).

3.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FOTOESTABILIDADE DO EXB EM CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS (HFF-1)

## 3.8.1 Linhagem e cultivo celular

Células de fibroblastos da linhagem HFF-1 de prepúcio humano (ATCC® SCRC-1041™) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. Cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100U/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) e anfotericina B (0,25 μg/mL); e incubadas a 37° com 5 % de CO₂. As células foram sub-cultivadas a cada 2-3 dias, usando salina 0,9% para lavá-las e tripsina 0,25% para desagregá-las do frasco.

#### 3.8.2 Fotoestabilidade

Uma quantidade de 0,5 g do extrato das folhas (EXB) foi aplicada de forma homogênea em uma placa de petri com área de 9,62 cm² para ser exposta ao UVB na dose de 0,23 J/cm², referente a uma exposição aguda (EGEBLAD; WERB, 2002; WARNER et al., 2004). A fonte de luz utilizada para a radiação UVB foi uma lâmpada Philips TL40W/12 RS (Medical-Eindhoven, Holland) montada a 20 cm da mesa usada para colocar a amostra e que emite radiação na faixa de 270 e 400 nm com um pico máximo de emissão em torno de 313 nm. Após, os extratos foram avaliados quanto a citotoxicidade nas células HFF-1.

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para avaliar a possível degradação dos compostos presentes no extrato pela exposição ao UVB e a possível interferência na viabilidade das células de fibroblastos da linhagem HFF-1.

#### 3.8.2.1 Preparo das amostras do EXB

Foi preparada uma solução-mãe, a partir de uma massa de 0,004g do EXB, exposto à radiação ultravioleta-B (UVB) e outra não exposta. Após, foi adicionado em balão volumétrico de 5 mL e completado o volume com água destilada, obtendose uma concentração de 800 μg/mL. A partir da solução-mãe foram preparadas concentrações de 40 μg/mL, 200 μg/mL e 400 μg/mL do extrato exposto e não exposto ao UVB. As concentrações do EXB exposto e não exposto ao UVB (4

 $\mu$ g/mL, 40  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL e 400  $\mu$ g/mL) foram preparadas para seguir o protocolo do ensaio de citotoxicidade onde as amostras foram diluídas no meio de cultivo, obtendo-se concentrações finais de 1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL e 100  $\mu$ g/mL do EXB exposto e não exposto ao UVB.

#### 3.8.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada nos fibroblastos da linhagem HFF-1 pelo ensaio do sal de tetrazolium (MTT). A escolha deste método para avaliar a citotoxicidade do EXB foi devido a sensibilidade, a rapidez e ao baixo custo. O sal de tetrazolium é hidrossolúvel e de coloração amarelada, sendo facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983).

As células da linhagem HFF-1 foram semeadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's em uma placa de 96 poços a uma densidade de 2x10<sup>4</sup> células/poço e incubadas na estufa a 37° com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão. Após, foram adicionados na placa 50 μL das amostras, previamente preparadas (item 3.8.2.1) e as células foram novamente incubadas, por períodos diferentes, 24 e 72 horas em CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término de cada período de incubação foram adicionados 10 μL do reagente MTT (concentração de 10%) e 5 mg/mL de tampão fosfato salino, incubando-se novamente por 4 horas a 37° e após, 100 μL de DMSO foram adicionados em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi realizada em 570 nm (leitor de microplaca Benchmark Bio-Rad) em ambos os períodos de tempo avaliados. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (sem extrato).

# 3.9 AVALIAÇÃO *IN VIV*O DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA DO EXB E DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXB

O efeito fotoprotetor *in vivo da* formulação tópica adicionada do EXB foi avaliado por meio da eficácia anti-inflamatória pela medida da atividade de mieloperoxidase, de metaloproteinases e da degradação do colágeno na pele de camundongos expostos à radiação aguda de UVB.

#### 3.9.1 Preparação da formulação tópica em creme (p/p) contendo o EXB

Preparou-se um creme base concentrado, cuja composição é demonstrada na Tabela 2. Logo após, foi incorporado ao creme base o EXB na concentração de 5%.

Tabela 2 – Composição do creme base concentrado.

Componentes	% (p/p)
Polawax	17,2
Cetiol 868	7,143
Álcool cetoestearílico	3,6
BHT	0,0715
Propilenoglicol	1
Cosmoguard	0,4
Silicone	2,85
Água destilada	qsp

Fonte: Autora.

Todos os excipientes possuiam Certificado de Análises de Controle de Qualidade, conforme as especificações do fabricante e Farmacopeia Americana (USP 38). O controle de qualidade da formulação final foi realizado em uma farmácia de manipulação local. As formulações foram preparadas no dia anterior aos experimentos *in vivo* de fotoproteção.

## 3.9.2 Animais, preparo das amostras e atividades de metaloproteinases e mieloperoxidase

Os procedimentos experimentais foram realizados conforme aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM), protocolado sob o nº 9844100315. O experimento foi conduzido nas instalações do laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia da UFSM. O modelo animal utilizado foi de acordo com Ropke e colaboradores (2006) com modificações. Camundongos heterogênicos fêmeas da linhagem Swiss, criados no Biotério da UFSM, com cerca de 10 semanas, foram distribuídos em cinco grupos (n=5) (Tabela 3) com livre acesso à comida e água e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 horas da manhã) à temperatura de

22°C ± 2°C. A pele de cada animal foi previamente raspada (24 hs antes do experimento). Os animais foram aclimatados por pelo menos 1 hora antes da exposição ao UVB, sendo aplicado no dorso dos animais (área de 1,77 cm²) uma quantidade de 0,3 g das formulações.

Os animais foram anestesiados (100 mg/kg de guetamina mais 10 mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intraperitonial) e, a seguir, expostos à radiação UVB (espectro de emissão de 290 - 320 nm), equivalente a 2 MED (dose eritematosa mínima), por 6 minutos, que corresponde à dose de 0,23 J/cm<sup>2</sup>. Como fonte de luz com radiação UVB foi utilizada uma lâmpada Philips TL40W/12RS (Medical-Eindhoven, Holland). A saída da radiação UVB foi mensurada por um radiômetro modelo IL-1700 (International Light, USA). A lâmpada foi posicionada a 12 cm dos animais (irradiância de aproximadamente 0,61 mW/cm<sup>2</sup>). Os animais foram sacrificados por administração de anestésicos, tiopental (150 mg/Kg) e lidocaína (100 mg/Kg) 24 horas após a última exposição. Após a eutanásia, as peles do dorso imediatamente. foram removidas seccionadas para as análises de metaloproteinases e mieloperoxidases e conservadas em freezer à -80°C. Enquanto que para a análise da degradação do colágeno as amostras foram fixadas em tampão formol tamponado.

Tabela 3 – Descrição dos grupos utilizados no experimento.

Sigla	Descrição dos grupos		
G1	Não exposto e não tratado topicamente		
G2	Exposto ao UVB		
G3	Exposto ao UVB e tratado com formulação sem EXB		
G4	Exposto ao UVB e tratado com formulação EXB		
G5	Exposto ao UVB e tratado com formulação nimesulida (controle positivo)		

Fonte: Autora.

Um dia antes do experimento para avaliar a atividade de metaloproteinases, as peles foram colocadas em eppendorfs e adicionou-se 700 µL de tampão de lise (*lysis buffer*), composto por Tris-base 100 mM pH 6,8 contendo 100 mM de NaCl, 0,1% de SDS, 5 mM de EDTA e 0,02% de azida sódica (proporção 1:4

tecido:tampão) e homogeneizou-se em Ultra-turrax à 20000 rpm em banho de gelo, para evitar o superaquecimento causado pela rotação e a possível degradação das MMPs (KUPAI et al., 2010).

O homogeneizado foi deixado (24hs) em banho de gelo com o tampão para uma melhor solubilização das proteínas. No dia seguinte, o homogeneizado foi submetido à centrifugação a 13000 rpm por 5 min, a 4°C, em centrífuga de mesa refrigerada. O sobrenadante foi usado como a solução-extrato da pele, empregado como amostra.

A concentração de proteína do homogeneizado da pele de cada grupo (n=5) foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), estabelecendo o volume equivalente a 10 μg de proteína do homogenato que foram avaliados por meio da Zimografia (Ropke et al., 2006). O homogenato adicionado de tampão de amostra, sem o agente redutor (β-mercaptanol) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e copolimerizado com 0,5% de gelatina (substrato das MMP-2 e -9).

O sistema de eletroforese utilizado foi o Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A placa de gel para a eletroforese, foi preparada com o tampão (*running buffer*) composto deTris/glicina 25 mM (pH 8,3) contendo 0,1% de SDS, gel de concentração e um gel de separação. A composição e o esquema dos géis (Tabela 4) encontra-se logo a seguir.

Tabela 4 – Composição dos géis utilizados na eletroforese (SDS-PAGE).

Gel de concentração (stacking gel)	Gel de separação (separating gel)
Acrilamida 15% Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ( <i>stacking buffer</i> ) SDS 0,01% H <sub>2</sub> O Milli-Q Persulfato de amônio 0,01% (APS) TEMED	Acrilamida 8% Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (separating buffer) SDS 0,1% Glicerol 7,5% Gelatina 40 mg/mL 0,1% H <sub>2</sub> O Milli-Q Persulfato de amônio 0,0175% (APS) TEMED

Fonte: Autora.

Após a inoculação das amostras no gel, foi iniciado a corrida eletroforética à 80 V e potência de 120 W durante aproximadamente 4 horas. Para a renaturação

das proteínas o SDS foi removido com solução de Triton-X100 2% (*renaturing buffer*) por 30 min. Após, os géis foram lavados com tampão de incubação (*developing buffer*) por 30 min e incubados a 37°C durante 18h. Esses foram corados com uma solução 0,1% de Coomassie Brilliant Blue em água contendo 25% metanol e 10% de ácido acético, por 30 minutos em temperatura ambiente, e descorados com água contendo 10% de ácido acético e metanol.

Para avaliar o efeito do extrato bruto das folhas de *I. paraguariensis* (EXB) na atividade enzimática de metaloproteinases no homogenato de peles de camundongos, foram utilizados apenas os animais expostos ao UVB. O procedimento ocorreu de acordo com Ropke e colaboradores (2006), onde a solução-extrato da pele do grupo exposto ao UVB foi submetida à eletroforese, nas mesmas condições já descritas. Ao final da corrida eletroforética, os géis foram tratados com os devidos tampões e incubados, separadamente, com o tampão de incubação adicionado do EXB (50 e 100 μg/mL), EDTA na concentração final de 400 mM (controle positivo de inibição das MMPs) e um dos géis tratados com o tampão de incubação (controle negativo). Cada banda de MMP, em ambos os ensaios, foi quantificada pela análise de imagem no computador com o software de análise densiométrico e molecular ImageJ. As gelatinases (MMP-2 e -9) aparecem como regiões não coradas de gelatina (INOMATA et al., 2002).

A infiltração de neutrófilos foi avaliada pela atividade de mieloperoxidase (MPO). A pele extraída e conservada a -80°C foi homogeneizada a 11.000 rpm por 20 min em tampão acetato (80 mM, pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio e mantidos à 4°C. Uma alíquota de 10 μL do sobrenadante foi incubado para reagir com 200 μL de tampão acetato e 40 μL de solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (18,4 mM) por 3 min à 37°C. A reação foi interrompida em banho de gelo por adição de 30 μL de ácido acético. A coloração formada na reação foi analisada por espectrofotômetro em 630 nm (SUZUKI et al., 1983).

#### 3.9.3 Degradação do colágeno

Para a avaliação da degradação do colágeno utilizou-se o método da coloração Picrosirius Red (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). O Sirius Red (SR) é um corante ácido que contém seis grupamentos sulfônicos e tem sido muito utilizado para o estudo do colágeno. O SR é constituído por uma molécula

corante alongada que reage e promove um aumento de sua birrefringência natural, pois muitas moléculas do corante são paralelas ao eixo longo da cadeia de cada molécula de colágeno, o que pode ser facilmente evidenciado através de filtros de polarização (MONTES, 1996).

A pele fixada em formol tamponado foi processada e incluídos em parafina, e posteriormente seccionados à espessura de 4 µm. Os cortes foram desparafinizados em banhos de xileno; em seguida hidratados e corados com SR por 1 hora lavados e contra-corados com hematoxilina por 3 minutos (MELO, 2005).

Foram realizadas imagens padronizadas com câmera digital acoplada a microscópio de luz polarizada, com objetiva de 20 aumentos, intensidade máxima de luz e polarização de plano em 90°. Sendo possível analisar na lâmina a distribuição de fibras avermelhadas (colágeno I) e esverdeadas (colágeno III).

#### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as comparações entre os grupos nos testes da atividade enzimática das MMPs foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via usando o teste de múltiplas comparações de Tukey. Na análise dos resultados das atividades da MPO foi utilizada a ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism v. 6.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 RENDIMENTO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *ILEX* PARAGUARIENSIS

A partir da droga (pó das folhas secas de *I. paraguariensis*), obteve-se um extrato hidroetanólico 40% de coloração marrom-claro com rendimento de 23,35 % (m/m) representando 46,7 g do liofilizado.

Esse resultado evidencia um valor bem superior ao encontrado por Jacques e colaboradores (2006) que obtiveram extratos das folhas de *I. paraguariensis*, por meio da maceração, usando diferentes solventes. Os rendimentos encontrados foram: 2,4% (hexano); 1,9% (tolueno); 2,5% (diclorometano); 1,8% (acetato de etila); 7,3% (acetona); 14,3% (metanol).

O resultado também foi superior ao estudo de Jacques e colaboradores (2007), por meio da técnica de maceração e sonicação, obtiveram extratos das folhas de *I.paraguariensis* e os rendimentos encontrados foram, respectivamente: 5,15% (hexano), 14,4% (metanol); 1,39% (hexano), 12,6% (metanol).

#### 4.1.1 Determinação do teor de polifenóis

Os polifenois pertencem a uma classe de compostos que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. São um dos maiores grupos de metabólitos secundários vegetais, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas. Estas substâncias exibem uma vasta gama de efeitos biológicos onde muitos destes têm sido atribuídos a sua atividade antioxidante e ao sequestro de radicais livres. As hidroxilas fenólicas, particularmente, aquelas adjacentes, e o número total de hidroxilas na molécula induzem grandes diferenças de atividade antioxidante e outras atividades, como quelante de metais de transição, entre os polifenóis (SIMÕES et al., 2004).

Estes compostos podem ser de grande importância para o suporte do material celular, além de estarem presentes na maioria dos tecidos vegetais. Contribuem para formar a estrutura da parede celular, principalmente, quando se refere aos constituintes poliméricos, como a lignina em paredes secundárias, mas também

quando se refere aos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, esses, interligados aos polissacarídeos em paredes celulares de monocotiledôneas. Sendo assim, como a árvore de *Ilex paraguariensis* A St. Hil é uma planta dicotiledônea, os polifenóis tendem a estar associados à parede celular, predominantemente, como estruturas poliméricas (BASTOS et al., 2006; SIMÕES et al., 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que o consumo do extrato de erva-mate protege contra a reatividade de radicais livres. Essa atividade antioxidante é primariamente atribuída aos compostos polifenólicos do extrato, que deslocalizam elétrons e formam ligações de hidrogênio intramolecular. Entretanto, compostos do extrato de erva-mate também inibem reações químicas e reparam lesões causadas pelas espécies reativas (BASTOS et al., 2006).

Colpo e colaboradores (2016) observaram que o potencial quelante de íons e sequestrador de radicais livres mantiveram-se constantes nas sucessivas extrações da erva-mate com água quente, mas houve redução na concentração de polifenóis.

A determinação do teor de polifenois totais do EXB foi realizado através do método de Folin-Ciocalteau modificado, de acordo com Chandra e Mejia (2004). A técnica consiste na redução da mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico (coloração amarela), em meio alcalino, a óxidos de tungstênio e molibdênio pelos compostos fenólicos. Com a adição de carbonato de sódio, o meio reacional adquire um valor de pH 10 que favorece a formação e a oxidação de ânions fenolatos pelo reagente de Folin-Ciocalteu. O resultado desta oxidação é a formação de um complexo tungstênio-molibdênio de coloração azul com intensa absorção próxima a 760 nm (SOUZA et al., 2008).

O conteúdo de polifenóis foi determinado usando a equação da reta, y= 0,0327x-0,024 (r= 0,9996), calculada a partir da curva de calibração obtida do gráfico da concentração de ácido gálico (0,01%) versus absorvância (Figura 18). A quantidade de polifenois encontrada para o EXB foi de 265,4 mg EAG/g (mg de equivalentes de ácido gálico/ q de extrato).

O teor de polifenóis encontrado neste trabalho foi superior ao relatado por Deladino e colaboradores (2013), que avaliaram o conteúdo de polifenóis do extrato aquoso líquido e liofilizado de erva-mate comercial. Esses pesquisadores, observaram que o extrato líquido teve uma concentração de 143,2 mg EAG/g e o extrato liofilizado teve uma concentração de 110,5 mg EAG/g.

CURVA PADRÃO - ÁCIDO GÁLICO y = 0,0327x - 0,024  $R^2 = 0,9996$ 0,9 ······ 0,8 ABSORBÂNCIA (nm) 0,7 0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1 0 0 5 10 15 20 25 CONCENTRAÇÃO (µg/mL)

Figura 18 - Curva padrão do ácido gálico.

Fonte: Autora.

Gosman e colaboradores (2012), determinaram o teor de fenólicos totais do extrato hidroetanólico 70% das folhas frescas e secas de erva-mate preparadas por maceração, evidenciando valores de 151,61 mg EAG/g e 170,91 mg EAG/g, respectivamente. Esses resultados mostram que o extrato hidroalcóolico 40%, utilizado neste trabalho, apresentou maior teor de polifenóis quando comparado ao mesmo solvente utilizado numa concentração superior. Isso pode ser explicado pelo princípio da seletividade, onde as substâncias mais polares, como os compostos polifenólicos, possuem afinidade por sistemas solventes de maior polaridade (SIMÕES et al., 2004).

Pagliosa e colaboradores (2009) analisaram o conteúdo de polifenóis totais do extrato metanólico (80:20 v/v) e aquoso das cascas e das folhas *in natura* de *Ilex paraguariensis*. Esses pesquisadores encontraram teores de polifenóis inferiores ao encontrado no presente estudo, tanto para a casca quanto para a folha, em ambos os solventes extratores testados. Ao comparar os resultados para uma mesma amostra, em diferentes solventes, o extrato metanólico da casca da erva-mate apresentou um valor de 17,50 g EAG/100 g de base seca e o extrato aquoso da casca apresentou um valor de 12,53 g EAG/100 g de base seca. Para o extrato metanólico e aquoso das folhas foram encontrados, respectivamente, valores de 5,21 g EAG/100 g de base seca. Estes resultados

demonstram a influência do solvente extrator e do tempo de extração estabelecido no experimento na solubilização de compostos polifenólicos. Entretanto, a solubilidade dos compostos fenólicos não varia somente de acordo com a solubilidade do solvente utilizado na extração, pois a solubilidade desses compostos nas amostras também pode ser influenciada pela interação com outros constituintes do tecido vegetal e pelo grau de polimerização dos constituintes fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Chandra e Mejia (2004) avaliaram o conteúdo de polifenois dos extratos aquosos de *Ardisia compressa*, *I. paraguariensis* e *Camellia sinensis*. Os maiores valores de polifenois foi demonstrado para o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (94,91 mg EAG/g), quando comparado ao *A. compressa* (39,07 mg EAG/g). Porém, o maior valor de polifenóis encontrado foi para o extrato aquoso de *C. sinensis* (148.77 mg EAG/g).

De um modo geral, a folha e os produtos comerciais de erva-mate se destacam por seu elevado teor de compostos fenólicos, que é superior ao encontrado em vinho tinto, chá verde (BIXBY et al., 2005), chá preto, de hortelã e de camomila (MORAES-DE-SOUZA, 2007) e de folhas habitualmente utilizadas para chás e condimentos, como o alecrim, macela, sálvia e malva (ASOLINI et al., 2006).

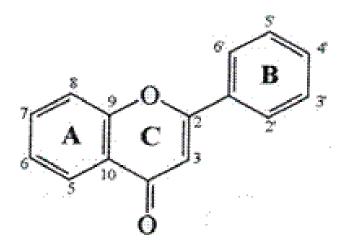
#### 4.1.2 Determinação do teor de flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos bioativos e são formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a um anel aromático, caracterizado pelo esqueleto de carbono C6-C3-C6, como ilustrado na Figura 19. As seguintes atividades biológicas foram relacionadas aos flavonoides: antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, anti-inflamatória, antihepatotóxica, anti-hipertensiva, inibitória enzimática e antialergênica, dentre outras (GUARDIA et al., 2001; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Dentre os polifenois, a classe dos flavonoides é aquela com maior número de compostos e com ampla atividade biológica, dentre elas destacam-se a atividade antioxidante, e alguns dos compostos dessa classe mostram também propriedade quelante de metais de transicão. A quercetina é considerada como padrão da classe dos flavonoides, sendo o composto com maior número de estudos relacionando estrutura química e atividade antioxidante (DE MARINO et al., 2012). Por isso,

dentre as classes de polifenois é importante avaliar os flavonoides presentes no extrato.

Figura 19 – Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração



Fonte: Simões et al. (2004).

O método colorimétrico de determinação de flavonoides totais é considerado uma alternativa simples, barata e rápida (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998) que tem como princípio a formação de complexos estáveis entre o cloreto de alumínio e o grupo ceto do carbono C-4 e o grupo hidroxila do carbono C-3 de flavonas e flavonóis (CHANG et al., 2002). Os complexos estáveis formados proporcionam mudança no comprimento de onda da absorção dos flavonoides o que possibilita a sua detecção e quantificação na presença de outros compostos fenólicos. Além disso, o complexo Al<sup>3+</sup>/flavonoide proporciona aumento da absorção na região visível do espectro (FUNARI; FERRO, 2006; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

O teor de flavonoides dos extratos foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Zhishen e colaboradores (1999) com modificações. Os flavonoides foram determinados através da curva padrão com a quercetina (0,1%) (Figura 20) e expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de EXB (mg EQ/g).

O resultado encontrado para os teores de flavonoides no EXB foi de 200 mg EQ/g (mg de equivalentes de quercetina por g de extrato), que foram calculados por meio da equação y= 0,0002x+0,0008 (r= 0,9952) obtida da análise estatística da curva padrão da catequina (concentrações de catequina versus absorvância).

y = 0.0002x + 0.0008**CURVA PADRÃO - QUERCETINA** 0,05 0.045 ABSORBÂNCIA (nm) 0.04 0,035 0,03 0,025 0,02 0,015 0.01 0.005 0 50 100 150 200 250 CONCENTRAÇÃO (µg/mL)

Figura 20 – Curva padrão da quercetina (flavonoides)

Fonte: Autora.

Oh e colaboradores (2012) obtiveram o extrato aquoso e etanólico 90% do chá de *llex paraguariensis*. Evidenciou-se valores de flavonoides de 48,33 mg de equivalentes de catequina (EC) por grama de chá no extrato etanólico 90% e 17,34 mg EC/g para o extrato aquoso. Os autores atribuíram o alto teor de flavonoide encontrado no extrato etanólico 90% aos derivados cafeoil (ácido caféico, ácido clorogênico e ácido dicafeoilquínico). Deste modo, sugere-se que o EXB apresenta teores mais elevados de derivados cafeoil quando comparado ao extrato etanólico 90% e ao extrato aquoso.

Grujic e colaboradores (2012) investigaram o conteúdo de flavonoides totais dos extratos das folhas secas de *Ilex paraguariensis* utilizando solvente hidroetanólico em concentrações diferentes (40, 50 e 60%). Os autores encontraram o maior teor de flavonoides utilizando a concentração de 40% de solvente hidroetanólico (41,15 mg EC/g de matéria seca). No presente trabalho, encontrou-se um teor de 200 mg EQ/g de extrato. Isso pode ser explicado, pelo método de extração empregado; pois os autores utilizaram o extrato preparado por maceração no tempo de 3 horas, enquanto que no presente trabalho a maceração se deu por 30 dias com solvente sendo renovado a cada 7 dias e posteriormente, liofilizado.

#### 4.1.3 Determinação do teor de taninos

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Estes compostos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. Complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (SIMÕES et al., 2004).

O teor de taninos dos extratos foi determinado de acordo com o método da Vanilina (AGOSTINI-COSTA et al., 1999). Os taninos foram determinados através da curva padrão com a catequina (0,4%) (Figura 21) e expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de EXB (mg EC/g).

v = 0.0002x + 0.003CURVA PADRÃO - CATEQUINA  $R^2 = 0.9951$ 0,16 0,14 ABSORBÂNCIA (nm) 0,12 0,10 0,08 0,06 0,04 0,02 0,00 100 200 300 400 500 600 700 800 CONCENTRAÇÃO (µg/mL)

Figura 21 – Curva padrão da catequina.

Fonte: Autora.

O resultado obtido para os taninos no EXB foi de 158,7 mg EC/ g de extrato (g de equivalentes de catequina por 100 g de extrato). Pagliosa e colaboradores (2009) analisaram o conteúdo de taninos condensados do extrato das folhas *in natura* de *Ilex paraguariensis*. Estes pesquisadores encontraram um valor de 1,15 g EC/ 100 g de extrato utilizando como método de extração a maceração com metanol (80:10)

por 10 min. O resultado encontrado no presente estudo reforça a influência do tempo no processo extrativo, quando se pretende obter teores significativos de constituintes químicos.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE *ILEX* PARAGUARIENSIS

A capacidade antioxidante do EXB foi determinada quantitativamente pelos métodos β-caroteno e DPPH.

## 4.2.1 Determinação da capacidade antioxidante do EXB pelo método do β-caroteno

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Figura 22) avalia a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do  $\beta$ -caroteno induzido pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. Quando um antioxidante é adicionado no meio, este reage competitivamente com o radical, inibindo consequentemente a reação do último com o  $\beta$ -caroteno.

Figura 22 – Estruturas do β-caroteno (A) e ácido linoléico (B).

Fonte: Alves et al. (2010).

Com isso, o efeito antioxidante é medido, monitorando a velocidade de decaimento da absorbância a 470 nm, comprimento de onda típico do β-caroteno. O sistema é constituído por uma emulsão, sendo considerado um sistema aquoso-

lipídico, e é usualmente utilizado para se avaliar a atividade antioxidante de um extrato ou antioxidante isolado em inibir o processo de oxidação do sistema, avaliado em duas horas. Diferentemente do que ocorre no método DPPH, os antioxidantes devem apresentar maior estabilidade para expressar maior atividade antioxidante (PORT'S, 2011).

A matriz de reação sendo uma emulsão, influencia o comportamento de muitos antioxidantes que pode mudar em função do meio em que se encontram. Em emulsões de água em óleo observa-se maior eficiência protetora de antioxidantes lipofílicos. Porém, em sistemas lipídicos, antioxidantes hidrofílicos apresentam melhor atividade. Isso se deve ao óleo, pois antioxidantes hidrofílicos são orientados para a interface óleo-ar, promovendo maior proteção quando comparado aos lipofílicos que ficam solubilizados no óleo. Ao contrário, em emulsões, os lipofílicos são mais protetores por serem direcionados na interface óleo-água (KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU, 2008).

A capacidade antioxidante do EXB (50 µg/mL) e do padrão BHT estão expressas em percentual de inibição e encontram-se na Tabela 5 juntamente com os respectivos fatores cinéticos.

Houve diferença significativa entre os percentuais de inibição do EXB e BHT, embora o extrato tenha apresentado um bom potencial de inibição quando comparado ao padrão (BHT). No presente trabalho, o percentual de inibição do EXB foi superior ao descrito por Dartora e colaboradores (2011), que avaliaram o potencial antioxidante de extratos de folhas jovens e maduras de *I. paraguariensis* submetidos à exposição solar e à sombra. O melhor resultado encontrado foi para a folha madura exposta ao sol, obtendo um percentual de 48,37%, na mesma concentração de 50 μg/mL. Esses pesquisadores concluíram que as folhas cultivadas ao sol têm um conteúdo maior de compostos bioativos (derivados cafeoil, cafeína, teobromina e rutina) quando comparadas às folhas cultivadas na sombra.

A Figura 23 demonstra o comportamento cinético do EXB na concentração de 50 µg/mL comparado às amostras do controle (sem antioxidante) e do antioxidante sintético BHT na mesma concentração. A partir das análises foi possível calcular os fatores cinéticos F1 e F2 e encontram-se expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores do percentual de inibição da peroxidação do ácido linoleico e dos fatores cinéticos da reação

Amostra	% inibição	F1	F2
EXB	50,48±0,5 <sup>B</sup>	0,39	6,9
BHT	77,87±0,9 <sup>A</sup>	0,2	5

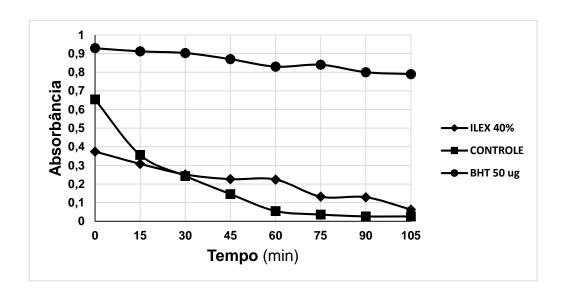
Os valores do percentual de inibição representam a média de triplicata ± desvio padrão, seguidas letras diferentes, que diferem entre si conforme o Teste t de Student (p<0,01). F1 e F2: fatores cinéticos.

Fonte: Autora.

Segundo Yanishilieva e Marinova (1995), o fator F1 representa a eficiência do antioxidante em bloquear as reações em cadeia, ocasionadas pelos radicais livres, ou seja, representa a capacidade de atuação do composto fenólico na etapa de iniciação da oxidação. Enquanto o F2, representa sua ação na fase de propagação, sendo possível o antioxidante participar de reações como a decomposição de hidroperóxidos que reagem com o oxigênio e aceleram o processo oxidativo. Quanto mais próximos de 1 estiverem os F1 e F2, menor será a capacidade antioxidante.

O EXB e o BHT na concentração de 50 µg/ mL apresentaram valores de F1 (0,39) e o BHT (0,2), respectivamente. O valor de F1 demonstra que o extrato foi eficiente em bloquear as reações em cadeia, gerados pelos radicais livres no início da oxidação. Os valores de F2 (>1) mostraram que o EXB não é eficiente em combater os radicais que surgem na fase de propagação do processo oxidativo.

Figura 23 – Capacidade antioxidante do EXB pelo método β-caroteno



#### 4.2.3 Determinação da capacidade antioxidante do EXB pelo método DPPH

O radical livre orgânico estável, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), é amplamente utilizado para avaliação do potencial sequestrador de radicais livres de compostos antioxidantes, embora tenha limitada semelhança com radicais peroxil e não esteja presente nos sistemas biológicos (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

O ensaio com DPPH é baseado em medida espectrofotométrica da mudança de concentração do radical DPPH resultante da reação do radical com o composto antioxidante. À medida que o radical aceita um átomo de hidrogênio (H) (Figura 24) da molécula antioxidante sofre redução passando de DPPH para DPPH2, resultando na mudança da coloração púrpura da solução etanólica de DPPH para amarela, com concomitante decréscimo de absorção em 515 nm (ANDRADE et al., 2007; BALBOA et al.; DENG; CHENG; YANG, 2011).

A concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH para 50% (chamada de  $IC_{50}$ ) é usada para a comparação da atividade antioxidante de diferentes compostos. O cálculo do valor de  $IC_{50}$  requer da determinação da cinética de reação entre DPPH e diferentes concentrações do antioxidante ou da mistura de antioxidantes. Quanto menor a  $IC_{50}$  mais eficaz é a sua atividade antioxidante (DENG; CHENG; YANG, 2011).

Figura 24 – Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante

Fonte: Moon e Shibamoto (2009).

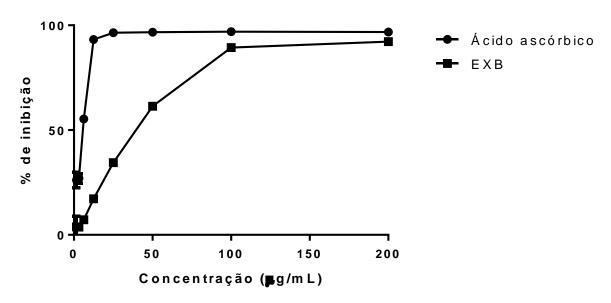
Os resultados da capacidade antioxidante estão representados na Figura 25 e na Tabela 6. A partir da análise da inibição (em %), pode-se observar que na concentração de 100 µg/mL o EXB inibiu 89,42% do radical DPPH, enquanto o ácido

ascórbico inibiu 96,93 %; o EXB teve uma boa atividade de inibição do radical DPPH comparado ao padrão. Na concentração de 200  $\mu$ g/mL, o EXB obteve uma inibição próxima à do ácido ascórbico, sendo os respectivos valores, 92,2% e 96,82%, embora os resultados tenham sido estatisticamente diferentes. Com relação à IC<sub>50</sub>, houve diferença significativa entre o EXB (39,73  $\mu$ g/mL) e o ácido ascórbico (5,79  $\mu$ g/mL).

O resultado da IC $_{50}$  do presente estudo foi bem inferior ao encontrado por Souza e colaboradores (2015). Esses pesquisadores utilizaram o extrato das folhas de *I. paraguariensis* obtido por maceração utilizando o sistema metanol:água (80:20 v/v), onde encontraram uma IC $_{50}$  de 112 µg/mL. Apesar da constante dielétrica do sistema MetOH:  $H_2O$  (80:20 v/v) ser de 41,78 e do sistema EtOH: $H_2O$  (40:60) 25,42, ou seja, de menor polaridade, foi o mais seletivo para a extração dos compostos com capacidade antioxidante do que o metanol.

Em outro estudo, Faion e colaboradores (2013) prepararam o extrato das folhas de *I. paraguariensis* por percolação, utilizando altas temperaturas na secagem, e assim influenciando na capacidade antioxidante. Por exemplo, para atingir uma inibição do radical DPPH de 99,2%, foi necessária uma concentração do extrato de 750 µg/mL.

Figura 25 – Capacidade antioxidante pelo método DPPH expressos em % de inibição do EXB de *I. paraguariensis* 



Fonte: Autora

No presente estudo, houve uma inibição de 92,2% numa concentração de 200 μg/mL (Tabela 6). Com relação à IC<sub>50</sub>, os autores obtiveram numa concentração de 234,48 μg/mL, valor bem superior ao encontrado neste estudo (39,73 μg/mL). Estudos já relatam que a estabilidade de compostos polifenólicos são afetados por degradações enzimáticas e químicas, pela volatilização de compostos e, principalmente, por decomposição térmica (MOURE et al., 2001).

Tabela 6 – Valores do percentual de inibição do radical DPPH pelo EXB, ácido ascórbico e valores do IC<sub>50</sub>

Amostra	% de inibição (± DP)				IC <sub>50</sub>
Amostra	25 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/Ml	(µg/mL)
EXB	34,5±0,45 <sup>d,B</sup>	61,4±1,18 <sup>c,B</sup>	89,42±0,18 <sup>b,B</sup>	92,2±0,21 <sup>a,B</sup>	39,73 <sup>C</sup>
AA	96,44±0,17 <sup>e,A</sup>	96,7±0,06 <sup>e,A</sup>	96,93±0,06 <sup>e,A</sup>	96,82±0,17 <sup>e,A</sup>	5,79 <sup>D</sup>

Diferentes letras indicam diferença significativa, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas (p<0,001; One-way ANOVA, teste de Tukey). AA = ácido ascórbico. DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

Dartora e colaboradores (2011) utilizaram o extrato hidroetanólico das folhas de *I. paraguariensis*, com folhas jovens (1 mês) e maduras (6 meses) expostas ao sol e à sombra. Os maiores valores de inibição do radical DPPH foram encontrados para as folhas jovens submetidas à sombra: 23,93% (25 μg/mL), 25,09% (50 μg/mL), 39,23% (100 μg/mL) e 60,32% (200 μg/mL). Estes valores foram bem inferiores aos encontrados no presente estudo (Tabela 6).

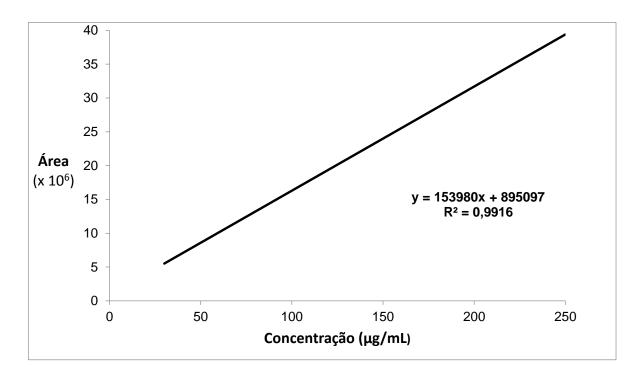
## 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E ÁCIDO CAFEICO POR CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem se tornando, nos últimos anos, uma das metodologias analíticas mais amplamente empregadas na análise quantitativa, devido a possibilidade de separar constituintes e simultaneamente quantificá-los com rapidez, confiabilidade e simplicidade. Substâncias de origem natural, estão inseridas em matrizes de grande complexidade, e a aplicação desta técnica na quantificação dessas substâncias tornou-se de suma relevância (SILVA, 2007a).

No extrato hidroalcóolico das folhas de *Ilex paraguariensis* foram caracterizados e quantificados os ácidos clorogênico e cafeico, compostos polifenólicos amplamente encontrados em quase todos os vegetais e frutas. São fitoquímicos antioxidantes que apresentam atividade biológica relacionada a lipofilicidade e pela presença dos grupos hidroxil substituintes do anel, e no caso dos ésteres fenólicos polihidróxilados pelo comprimento da porção éster (MORIDANI et al., 2001).

Para o cálculo da concentração das amostras foi realizada as curvas de calibração do ácido cafeico (Figura 26) e do ácido clorogênico (Figura 27). A Figura 28 mostra os perfis cromatográficos a 327 nm, com os respectivos espectros de UV com detector de arranjo de diodos (UV-DAD), obtidos para as substâncias de referência (Figura 28A) e EXB (Figura 28B).

Figura 26 – Curva padrão do ácido cafeico por CLAE.



Fonte: Autora.

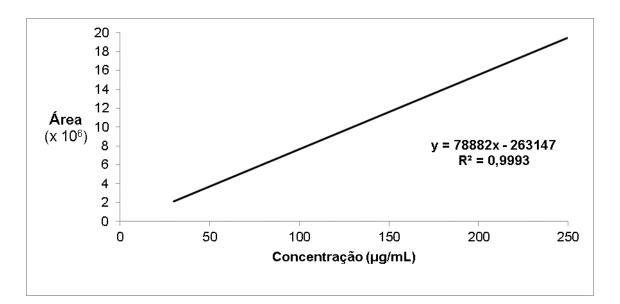
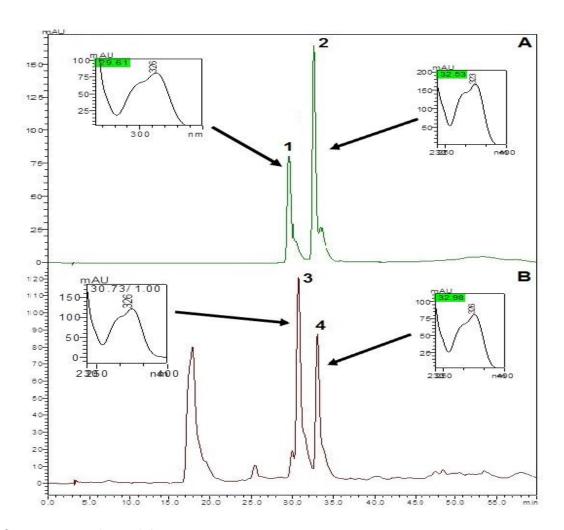


Figura 27 – Curva padrão do ácido clorogênico dosado por CLAE

Fonte: Autora.

De acordo com o Cromatograma (Figura 28B), identificaram-se o ácido clorogênico (3) e o ácido cafeico (4) no EXB, que foi diluído em metanol: água (1:1). A partir do método cromatográfico utilizado, observou-se que o tempo de retenção dos padrões ácido clorogênico (1) e ácido cafeico (2) foram, respectivamente, 29,61 e 32,53 min. A concentração de ácido clorogênico encontrada no EXB foi de 19,26 mg/g de extrato (1,92%), enquanto que para o ácido cafeico foi de 4,17 mg/g extrato (0,41%).

Figura 28 – Perfil cromatográfico dos ácidos clorogênico e cafeico do EXB de *l. paraguariensis* obtido por CLAE-DAD dos padrões e do EXB.



A: Cromatograma dos padrões B: Cromatograma do EXB 1 e 3: ácido clorogênico

2 e 4: ácido cafeico Fonte: Autora.

Gosman e colaboradores (2012), avaliaram a concentração de ácido clorogênico por CLAE dos extratos hidroetanólicos 70% das folhas frescas e das folhas secas de *llex paraguariensis*, encontraram valores duas vezes maiores de ácido clorogênico (10,40 mg/g de base seca) nas folhas frescas quando comparado ao extrato hidroetanólico das folhas secas (5,61 mg/g de base seca).

Silva e colaboradores (2007b) analisaram por CLAE extratos hidroetanólicos 40% das folhas secas de *Ilex paraguariensis* obtidos por turbo extração, decocção e infusão. Os valores encontrados para o ácido clorogênico foram, respectivamente, 2,06 mg/mL, 1,75 mg/mL e 1,53 mg/mL. Estes valores são superiores ao encontrado

no presente estudo, em que a concentração de ácido clorogênico para o EXB foi de 0,0578 mg/mL. Vários fatores influenciam na composição e na quantidade de compostos bioativos no extrato vegetal, tais como: o método empregado na extração, solvente, temperatura e fatores sazonais na coleta das folhas para o preparo dos extratos.

Anesini e colaboradores (2012) analisaram o conteúdo de ácido cafeico e ácido clorogênico dos extratos aquosos preparados por decocção das folhas de *Ilex paraguariensis* sem tratamento industrial e da erva-mate comercial. Os valores encontrados de ácido clorogênico e ácido cafeico para o extrato aquoso das folhas sem tratamento industrial, respectivamente, foram: 1,84g/100g de material de planta seca e 0,033 g/100g de material de planta seca. Para o extrato aquoso da erva-mate comercial, os valores de ácido clorogênico e ácido cafeico foram, respectivamente: 2,07 g/100g de material de planta seca e 0,033 g/100 g de material de planta seca.

## 4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FOTOESTABILIDADE DO EXB EM CULTURAS DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* baseia-se no fato que compostos químicos tóxicos podem afetar as funções básicas e comuns entre todas as células causando danos funcionais e estruturais mensuráveis. Estes testes de citotoxicidade usando culturas de células possibilitam de uma forma sensível, rápida e padronizada analisar a presença de moléculas biologicamente nocivas de um número elevado de extratos (LOPES et al., 2011).

As linhagens celulares são constituídas de uma população de células homogêneas de alta reprodutibilidade de fácil cultivo, tornando-se adequadas para se efetuar a triagem de citotoxicidade de substâncias isoladas e/ou misturas complexas como os extratos (LOPES et al., 2011). As células de fibroblastos são as células mais comuns entre todos os tipos de tecidos conjuntivos, sendo ativamente envolvidas na síntese e na manutenção da matriz extracelular colagenosa, na modulação do comportamento adjacente das células como migração, proliferação e diferenciação. Com isso, a avaliação biológica com culturas de fibroblastos pode ser considerada um bioensaio padrão para o fornecimento de informações confiáveis sobre a citotoxicidade basal (LOPES et al., 2011).

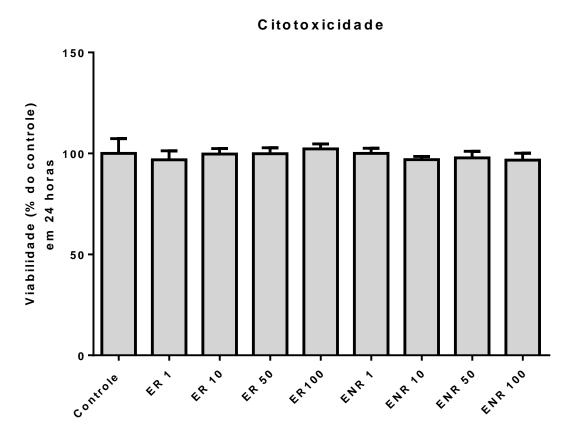
A exposição à RUV pode proporcionar a degradação dos componentes do extrato, produzindo subprodutos potencialmente citotóxicos. Com este propósito, o EXB foi exposto ao UVB como descrito no item 3.8.2, afim de avaliar a viabilidade celular nas células de fibroblastos.

Os efeitos citotóxicos do EXB irradiados e não irradiados foram avaliados em fibroblastos da linhagem HFF-1 de prepúcio humano de recém nascido por meio da avaliação da viabilidade celular. A viabilidade celular pode ser evidenciada por meio da utilização de corantes (ROGERO et al., 2003) sendo que neste estudo, o método escolhido foi o ensaio do MTT, o sal de tetrazolium.

O sal de tetrazolium, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem esse composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazan, insolúvel em água e de coloração roxo-azulado, que fica armazenado no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizado, pela adição de DMSO e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células (FUKUI et al., 2010).

A citotoxicidade observada em 24 horas nas células de fibroblastos HFF-1, tratadas com diferentes concentrações (1, 10, 50 e 100 μg/mL) do EXB irradiado e não irradiado ao UVB (0,23 J/cm²), foi expressa como percentual de viabilidade celular, ou seja, quanto menor o percentual maior a citotoxicidade. À medida que aumentou a concentração dos extratos aplicados nas células não se observou citotoxicidade, permanecendo assim com altas taxas de viabilidade, similar ao controle utilizado, no caso o mesmo solvente utilizado para o preparo das amostras. Esses resultados estão demonstrados na Figura 29.

Figura 29 – Percentual de viabilidade celular de fibroblastos após 24 horas (linhagem HFF-1) tratadas com EXB irradiado e não irradiado ao UVB em uma faixa de concentração de 1 a 100 μg/mL



Não houve diferença significativa entre os grupos analisados utilizando o One-way ANOVA com o teste de Dunnett (p<0,05).

Os resultados representam a média de cinco determinações ± DP.

ER: EXB irradiado; ENR: EXB não-irradiado; Controle: sem extrato.

Fonte: Autora.

O EXB irradiado (ER) ao UVB na dose correspondente a 2 MED, não gerou produtos citotóxicos, pois não ocorreu a diminuição da viabilidade celular nas concentrações testadas. Do mesmo modo, o EXB não irradiado (ENR) permaneceu com altas taxas de viabilidade celular, nas diferentes concentrações testadas.

Ambe e colaboradores (2016) avaliaram o potencial citotóxico dos extratos hidroetanólicos 70% das cascas de *Enantia polycarpa* e das folhas de *Mallotus oppositifolius* em diferentes concentrações (125, 250, 500 e 1000 μg/mL) nas células HFF-1. Estes pesquisadores observaram uma redução dose dependente (p<0,05) na viabilidade celular para o extrato de *Enantia polycarpa*, na concentração de 1000 μg/mL a porcentagem de viabilidade foi de 55% para células em divisão e 36% para as células confluentes, ambas quando comparadas ao controle. Enquanto que no

extrato de *Malllotus oppositifolius* houve proliferação celular, a porcentagem de viabilidade celular foi de 156% para células em divisão e 131% para células confluentes, ambas comparadas ao controle. Os autores atribuíram a citotoxicidade à composição do extrato da *Enantia polycarpa* que pode inativar a succinato desidrogenase, uma importante enzima mitocondrial, levando à toxicidade da célula.

Gosmann e colaboradores (2012) avaliaram os extratos hidroetanólicos 70% das folhas secas e verdes de *Ilex paraguariensis* na viabilidade celular em linhagem 3T3-L1 usando o ensaio do MTT. Observaram que os extratos não foram citotóxicos nas concentrações testadas 50 e 1000 µg/mL.

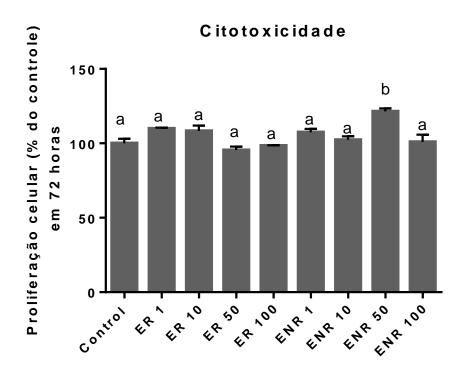
No presente estudo, observou-se um aumento da atividade mitocondrial nas células HFF-1 (p<0,05) comparado ao controle (sem extrato), utilizando o extrato não irradiado na concentração de 50 μg/mL (ENR 50) em 72 horas (Figura 30). Esse resultado indica uma possível indução da proliferação celular na concentração de 50 μg/mL, de forma não dose-dependente, além de um possível efeito anti-senescente do EXB. Esse resultado pode ser similar a estudos feitos com outras plantas ricas em cafeína e catequina, como é o caso do guaraná. Em um estudo conduzido por Machado e colaboradores (2015), os autores relataram o aumento da proliferação celular em células-tronco senescentes oriunda de lipoaspirados humanos. No entanto, a ação modulatória da proliferação celular dos fibroblastos do presente estudo necessita ser esclarecida em estudos futuros.

Tsuruya e colaboradores (2014), examinaram os efeitos de proantocianidinas foto-irradiadas e não irradiadas em fibroblastos de camundongos 3T3-L1. Observaram que independente da exposição à radiação, no tempo de 1 minuto, as proantocianidinas expostas às células promoveram a proliferação celular (p<0,01) numa concentração dose dependente. Do mesmo modo, observou-se que o pré-tratamento das células com ácido cafeico, ácido clorogênico e catequina impulsionaram a resposta proliferativa dessas células. No entanto, a base molecular para justificar a proliferação não foi analisada.

Dinda e colaboradores (2016), avaliaram a base molecular e celular da atividade de cicatrização de feridas mediada pelo extrato das flores de *Calendula officinalis* em sistema modelo *in vivo* e *in vitro*. Concluíram que tanto o extrato hidroetanólico quanto a fração aquosa de *C. officinalis* proliferaram células de fibroblastos *in vitro* e *in vitro*, além de induziram a formação do tecido de granulação pela expressão de CTGF e α-SMA. A proliferação de fibroblastos *in vitro* foi

observada de forma dose dependente com proliferação máxima na concentração de 100 μg/mL (140±5%) comparada às células não tratadas. Dentro das frações testadas (aquosa, hexânica e acetato de etila), a fração aquosa foi a única que promoveu a proliferação das células numa faixa de 50–100 μg/mL (130 ± 3%) comparada às células não tratadas. Os constituintes majoritários encontrados no extrato hidroetanólico de *C. officinalis* foram quercetina e rutina, porém as atividades biológicas foram atribuídas à sinergia dos bioativos no extrato.

Figura 30 – Percentual da proliferação celular após 72 horas de fibroblastos (linhagem HFF-1) tratadas com EXB irradiado e não irradiado ao UVB em uma faixa de concentração de 1 a 100 μg/mL



Diferença significativa entre o grupo ENR 50 e o controle analisados utilizando o One-way ANOVA com o teste de Dunnett (p<0,05).

Os resultados representam a média de cinco determinações ± DP.

ER: EXB irradiado; ENR: EXB não-irradiado; Controle: sem extrato.

Fonte: Autora.

# 4.5 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA DO EXB E DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXB

Nos últimos anos, houve um aumento expressivo no uso de suplementos botânicos para proteger a pele humana dos efeitos adversos da radiação solar

(VARANI et al., 2001). Desse modo, há uma tendência para o desenvolvimento de produtos com componentes naturais, preferencialmente os de origem vegetal. Sendo assim, a capacidade do EXB em reduzir as lesões induzidas pela radiação UVB, quando incorporado a uma formulação cosmética, foi avaliada por meio da atividade de metaloproteinases, pela inibição da secreção de mieloperoxidases (eficácia anti-inflamatória) e da degradação do colágeno.

No presente estudo, preparou-se uma emulsão de base não-iônica, que tem como característica a utilização da base Polawax®. As emulsões contendo emulsionante não-iônico são amplamente empregadas em formulações cosméticas devido às suas características e propriedades, como, por exemplo, compatibilidade com o pH cutâneo, estabilidade frente a diferentes valores de pH e a possibilidade de incorporação de diferentes substâncias ativas, como ácidos em geral e extratos vegetais (MILAN et al., 2007). A concentração (5%) utilizada no estudo foi baseada nos resultados encontrados por Barg e colaboradores (2014).

# 4.5.1 Avaliação do EXB e da formulação tópica (in vivo) na atividade de metaloproteinases da pele de camundongos após a exposição aguda à radiação UVB por zimografia

A técnica de zimografia utilizada no presente trabalho, também chamada de zimografia de substrato, é um dos ensaios mais amplamente utilizados para a detecção de atividade de metaloproteinases (MMPs). É uma técnica eletroforética, denominada SDS-PAGE, que contém um substrato (gelatina, colágeno, caseína, etc.) copolimerizado em um gel de poliacrilamida para detecção da atividade enzimática. Esta fundamentado na separação das enzimas por peso molecular, as formas ativas e inativas (zimógenos ou pro-MMPs) são visualizadas devido as suas diferenças de pesos moleculares. Dependendo do substrato, diferentes tipos de MMPs podem ser detectados. O substrato mais utilizado é a gelatina, que foi utilizado nesse trabalho, para a detecção das MMPs 2 e 9 (gelatinases) (KUPAI et al., 2010).

A zimografia de gelatina pode detectar as gelatinases em fluidos biológicos (urina, soro, líquido pleural, meios de cultura, etc.) e em tecidos. As proteínas são separadas em um meio desnaturante (dodecil sulfato de sódio – SDS) presente no gel junto com a acrilamida, em condições não redutoras e sem aquecimento prévio. O aquecimento causa a precipitação das proteínas e o agente redutor (mercaptanol,

ureia, etc.) rompe as ligações dissulfeto impedindo a redobragem (renaturação) das MMPs após a eletroforese. A separação ocorre no gel de poliacrilamida que contém a gelatina (substrato das MMPs 2 e 9) copolimerizada. Durante a corrida, o SDS causa a desnaturação das gelatinases, desdobrando o pró-domínio para fora do sítio catalítico através da dissociação da Cys<sup>73</sup> do íon zinco. Após a corrida, o gel é lavado com um detergente não-iônico (Triton<sup>®</sup> X-100), que retira o SDS e renatura as enzimas novamente em um tampão contendo o íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>), devido as gelatinases serem também cálcio-dependentes.

Durante esta incubação, as enzimas recuperam parcialmente sua estrutura e atividade e as gelatinases latentes são auto-ativadas sem clivagem. Se a gelatinase está ativa, a gelatina é digerida e convertida em peptídeos de baixo peso molecular. Subsequentemente, a coloração com o corante Comassie<sup>®</sup> Blue indica a zona de lise como uma região clara em um fundo azul uniforme de substrato não degradado. Finalmente, as bandas podem ser quantificadas por densitometria (KUPAI et al., 2010; RICCI et al., 2015).

Para realizar uma análise mais precisa dos resultados, a atividade enzimática (cada MMPs) foi representada em porcentagem com relação à atividade (cada MMPs) do grupo exposto (G2) ao UVB, sendo que para esse foi considerado 100% de atividade (ou 0% de inibição) (Figura 33 e 35 e Tabelas 7 e 8).

Analisando os resultados das atividades da pro-MMP-2 *in vivo* (Figura 31) por meio da % de atividade, observa-se que os grupos G1 (controle) e G2 (exposto) expressaram atividades semelhantes, o que confirma que a pro-MMP-2 é constitutiva mesmo em tecidos saudáveis (ZHOU et al., 2009).

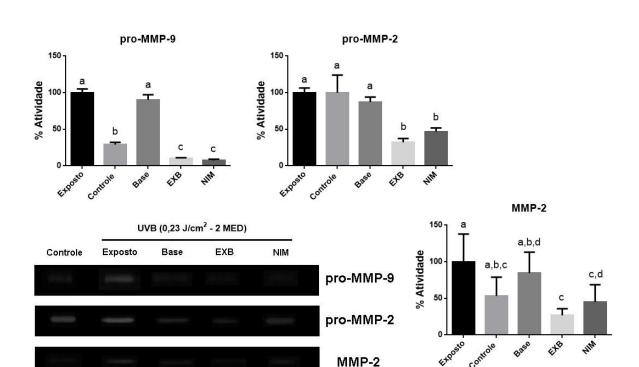


Figura 31 – Resultados das atividades das MMPs na zimografia in vivo

Atividade enzimática (%) expressa em unidades arbitrárias normalizada pelo grupo Exposto (G2, irradiado) ao qual foi atribuído 100% de atividade.

Diferentes letras indicam diferença significativa (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey).

pro-MMP-9: p<0,001; pro-MMP-2: p<0,001; MMP-2: p<0,05.

NIM: nimesulida

EXB: extrato bruto 40%

Fonte: Autora.

A exposição aguda ao UVB induz uma resposta inflamatória imediata com eritema e infiltração de leucócitos. Tem sido sugerido que a modulação dos fatores de transcrição, como o NF-κB pelas EROs, é um dos eventos precoces e centrais na indução do processo inflamatório (FUCHS et al., 2001).

Com base nos resultados dos grupos tratados no ensaio *in vivo* para a MMP-2, a formulação contendo EXB e a nimesulida (NIM) apresentaram potencial inibitório, comparando-se ao grupo exposto (G2). A NIM, um inibidor seletivo da COX-2, é conhecido também por inibir as MMPs (WANG et al., 2007). Assim, supõese que a NIM tenha apresentado atividade inibitória pelo mecanismo proposto no item 2.2, semelhante ao celecoxibe (STEENPORT et al., 2009). Por essa mesma justificativa, sugere-se que a formulação contendo nimesulida e creme contendo EXB também promoveram atividade inibitória da MMP-2.

Conforme relatado no item 2.2 (Figura 8), TNF-α promove a ativação da pro-MMP-2 pela via de sinalização do NF-κB, que promove a transcrição de MT1-MMP que ativa a pro-MMP-2 para MMP-2 juntamente com a TIMP-2 (HAN et al., 2001). Segundo Zhang e colaboradores (2014), o ácido cafeico possui atividade anti-inflamatória e a capacidade de reduzir os níveis e a produção de TNF-α. Com isso, supõe-se que o ácido cafeico do EXB possa ter inibido a expressão de TNF-α e, consequentemente, diminuído a ativação da MMP-2 (Tabela 7).

A inibição da expressão da pro-MMP-9 no ensaio *in vivo* pode ter ocorrido também pelo mecanismo anti-inflamatório dos constituintes do EXB, principalmente pelos ácidos fenólicos (ácido cafeico e ácido clorogênico) e seus derivados dicafeoilquínicos. O provável mecanismo de inibição pode ter ocorrido pela inibição do TNF-α pelo ácido cafeico presente no EXB, conforme relatado por Zhang e colaboradores (2014). Assim, a expressão de TIMP-1 é aumentada podendo inibir a atividade da pro-MMP-9, pois o TNF-α possui a capacidade de inibir a TIMP-1 (HAN et al., 2002).

Tabela 7 – Atividade enzimática (%) das MMPs nos grupos tratados no ensaio *in vivo* 

	Atividade enzimática ± DP (%) <sup>*</sup>					
	pro-MMP-9 pro-MMP-2 MMP-2					
Exposto <sup>*</sup>	100±5,1 <sup>A</sup>	100±6,29 <sup>A</sup>	100±37,96 <sup>A</sup>			
Controle	29,2±2,99 <sup>B</sup>	102,51±20,99 <sup>A</sup>	45,37±26,6 <sup>A,B,C</sup>			
Base	90,2±6,97 <sup>A</sup>	87,35±6,61 <sup>A</sup>	84,72±28,51 <sup>A,B,D</sup>			
EXB	10,14±1,04 <sup>C</sup>	32,29±5,08 <sup>B</sup>	26,92±8,84 <sup>C</sup>			
NIM	7,47±1,53 <sup>C</sup>	46,8±5,01 <sup>B</sup>	45,26±23,43 <sup>C,D</sup>			

porcentagem de atividade enzimática considerando o grupo exposto (G2) com 100% de atividade. Diferentes letras indicam diferença significativa (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey). pro-MMP-9: p<0,001; pro-MMP-2: p<0,001; MMP-2: p<0,05. Fonte: Autora.

Schinella e colaboradores (2014) mostraram o efeito anti-inflamatório tópico e sistêmico do extrato aquoso de *llex paraguariensis* frente a um modelo animal de inflamação demonstrando o efeito inibitório do extrato frente a COX-2 e, consequentemente, frente à PGE<sub>2</sub>. Mostraram também uma redução na infiltração de neutrófilos e macrófagos e na secreção de TNF-α. Nesse estudo os autores utilizaram como anti-inflamatório de referência a indometacina, um inibidor não-

seletivo da COX. No presente estudo foi utilizado como referência a nimesulida, um inibidor seletivo de COX-2, o que reforça a suposição que o EXB apresentou um potencial efeito anti-inflamatório, inclusive por inibição da COX-2, que consequentemente pode ter diminuído a expressão de pro-MMP-9 pelo mecanismo descrito anteriormente (item 2.2, Figura 9). Essa suposição é sugerida observando-se os resultados na Tabela 7, mostrando que não houve diferença estatística na atividade inibitória do EXB e da nimesulida.

No estudo de Shi e colaboradores (2012), o ácido cafeico e derivados apresentaram a capacidade de ligar-se ao sítio S1´ da MMP-2 e, o oxigênio do grupamento carbonila, de ligar-se ao íon zinco catalítico da enzima promovendo a sua inativação enzimática (Figura 32). Baseado nessa teoria, supõe-se que esse mecanismo possa ter sido o responsável por inibir as atividades enzimáticas da MMP-2 nos ensaios onde os géis foram incubados com EXB (50 e 100 μg/mL) (Figura 33). Observou-se que não houve diferença estatística na inibição de MMP-2 pelo EXB (50 e 100 μg/mL) e o EDTA, que é utilizado como inibidor por ser quelante do zinco (co-fator para a atividade das MMPs). Dessa maneira, o EXB parece ser um uma nova alternativa para inibidores de MMP-2.

His 65

Val 117

Library

1,324

Library

Librar

Figura 32 – Ancoragem da molécula de ácido cafeico no sítio S1´ da MMP-2

Fonte: Shi et al. (2012).

No ensaio onde os géis foram incubados com EXB (50 e 100 μg/mL), não houve diferença estatística entre a inibição da MMP-2 e da pro-MMP-2 (Tabela 8 e Figura 33).

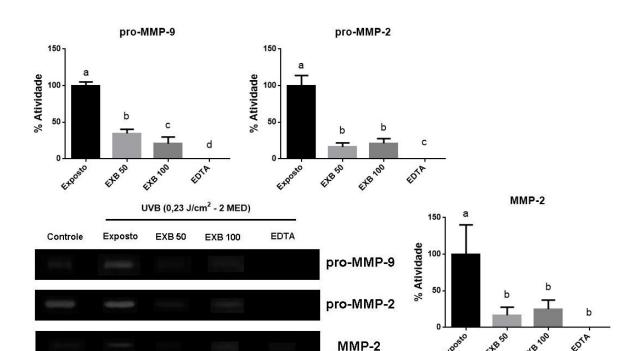


Figura 33 – Atividades das MMPs nos géis incubados com EXB

Atividade enzimática (%) expressa em unidades arbitrárias normalizada pelo grupo Exposto (G2, irradiado) ao qual foi atribuído 100% de atividade.

Diferentes letras indicam diferença significativa (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey). pro-MMP-9: p<0,01; pro-MMP-2: p<0,001; MMP-2: p<0,001.

Fonte: Autora.

Com relação à atividade da pro-MMP-9, a inibição se deu de forma dose dependente com diferença estatisticamente significativa (Tabela 8). Assim como ocorreu com a pro-MMP-2, o ácido cafeico e seus derivados, presentes no EXB podem ter quelado o zinco do sítio ativo, impedindo a atividade parcial da pro-MMP-9 (SHI et al., 2012).

Tabela 8 – Ativ	idade enzimática	(%)	das MMPs nos	géis tratados	com EXB.
-----------------	------------------	-----	--------------	---------------	----------

	Atividade enzimática ± DP (%)*					
	pro-MMP-9	pro-MMP-2	MMP-2			
Exposto <sup>*</sup>	100±5,1 <sup>A</sup>	100±13,81 <sup>A</sup>	100±40,17 <sup>A</sup>			
EXB 50	34,72±5,63 <sup>B</sup>	16,14±5,66 <sup>B</sup>	16,53±11 <sup>B</sup>			
<b>EXB 100</b>	20,69±9,61 <sup>C</sup>	21,05±6,63 <sup>B</sup>	25,07±12,4 <sup>B</sup>			
EDTA	0 <sup>D</sup>	$0_{\rm C}$	0 <sup>B</sup>			

porcentagem de atividade enzimática considerando o grupo exposto (G2) com 100% de atividade. Diferentes letras indicam diferença significativa (One-way ANOVA seguido de teste de Tukey). pro-MMP-9: p<0,01; pro-MMP-2: p<0,001; MMP-2: p<0,001. Fonte: Autora.

Curiosamente, a MMP-9 não foi expressa em nenhum dos grupos tratados, inclusive no grupo exposto ao UVB sem tratamento (G2). A possível explicação para isso se deve às EROs, que podem ativar (via oxidação do grupo tiol do pro-domínio seguido da clivagem autolítica) e, subsequentemente, inativar as MMPs (via modificação de aminoácidos críticos para a atividade catalítica). O ácido hipocloroso (HOCI) é um produto da mieloperoxidase (MPO) dos neutrófilos, que foi altamente expressa no grupo exposto (Figura 36). Os radicais hidroxila do HOCI podem ativar a pro-MMP-9, pois o tiol da cisteína do pro-domínio é o alvo preferido do HOCI e a sua oxigenação leva a uma ativação rápida. No entanto, a produção sustentada de HOCI modifica sítios adicionais da enzima, fazendo com que esta perca sua atividade catalítica (RA; PARKS, 2007).

Diversos estudos já relacionaram o ácido cafeico com atividades antiinflamatórias, antioxidantes, fotoprotetora e de proteção da pele.

A radiação UVB ativa marcadores pró-inflamatórios como TNF-α, IL-6, iNOS e a proteína inflamatória COX-2, iniciando a cascata de sinalização intracelular e resultando na fosforilação e degradação do IκB, inibidor endógeno do NF-κB, que promove mudanças patofisiológicas, podendo promover a carcinogênese (TANAKA et al., 2001). Balupillai e colaboradores (2015) avaliaram o efeito do ácido cafeico na inflamação induzida pela radiação UVB em camundongos. A administração tópica e intraperitoneal de ácido cafeico antes da exposição diminuiu os marcadores inflamatórios TGF-β, VEGF e iNOS na pele, além de ter mostrado um potencial efeito como protetor solar.

Zhang e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do ácido cafeico na inflamação crônica da pele de camundongos e em queratinócitos *in vitro*. Os resultados mostraram que o tratamento tópico com ácido cafeico reduziu significantemente os níveis e a produção de TNF-α e a ativação do NF-κB induzido por TNF-α nos queratinócitos, bloqueando também a atividade da MPO. Os autores sugeriram que o ácido cafeico pode ser um potencial agente terapêutico contra doenças inflamatórias da pele.

Em outro estudo, os autores isolaram o ácido cafeico do extrato das hastes de *Euonymus alatus*. O ácido cafeico isolado inibiu a atividade das MMPs 2 e 9, mas não inibiu as atividades das MMPs 1, 3 e 7. O derivado esterificado do ácido cafeico (CAPE) apresentou um efeito inibitório mais forte. O ácido cafeico e o CAPE mostraram também bloquear a ativação de NF-κB mediada por PMA, um ativador da NF-κB, bloqueando sua translocação nuclear (CHUNG et al., 2004). Essa atividade inibitória pode ser explicada por um estudo posterior, onde os autores realizaram análises da relação estrutura-atividade do ácido cafeico e derivados (CAPE) sobre as MMPs 2 e 9. Os autores mostraram que o ácido cafeico e CAPE inibem seletivamente a MMP-2 e MMP-9, através da ligação dos grupos ésteres maiores dos CAPE que se ligam ao sítio S1' das enzimas e da ligação do oxigênio do grupamento carbonila ao zinco do sítio ativo (SHI et al., 2012).

Há alguns estudos na literatura que também avaliaram o potencial de extratos de plantas frente as MMPs induzidas por UVB em peles de animais.

Park e colaboradores (2014) avaliaram o efeito do extrato etanólico de *Kaempferia parviflora* em peles de camundongos sem pelo submetidos à radiação UVB. Os resultados mostraram que a administração oral do extrato reduziu a atividade e expressão da MMP-2 e MMP-9, além dos mediadores inflamatórios NF- kB e COX-2, que aumentam a produção de MMPs.

Jung e colaboradores (2014) analisaram o efeito do extrato de *Pinus densiflora* no fotoenvelhecimento e investigaram o mecanismo de ação em fibroblastos humanos após a exposição ao UVB. Os autores mostraram que o extrato inibiu a citotoxicidade induzida por UVB, a expressão de MMP-1, -3 e -9 nos fibroblastos e diminuiu a atividade e expressão de MMP-2, mostrando ser um potencial agente antienvelhecimento.

Outro estudo, realizado por Ropke e colaboradores (2006), avaliaram a inibição *in vitro* e *in vivo* de MMPs da pele, pelo extrato de *Pothomorphe umbellata* e

do seu principal ativo isolado, 4-nerolidilcatecol (4-NC). Por meio da zimografia, concluíram que o extrato (100 μg/mL) apresentou a inibição mais forte do que o 4-NC, sugerindo a presença de outros compostos que poderiam agir de forma sinérgica, potencializando o efeito inibitório. Aplicando as mesmas condições *in vitro*, o extrato das folhas de P. *umbelatta*, cuja concentração de 4-NC foi 30 % menor em relação ao extrato da raiz, foi capaz de inibir em 80 % a atividade de pro-MMP-2 e -9.

Na literatura, o único trabalho que utilizou o extrato da erva-mate frente a atividade de uma enzima que age nos componentes da MEC foi a pesquisa realizada por Xu e colaboradores (2009). Os autores analisaram os constituintes químicos das folhas de *I. paraguariensis*, extraída pelo método de maceração utilizando como solvente extrator o metanol por três dias, obtendo 579 g de liofilizado. Posteriormente, o extrato bruto foi particionado com n-hexano e acetato de etila, avaliando-se a fração e o extrato bruto como inibidores da elastase de neutrófilos humanos (HNE). Os resultados demonstraram que os derivados do ácido dicafeoilquínico (ácido clorogênico) e dos flavonoides exibiram potente atividade inibitória da HNE com IC<sub>50</sub> entre 1,4 a 7,3 μM. Concluíram que a relação entre a estrutura e a atividade sugere que a posição de ligação e o número de grupos cafeoil ligada ao ácido quínico influenciam a potência inibitória.

É relatado na literatura também que os ácidos cafeico e clorogênico podem permear as camadas da pele.

Marti-Mestres e colaboradores (2007) realizaram um estudo de permeação comparativa entre os ácidos cafeico e clorogênico em peles de orelha de porco. Os autores demonstraram que ambos os compostos são capazes de penetrar através do estrato córneo, sendo que o acido clorogênico possui uma absorção percutânea superior em relação ao ácido cafeico. Esse estudo reforça a ideia de que a formulação com EXB pode sim ter apresentado o efeito inibitório das MMPs por meio desses compostos fenólicos, reforçando a possibilidade de ter ocorrido a permeação desses ativos na pele dos animais tratados. No entanto, é necessário um estudo na adequação da formulação, quanto aos aspectos sensoriais, reológicos e farmacotécnicos.

Desse modo, os resultados de inibição da atividade das MMPs relatados no presente trabalho, utilizando o extrato bruto das folhas de erva-mate como ingrediente, tornam-se promissores para o desenvolvimento de formulações

antienvelhecimento, devido à escassez de estudos utilizando essa matéria-prima para o objetivo proposto.

## 4.5.2 Avaliação da eficácia anti-inflamatória da formulação adicionada de EXB por meio da atividade da mieloperoxidase

Apesar da pele possuir mecanismos de defesa antioxidante endógenos, como a glutationa reduzida (GSH), ácido ascórbico e ubiquinona 9, os neutrófilos são capazes de danificar os tecidos inflamados oxidativamente. Isso se deve principalmente à localização dos mecanismos antioxidantes celulares que favorecem o catabolismo dos oxidantes gerados intracelularmente, e esses mecanismos são ineficientes contra a grande quantidade de oxidantes gerados pelos neutrófilos. Outro motivo se deve pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO) pelos neutrófilos ativados durante o processo inflamatório. Essa enzima possui uma alta afinidade pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e, portanto, compete com outras enzimas protetoras para este substrato. Consequentemente, é favorecido a transformação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido hipocloroso (HOCI). Assim, torna-se inevitável a ocorrência de um desequilíbrio oxidante/antioxidante durante a resposta inflamatória (CASAGRANDE et al., 2006; OTTONELLO et al., 1993).

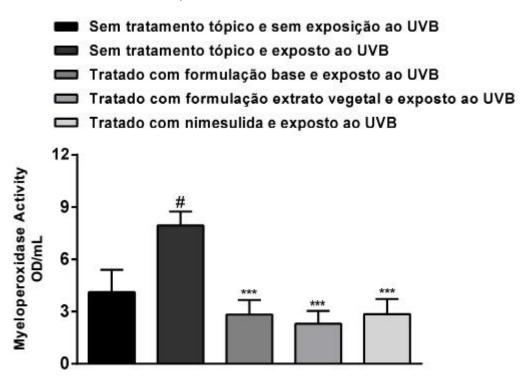
Portanto, Bradley e colaboradores (1982) descreveram o procedimento utilizado para avaliar a inflamação cutânea pela quantificação da MPO epidermal e, desde então, ela vem sendo usada como biomarcador para mensurar o influxo de neutrófilos e inflamação na pele após uma injúria. É sugerido que o ensaio da MPO é simples e específico para quantificar o acúmulo ou infiltração de neutrófilos em vários processos inflamatórios (XIA; ZWEIER, 1997).

Casagrande e colaboradores (2006), descreveram que a irradiação UVB induz um aumento dose dependente (0,61 - 3,69 J/cm²) na atividade de MPO na pele de camundongos sem pelos. Curiosamente, no presente estudo, a irradiação UVB (0,23 J/cm²) induziu um aumento de 93,4±9% na atividade de MPO quando comparado ao grupo controle sem irradiação (p<0,001) (Figura 42).

A administração tópica da formulação adicionada do EXB e da formulação base (sem extrato), após 24 horas, provocou uma queda, respectivamente, de 71,1±4% e 64,4±5%, da atividade de MPO em relação ao controle irradiado (IR) (p<0,001) (Figura 34). Sugere-se que os constituintes da formulação como o BHT,

que é um antioxidante, pode ter bloqueado os radicais livres gerados pela exposição e responsáveis pela ativação dos mediadores do processo inflamatório, como a migração de neutrófilos para a área exposta. No entanto, não houve diferença significativa entre a formulação EXB e a formulação base, sugerindo-se que o EXB não modulou o efeito anti-inflamatório, medido pela atividade de mieloperoxidase. Observou-se também uma redução de 64,1% da atividade de mieloperoxidase no controle positivo (nimesulida).

Figura 34 – Atividade da mieloperoxidase



Efeito do creme base, nimesulida ou creme contendo o EXB 24 h após os tratamentos sobre a atividade da mieloperoxidase no tecido da pele de animais submetidos a queimadura por irradiação UVB. As barras representam a media +S.E.M. para 5 animais. \*p<0.001 quando comparado aos animais sem tratamento tópico e sem exposição ao UVB, \*p<0.001 quando comparado aos animais sem tratamento tópico e expostos ao UVB. One-way ANOVA seguido de Bonferroni's post hoc test. Fonte: Autora.

Ottonelo e colaboradores (1993), observaram que a nimesulida reduz as funções da atividade de mieloperoxidase por exercer efeito inibitório diretamente nas células, por regulação do ânion superóxido e  $H_2O_2$ , consequentemente reduzindo a disponibilidade desses para a conversão pela MPO; ou por inativação direta do HOCl gerada pela MPO.

Fonseca e colaboradores (2010) verificaram a eficácia fotoprotetora do extrato de *Calendula officinalis* em formulações tópicas, avaliando a atividade de MPO,

níveis de GSH e MMP-9 na pele de camundongos após a exposição ao UVB numa dose de 2,87 J/cm<sup>2</sup>. A formulação foi capaz de manter os níveis de GSH quando comparados ao grupo não irradiado. No entanto, não foi capaz de inibir a MMP-9 e a atividade de MPO.

Assim, o presente estudo mostrou que a formulação contendo EXB inibiu a atividade da MPO, não por modulação da inflamação, mas provavelmente pela ação antioxidante de seus componentes fitoquímicos e do creme base, reduzindo a ação do  $H_2O_2$ , substrato para a atividade da MPO.

#### 4.5.3 Avaliação da degradação do colágeno por Picrosirius Red

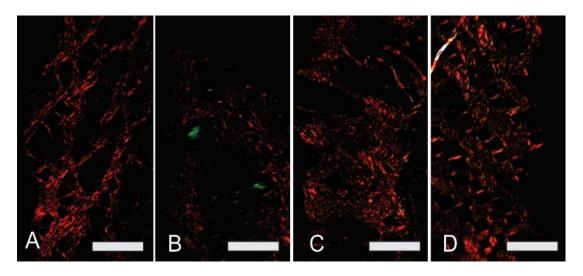
A técnica de coloração histoquímica de Picrosirius Red, utilizada para avaliar o efeito fotoprotetor da formulação de erva-mate, após a exposição ao UVB, é uma técnica simples, reprodutível e de alta especificidade. Devido a sua alta sensibilidade é possível diferenciar as fibras de colágeno tipo I e III, com aspecto brilhante em fundo escuro sob a luz polarizada.

O padrão resultante e disposição das fibras de colágeno analisadas por meio da luz polarizada tem sido amplamente utilizado para avaliar o reparo do tecido conjuntivo (RICH; WHITTAKER, 2005). A partir das lâminas, é possível visualizar a distribuição de fibras grossas, avermelhadas e maduras (colágeno tipo I); finas, esverdeadas e jovens (colágeno III) (Figura 43). A diminuição do colágeno tipo I na pele causada pela irradiação UV é a principal razão do fotoenvelhecimento, levando ao aumento na relação do colágeno tipo III e colágeno tipo I (FAN; ZHUANG; LI, 2013). A irradiação UV diminui o colágeno tipo I através de dois caminhos interdependentes: estimulação da degradação do colágeno e inibição da produção do procolágeno tipo I (CHEN et al., 2015; JUNG et al., 2014).

No presente estudo, a radiação aguda ao UVB (0,23 J/cm²) diminuiu expressivamente na pele os níveis de colágeno tipo I (Figura 35B). As fibras mostraram-se desorganizadas, além do aumento na relação dos colágenos tipo III e I, observadas pelas fibras esverdeadas. Mudanças histológicas, tais como: desorganização de fibras de colágeno, deposição excessiva de fibras elásticas anormais, redução do conteúdo de colágeno, e aumento na relação dos colágenos tipo III e I ocorrem no fotoenvelhecimento (HSIEH et al., 2013; FAN; ZHUANG; LI, 2013). Em relação ao grupo tratado com nimesulida (Figura 35A), observou-se

feixes de colágeno tipo I paralelamente arranjados e entrelaçados, enquanto o colágeno tipo III dificilmente pôde ser visualizado entre os feixes. No grupo tratado com a formulação base (Figura 35C), as fibras mostraram-se desorganizadas e com a formação de sulcos na estrutura, sendo possível visualizar o colágeno tipo III (jovem). Enquanto o grupo tratado com formulação extrato de *I. paraguariensis* (EXB) (Figura 35D), os feixes de colágeno tipo I mostraram-se entrelaçados, mais organizados, homogêneos e melhores distribuídos na estrutura dérmica.

Figura 35 – Fotomicrografia de seções de pele do dorso coradas com picrosirius red.



A: grupo tratado com nimesulida. B: grupo exposto ao UVB. C: grupo tratado com formulação base. D: grupo tratado com formulação EXB. Fotomicrografias em luz polarizada (Coloração Picrosirius Red, barra = 250 µm).

Fonte: Autora.

Fonseca e colaboradores (2010), investigaram o potencial uso de formulações tópicas contendo *Calendula officinalis* contra danos na pele induzidos por radiação UVB. Avaliaram diversos parâmetros: níveis de GSH, atividade de proteinase cutânea, migração de leucócitos, análises histológicas de infiltrados inflamatórios e a aparência e disposição do colágeno. A formulação com extrato de *Calendula officinalis* preservou a estrutura dérmica, os feixes de colágeno mostraram-se grossos, fortemente entrelaçados e levemente ondulados.

Outro estudo, avaliou o efeito do hidrolisado da gelatina (HC) do *Gadus* macrocephalus na redução do colágeno e inflamação induzida por UV em peles de camundongos fotoenvelhecidos. Esse estudo demonstrou que o HC pode melhorar

alterações patológicas induzidas por irradiação UV no tecido conjuntivo. Além disso, o HC melhorou a distribuição dos colágenos tipo I e III e diminuiu a relação dos colágenos III e I (CHEN; HOU, 2016).

No presente estudo, a dose utilizada de UVB foi suficiente para provocar a degradação do colágeno, no grupo exposto. Concomitante com o aumento na liberação/secreção de metaloproteinases (MMP-2) e mieloperoxidases, enzimas responsáveis pelo rompimento do colágeno dérmico (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2008). A perda do entrelaçamento, que é característico do colágeno, foi observada no grupo exposto e tratado com formulação sem EXB, sugerindo um desequilíbrio na dinâmina da síntese e degradação do colágeno, desse modo, a arquitetura dessas moléculas torna-se desorganizadas. Além disso, uma vez que a liberação de MMP-2 foi maior no grupo tratado com formulação sem EXB justifica a semelhança no padrão de colagenização com o grupo apenas exposto ao UVB.

O EXB mostrou ser capaz de estimular a proliferação de fibroblastos *in vitro*, como relatado nesse estudo. Portanto, a formulação incorporada de EXB aplicada nesse ensaio pode levar a um aumento na síntese de colágeno como resultado de um aumento no número de células que o sintetizam. A rutina, apesar de não ter sido identificada no EXB, está presente na erva-mate (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007) e pode estar secundariamente envolvida no processo de colagenização. Tem sido demonstrado que a rutina é capaz de prejudicar a glicação do colágeno, um evento bioquímico envolvido na patogênese do dano celular causado pela RUV. A formação de produtos celulares de glicação foi anteriormente relacionada com a diminuição da reabsorção de colágeno (CERVANTES-LAUREAN et al., 2006; DEGROOT et al., 2001; MASAKI; OKANO; SAKURAI, 1999).

Gugliucci e colaboradores (2009), avaliaram a capacidade de anti-glicação de alguns componentes do extrato aquoso da erva-mate (ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido oleanólico). Concluíram que os compostos polifenólicos apresentaram forte efeito anti-glicante, e em muitos casos, efeito maior que a aminoguanidina, um conhecido agente anti-glicante. Reiterando, a importância do sinergismo entre as diferentes classes encontradas no extrato bruto de erva-mate.

# **5 CONCLUSÃO**

Por meio dos estudos realizados com a espécie *llex paraguariensis* A. St. Hil. pôde-se concluir:

- O rendimento do extrato bruto (EXB), usando o solvente hidroetanólico 40% foi expressivo; visto a importância ambiental e econômica para redução da utilização de solventes orgânicos;
- O EXB apresentou alto teor de bioativos de grande interesse cosmético como os ácidos fenólicos (ácido clorogênico e ácido cafeico);
- O EXB mostrou possuir uma excelente capacidade antioxidante pelos métodos empregados, sendo que em sistemas lipídicos parece agir na primeira fase da lipoperoxidação;
- Nas concentrações avaliadas, o EXB irradiado e não irradiado não foram citotóxicos para as células de fibroblastos da linhagem HFF-1;
- Houve proliferação das células apenas na concentração de 50 μg/mL, usando o EXB não irradiado, sugerindo-se que o EXB irradiado apresentou uma fotoinstabilidade na dose aguda testada;
- A dose de UVB (0,23 J/cm²) não possibilitou a detecção por zimografia de substrato da MMP-9 ativa, porém, foi suficiente para degradar o colágeno;
- A formulação EXB mostrou-se eficaz em diminuir a secreção/atividade da MMP-2 e do zimógeno pro-MMP-9, fato não ocorrido para o grupo tratado com a formulação sem EXB;
- A formulação EXB inibiu 89,86% a secreção/atividade da pro-MMP-9.
   Sugere-se que o EXB possa atua via inibição de citocinas inflamatórias (TNF-α e NF-Kb);
- No ensaio onde os géis foram incubados com EXB, apenas houve diferença significativa na inibição da pro-MMP-9, sendo de forma dosedependente;
- As formulações com EXB e sem EXB diminuíram a atividade da mieloperoxidase (MPO), no entanto, sem diferença significativa entre eles e a nimesulida; sugerindo que os constituintes da formulação (BHT) base

- podem ter sido os responsáveis pelo resultado, através do mecanismo antioxidante.
- O efeito protetor da formulação EXB na degradação do colágeno foi claro quando comparado aos demais grupos.

O conjunto de dados indicam que o tratamento tópico com o creme contendo o extrato hidroetanólico 40% de *Ilex paraguariensis* exerce um efeito protetor na pele contra os efeitos nocivos de uma exposição aguda ao UVB, como a degradação do colágeno e inibição das metaloproteinases (MMPs), possuindo um efeito antienvelhecimento. No entanto, necessita-se mais estudos que comprovem o mecanismo molecular de inibição da atividade e/ou expressão das MMPs pelos constituintes fitoquímicos do extrato e, também, um estudo de permeção dos compostos fenólicos do extrato e uma melhor adequação da formulação tópica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultravioleta B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 571, n. 1-2, p. 153-173, 2005.
- AGARWAL, R. et al. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochemistry and Photobiology,** v. 58, n. 5, p. 695-700, 1993.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 167-176, 1999.
- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *llex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 20, n. 2, p. 121-144, 1987.
- ALMEIDA, R. L. et al. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteinases 2 e 9 na pele. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 43-50, 2008.
- ALVES, C. Q. **Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de Cenostigma gardnerianum Tul. (Leguminosae).** 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
- AMBE, A. S. A. et al. *In vitro* cytotoxicity activity of Mallotus oppositifolius and Enantia polycarpa extracts against human foreskin fibroblast (HFF) cell line. **European Scientific Journal**, v. 12, n. 6, p. 29-36, 2016.
- ANDRADE, C. A. D. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don., Leguminosae Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 231-235, 2007.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*llex paraguariensis*). **LWT Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- ARAÚJO, L. M. Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos. 2015. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- ASOLINI, F. C. et al. Atividade antioxidante e bacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 209-215, 2006.
- ASSEFA, Z. et al. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 108, p. 886-891, 1997.

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry,** v. 99, p. 191-203, 2006.
- BALUPILLAI, A. et al. Caffeic acid inhibits UVB-induced inflammation and photocarcinogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in mouse skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 91, n. 6, p. 1458-1468, 2015.
- BARG, M. Avaliação do efeito protetor do extrato de *llex paraguariensis*. Sobre a prevenção do dano oxidativo causado por radiação ultravioleta. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.
- BARG, M. et al. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extract son the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdan, v. 37, n. 1, p. 195-201, 2014.
- BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: AULTON, M. E. **Pharmaceutics the science of dosage form design.** London: Churchil Livingstone, 2002. p. 499-533.
- BASHIR, M. M.; SHARMA, M. R.; WERTH, V. P. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate tnf-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. **The Journal of Investigative Dermatology,** v. 129, n. 4, p. 994-1001, 2009.
- BASTOS, D. H. M. et al. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 399-404, 2006.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRAGAGNOLO, N; PAN, W; FILHO, L. K. **Manual técnico da erva-mate**, Curitiba: EMATER-Paraná, 1980. 40 p.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.
- BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology,** London, v. 3, n. 3, p. 207-214, 2002.

- BUCKMAN, S. et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 723-729, 1998.
- CANTO, G. S. Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno. 2007. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 84, n. 1, p. 21-27, 2006.
- CERVANTES-LAUREAN, D. et al. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 8, p. 531-540, 2006.
- CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of Ardisia compressa in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (Camellia sinensis) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.
- CHEN, B. et al. Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor-β/Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1. **Molecular Medicine Reports,** v. 11, n. 5, p. 3344-3348, 2015.
- CHEN, T.; HOU, H. Protective effect of gelatin polypeptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) against UV irradiation-induced damages by inhibiting inflammation and improving transforming growth factor-β/Smad signaling pathway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v. 162, p. 633-640, 2016.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**, Limerick, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.
- CHOI, H. S. et al. Topical application of spent coffee ground extracts protects skin from ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 6, p. 779-790, 2016.
- CHUNG, T. W. et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004.
- COLPO, A. C. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: how successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185-195, 2016.
- DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453-1461, 2011.

DEGROOT, J. et al. Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes. **Experimental Cell Research**, v. 266, n. 2, p. 303-310, 2001.

DELADINO, L. et al. Major phenolics in yerba mate extracts (*Ilex paraguariensis*) and their contribution to the total antioxidant capacity. **Food and Nutrition**, v. 4, p. 154-162, 2013.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (aau) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DINDA, M. et al. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates *in vitro* and *in vivo* proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 10, 2016.

DORMÁN, G. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. **Drugs**, v. 70, n. 8, p. 949-964, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. Beyond UV radiation: a skin under challenge. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 35, n. 3, p. 224-232, 2013.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas de processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

FAION, A. M. et al. Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of prato cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1516-1524, 2015.

FAN, J.; ZHUANG, Y.; LI, B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. **Nutrients,** v. 5, n. 1, p. 223-233, 2013.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine,** Malden, v. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FISHER, G. J. et al. C-jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 5, p. 663-670, 2000.

- FISHER, G. J. et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 101-114, 2009.
- FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology,** v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.
- FISHER, G. J. et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. **Nature**, v. 379, n. 6563, p. 335-339, 1996.
- FISHER, G. J. et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 20, p. 1419-1428, 1997.
- FONSECA, Y. M. et al. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 127, n. 3, p. 596-601, 2010.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 4195-4200, 2010.
- FUCHS, J. et al. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 4, p. 337-353, 2001.
- FUKUI, M.; CHOI, H. J.; ZHU, B. T. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 5, p. 800–13, 2010.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.
- GERHARDT, M. História ambiental da erva-mate. 2013. 290 f. Tese (Doutorado em História Cultural)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- GIADA, M. L. R. Antioxidant capacity of the striped sunflower seed (*Helianthus annuus* I.) aqueous extract. **European Journal of Lipid Science and Technology,** v. 110, n. 3, p. 284-290, 2008.
- GIULIAN, R. et al. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 74-80, 2009.
- GNOATTO, S. C. B. et al. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry,** Paris, v. 43, n. 9, p. 1865-1877, 2008.
- GORZALCZANY, S. et al. Choleretic effect and intestinal propulsion of mate (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 75, n. 2-3, p. 291-294, 2001.

- GOSMANN, G. et al. Phenolic compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 156-161, 2012.
- GOSMANN, G. et al. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.
- GRUJIC, N. et al. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2518-2528, 2012.
- GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decrease oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996.
- GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009.
- GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 279-292, 2002.
- HAN, Y. P. et al. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)b mediated induction of MT1-MMP. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 1, p. 131-139, 2001b.
- HAN, Y. P. et al. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha mediated induction and proteolytic activation of mmp-9 in human skin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22341-22350, 2001a.
- HAN, Y. P.; NIEN, Y. D.; GARNER, W. L. Tumor necrosis factor-alpha-induced proteolytic activation of pro-matrix metalloproteinase-9 by human skin is controlled by down-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and mediated by tissue-associated chymotrypsin-like proteinase. **Journal of Biological Chemistry,** v. 277, n. 30, p. 27319-27327, 2002.
- HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, 138-151, 2007.
- HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. de; Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** v. 56, p. 8394-8403, 2008.
- HONKAVUORI-TOIVOLA, M. **The prognostic role of matrix metalloproteinase-2** and-9 and their tissue inhibitor-1 and-2 in endometrial carcinoma. 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Saúde e Biociências)-University of Oulu, Oulu, 2014.

- HSIEH, H.-Y. et al. Discovery, synthetic methodology, and biological evaluation for antiphotoaging activity of bicyclic [1, 2, 3] triazoles: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 56, n. 13, p. 5422-5435, 2013.
- IORDANOV, M. S. et al. Ultraviolet radiation triggers the ribotoxic stress response in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15794-15803, 1998.
- JACOBSEN, J. A. et al. To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1803, n. 1, p. 72-94, 2010.
- JACQUES, R. A. et al. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): a study of extraction methods. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 18, p. 2780-2784, 2006.
- JACQUES, R. A. et al. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 354-359, 2007.
- JAISWAL, R. et al. Profiling and characterization by LC-MS of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471-5484, 2010.
- JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, I.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.
- JUNG, H. Y. et al. *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against uvb-induced photoaging by inhibiting the expression of mmps and increasing type I procollagen expression. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 658-666, 2014.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, London, v. 11, n. 4, p. 447-455, July 1979.
- KARAS, A. C. Auto ecologia da erva-mate. Curitiba: UFPR, 1982, 83 p.
- KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 29, p. 811-816, 1997.
- KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oilbased systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 48, n. 1, p. 78-93, 2008.
- KRAEMER, K. H. *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em cultura de células em suspensão. 1997. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

- KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.
- KUPAI, K. **Zymography.** Disponível em: <a href="http://www3.szote.u-szeged.hu/hurodocs/downloads/biochemistry/lectures/zymography\_HuRo\_Kupai\_fin\_al\_small.pdf">http://www3.szote.u-szeged.hu/hurodocs/downloads/biochemistry/lectures/zymography\_HuRo\_Kupai\_fin\_al\_small.pdf</a>. Acesso em: 4 jul. 2016.
- LEE, B. C. et al. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. **Archives of Pharmacal Research,** v. 30, p. 1293-12301, 2007.
- LEE, P. L.; WEELDEN, H. VAN; BRUIJNZEEL, P. L. B. Neutrophil infiltration in normal human skin after exposure to different ultraviolet radiation sources. **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, n. 6, p. 1528-1534, 2008.
- LEE, T.-H. et al. Anti-MMP-2 activity and skin-penetrating capability of the chemical constituents from *Rhodiola rosea*. **Planta Medica**, v. 82, n. 8, p. 698-704, 2016.
- LEY, R. D.; FOURTANIER, A. UVA-induced edema and pyrimidine dimers in murine skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 4, p. 485-487, 2000.
- LI, Y. et al. Age-associated increase in skin fibroblast-derived prostaglandin E2 contributes to reduced collagen levels in elderly human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 9, p. 2181-2188, 2015.
- LIN, Y. et al. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 44, p. 1387-1394, 1996.
- LIN, Y. et al. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, p. 1864-1873, 2003.
- LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C.-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **The European Respiratory Journal,** v. 38, n. 1, p. 191-208, 2011.
- LOPES, V. R. et al. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex vírus type 1 Kupka by *Estuarine cyanobacteria* extracts. **Toxicology** *in vitro*, v. 25, n. 4, p. 944-950, 2011.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LU, Z. et al. Structure—activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 4, p. 263-274, 2006.
- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

MACHADO, A. K. et al. Guaraná (Paullinia cupana) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426-433, 2015.

MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 27-58, 2012.

MANOSROI, A. et al. Nanoscale gelatinase A (MMP-2) inhibition on human skin fibroblasts of longkong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 12, n. 9, p. 7187-7197, 2012.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce,** v. 46, p. 3-8, 1998.

MARINO, S. et al. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium*. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 21-28, 2012.

MARQUES, V.; FARAH, A.; Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MARTI-MESTRES, G. et al. The "*in vitro*" percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 139-144, 2007.

MASAKI, H.; OKANO, Y.; SAKURAI, H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. **Biochimica et Biophysica Acta** (BBA) - General Subjects, v. 1428, n. 1, p. 45-56, 1999.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Short-term and long- term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine,** Cambridge, v. 4, n. 26, p. 1-22, 2002.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate** (*Ilex paraguariensis* **St. Hill).** 2. ed. Curitiba: EMATER–Paraná, 1991. 104 p.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophyline distribution in *Ilex* paraguariensis. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, p. 149-151, 1994.

MAZZAFERA, P. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, p. 67-71, 1997.

MEJIA, E. G et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MELO, F. A. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

- MENDES, R. F.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493-500, 2007.
- MÉPLAN, C.; RICHARD, M. J.; HAINAUT, P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. **Biochemical Pharmacology,** v. 59, n. 1, p. 25-33, 2000.
- MILAN, A. L. K. et al. Estudo da Hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, out./dez. 2007.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.
- MITTELBRONN, M. A. et al. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, n. 9, p. 677-681, 1998.
- MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.
- MOLINA, J. E.; MOLINA, J. E. **El mate arte y tradición.** Buenos Aires: Eguiguren & Veja, 2004, 72 p.
- MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International,** London, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.
- MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil.** 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2007.
- MORIDANI, M. Y. et al. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 11, p. 1432-1439, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry,** v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Natural Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Leads from Herbal Resources. **Studies in Natural Products Chemistry,** v. 39, p. 91, 2013.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290-308, 2008.

NACZK, M.; SHAIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extracion and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix matalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research,** v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Skin.** Bethesda, 2016. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022679/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022679/</a>. Acesso em: 2 ago. 2016.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier-insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 65, n. 2, p. 237-250, 2013.

OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 403-409, 2013.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de ervamate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais. **Silvicultura da erva mate** (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1985. p. 17-36.

ONOUE, S. et al. Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n. 2, p. 105-111, 2003.

OPDENAKKER, G. et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 6, p. 851-859, 2001.

OTTONELLO, L. et al. Nimesulide as a downregulator of the activity of the neutrophil myeloperoxidase pathway. **Drugs**, v. 46, n. 1, p. 29-33, 1993.

PAGLIOSA, C. M. et al. Bitterness in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 415-426, 2009.

PANDEL, R. et al. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **ISRN Dermatology,** v. 2013, p. 1-11, 2013.

PARK, J. E. et al. The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. **Photodermatology photoimmunology and photomedicine**, v. 30, n. 5, p. 237-245, 2014.

- PORT'S, P. S. Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, n. 1, p. 20-24, 2009.
- QUAN, T. et al. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. **Journal of Biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8079-8085, 2005.
- QUAN, T. **Molecular mechanisms of skin aging and age-related diseases.** Boca Raton: CRC Press, 2016. 263 p.
- QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. **Gerontology,** v. 61, n. 5, p. 427-434, 2015.
- RA, H.-J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology,** v. 26, n. 8, p. 587-596, 2007.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: SUDESUL, 1988. p. 284-292.
- RESENDE, M. D. V. et al. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA resultados da avaliação genética de populações, progênies, 56 indivíduos e clones.** Colombo: Radial Embrapa florestas, circular técnica 43, 2000. 67 p.
- RIBEIRO, B. D. Estratégias de processamento verde de saponinas da biodiversidade brasileira. 2012. 187 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- RIBEIRO, M. M. Influência da adubação nitrogenada na incidência de *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) praga da erva-mate cultivada. 2005, 151 f. Tese (Doutorado Engenharia Florestal)—Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- RICCI, S. et al. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,** v. 54, n. 8, p. 1281-1290, 2015.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.
- RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Sciences,** v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.
- RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.

- RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v.1, n. 4, p. 705-720, 2002.
- ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- ROPKE, C. D. et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Photomorphe umbellata* root extract. **Photochemistry and Photobiology,** Oxford, v. 82, n. 2, p. 439-442, mar./apr. 2006.
- SAITO, M. et al. Oral administration of *Aloe vera* gel powder prevents UVB-induced decrease in skin elasticity via suppression of overexpression of MMPs in hairless mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,** v. 80, n. 7, p. 1-9, 2016.
- SANDER, C. S. et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 118, p. 618-625, 2002.
- SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 378, n. 11, p. 1247-1257, 1997.
- SCHINELLA, G. et al. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta medica**, v. 80, n. 12, p. 961-968, 2014.
- SELA-PASSWELL, N. et al. Structural and functional bases for allosteric control of mmp activities: can it pave the path for selective inhibition? **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research,** v. 1803, n. 1, p. 29-38, 2010.
- SHI, Z. et al. Design, synthesis, and preliminary evaluation of substituted cinnamic acid esters as selective matrix metalloproteinase inhibitors. **Drug Development Research**, v. 73, n. 6, p. 317-324, 2012.
- SHINDO, Y. et al. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **Journal of Investigative Dermatology,** Baltimore, v. 102, n. 4, p. 470-475, 1994.
- SILVA, A. R. et al. Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. **International Journal of Cosmetic Science,** Oxford, v. 32, n. 1, p. 73-80, 2010.
- SILVA, F. A. Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate). 2007. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007a.
- SILVA, F. A. et al. Validation of a LC method for polyphenol assay in extractive solution from *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** v. 30, n. 20, p. 3119-3131, 2007b.

- SILVA, R. A. et al. Evaluation of antioxidant and mutagenic activities of honeysweetened cashew apple nectar. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 61-67, 2013.
- SILVEIRA, J. E. P.; PEDROSO, D. M. UV light and skin aging. **Reviews on Environmental Health,** v. 29, n. 3, p. 243-254, 2014.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
- SIQUEIRA, S. Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em modelos de pele *in vitro* e *in vivo*. 2014. 61 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex* paraguariensis: an in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286-294, 2015.
- STEENPORT, M. et al. Matrix metalloproteinase MMP-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-α and cyclooxygenase-2. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8119-8127, 2009.
- STREIT, N. M. et al. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560-564, 2007.
- SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345-352, 1983.
- TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoids and triterpenoidal glycosides from the fruits of the *llex paraguariensis* (Maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 15, p. 205-211, 2004.
- TRIPP, C. S. et al. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 4, p. 853-861, 2003.
- TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 493-501, 1995.
- TSURUYA, M. et al. Acceleration of proliferative response of mouse fibroblasts by short-time pretreatment with polyphenols. **Applied biochemistry and biotechnology,** v. 174, n. 6, p. 2223-2235, 2014.
- VALDUGA, A. T. **Uso sustentado e processamento de** *Ilex paraguariensis* **St. Hil. (Erva-mate).** 2002, 216 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2002.
- VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nature Methods**, v. 10, n. 3, p. 211-220, 2013.

- VARANI, J. et al. Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen in synthesis in photodamaged skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 6, p. 1471-1479, 2004.
- VAYALIL, P. K. et al. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 122, n. 6, p. 1480-1487, 2004.
- VICENTINI, F. T. M. C. et al. Quercetin in w/o microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 69, n. 3, p. 948-957, 2008.
- VIDOR, M. A. et al. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de ervamate (*Ilex paraguariensis* St. Hil): o sabor. **Ciência Rural,** v. 32, n. 3, p. 415-420, 2002.
- VIOUX-CHAGNOLEAU, C. et al. Reconstructed human skin: from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement,** Tokyo, v. 2, n. 1, p. S1-S12, 2006.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.
- WANG, Y. et al. A non-steroidal anti-inflammatory agent provides significant protection during focal ischemic stroke with decreased expression of matrix metalloproteinases. **Current Neurovascular Research**, v. 4, n. 3, p. 176-183, 2007.
- WARNER, R. L. et al. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators *in vitro*. **Experimental and molecular pathology,** v. 76, n. 3, p. 189-195, 2004.
- WOESSNER Jr., J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.
- WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous uva-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 5, p. 215-237, 2006.
- XU, G. H. et al. Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 32, n. 9, p. 1215-1220, 2009.
- YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology,** v. 157, n. 5, p. 874-887, 2007.
- YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 377-382, 1995.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs) from marine natural products: the current situation and future prospects. **Marine Drugs,** v. 7, n. 2, p. 71-84, 2009.

ZHANG, M. et al. Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-1 $\beta$  levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** v. 37, n. 3, p. 347-354, 2014.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry,** v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHOU, L. et al. Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. **BMC Immunology,** v. 10, p. 15, 2009.

#### **ANEXO**

#### ANEXO A - ARTIGO

# Protective Effect of *Ilex paraguariensis* Extract on UVB- Induced Matrix-Metalloproteinase Expression *in vivo* and *in vitro* Fibroblast Cell Proliferation

Camila H. F. Cuelho<sup>†</sup>, Iuri F. Bonilha<sup>†</sup>, Marina O. Lovatto<sup>†</sup>, Alcindo Busanello<sup>‡</sup>, Fernanda Barbisan<sup>§</sup>, Veronica F. Azzolin<sup>§</sup>, Indiara Brusco<sup>□</sup>, Eduarda S. Rocha<sup>I</sup>, Bruno L. Hennemann<sup>▽</sup>, Gizele S. do Canto<sup>O</sup>, Ivana B. M. da Cruz<sup>§</sup>, Maria Izabel U. M. da Rocha<sup>I</sup>, Marcelo L. da Veiga<sup>I</sup>, Sara M. Oliveira<sup>□</sup>, Roselei Fachinetto<sup>‡</sup>, Melânia P. Manfron<sup>†</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup>Phytochemical Research Laboratory, Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>&</sup>lt;sup>‡</sup>Physiology and Pharmacology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>&</sup>lt;sup>§</sup>Biogenomic Laboratory, Morphology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

Neurotoxicity and Neuropsicofarmacology Laboratory, Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

Experimental and Comparative Morphology Laboratory, Morphology Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>&</sup>lt;sup>∇</sup>Chemical Heterocycles Laboratory, Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>&</sup>lt;sup>O</sup>Pharmacotechnique Laboratory, Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil.

ABSTRACT: Ultraviolet B (UVB) radiation represents 10% of the total UV radiation can reach the Earth's surface, being most responsible for the biological effects related to skin cancer and photoaging. *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., known as yerba mate (YM), is a native tree to South America. The polyphenols present in the leaves have chemopreventive characteristics and therapeutic activity in the treatment of cancer; prevention of lipid peroxidation in mammals; prevention of adverse effects of UV radiation, reducing the oxidative damage. Thus, the present study aimed to evaluate the potential of YM to prevent skin damages promote by acute exposure to UVB and the cytotoxicity in fibroblasts. The YM extract showed high levels of polyphenols, flavonoids, tannins and excellent antioxidant activity. In addition, no presented cytotoxicity in fibroblasts, showed an inhibitory effect on myeloperoxidase (MPO) and metalloproteinases (MMPs), preserving collagen after acute UVB exposure. Thus, the formulation containing the YM extract was shown to have a potential photoprotective and anti-aging effect.

### **INTRODUCTION**

The skin is exposed to a high oxidative stress in that few tissues are subject throughout their lives. There are different exogenous sources of stress that act with harmful effects on the cells; among them are the ultraviolet (UV) radiation. Acute exposure of human skin to UV radiation cause several disease-related changes in the skin. These changes can be observed on the skin include inflammation, erythema, edema, hyperplasia and sunburn cell formation. In addition, chronic exposure to UV radiation leads to sped up skin aging, resulting from damage to the connective tissue and destroying of native collagen. This also is caused by a deficiency in synthesizing and restore the content of this tissue with new collagen.

The most abundant protein in skin connective tissue is type I collagen, secreted by dermal fibroblasts as type I procollagen. However, the tissue also contains other types of collagen (III, V, VII), elastin, proteoglycans, fibronectin, and other proteins.<sup>3</sup> The UV radiation decreases type I collagen production through two pathways: stimulation of collagen degradation and inhibition of type I procollagen production. Thus, UV-induced control of type I collagen is one of the main causative factors of photoaging.<sup>4</sup> Ultraviolet B radiation (UVB) leads to DNA damage andform the reactive oxygen species (ROS), whichactivate complex signaling pathways. UVB irradiation to the skin also inducesproinflammatory factors from epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts,promoting matrix metalloproteinases (MMPs) expression.<sup>4,5</sup> Neutrophils are also activated, stimulating the activity of myeloperoxidase (MPO), na ROS-generator enzyme.<sup>6</sup>

The MMPs comprise a family of zinc-dependent endopeptidases ableto degrade extracellular matrix (ECM) proteins and play important parts in morphogenesis, angiogenesis, arthritis, skin ulcer, tumor invasion, and metastasis. The MMPs can be divided into five families: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, and membrane-type MMP. Among the gelatinases, MMP-2 or 72 kDa type IVcollagenase (gelatinase A) and MMP-9 or 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B) digest elastin, fibronectin, types IV, V, VII, and X collagens and gelatin (denatured type I collagen). MMPs are secreted as inactive zymogens (proMMPs) and are activated by serine proteases (plasminogen activator andkallikreins), mast cell proteases, plasma membrane MMPs, etc. MMPs activities are modulated on severallevels including transcription, pro-enzyme activation or byinhibitors, endogenous (tissue inhibitors of metalloproteinases -TIMPs) or exogenous (doxycycline). Research shows that single UVB exposurecan increase significantly the secretion of MMP-2 and MMP-9 in skincells. The discovery and development of products that show, either through direct and/or indirect mechanisms, the inhibitory activity of MMPs becomes an effective alternative in the delay of skin aging and/or treatment of cancer.

In addition, biodiversity and sustainability contribute to the use of plant extracts or their chemical constituents for therapeutic purposes. However, innovative research is using plant extracts with known antioxidant properties, to assess the possible effects and mechanisms involved in the MMPs and prevention of damage caused by exposure to UV radiation.

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate, YM) is a native shrub to South America, that grown in Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay. Through their leaves is prepared the traditional tea, consumed as tonic, stimulant and for its medicinal properties. The beverage is known as maté, té del Paraguay, chimarrão, and tereré. <sup>11</sup> Previous investigations of this plant showed many bioactive compounds like xanthines, phenolics acids (chlorogenic and caffeic acid), flavonoids and triterpenoid saponins. <sup>12,13</sup>

The polyphenols present in the leaves of *I. paraguariensis* has many biological activities such as chemoprevention and therapeutic activity in the cancer treatment; prevention

of lipid peroxidation in mammals and prevention of adverse effects of UV radiation, reducing the oxidative damage. In the class of saponins, the aglycone, ursolic and oleanolic acid, are responsible for the bitter taste and the anti-inflammatory and astringent activity of *I. paraguariensis*.<sup>14</sup>

There are reports that *I. paraguariensis* prevent oxidative damage in rats subjected to UVA and UVB radiation. The topical and oral treatment with *I. paraguariensis* prevent the DNA damage and lipid peroxidation. However, only the topical treatment containing *I. paraguariensis* extract prevented the increase in protein carbonylation caused by UV radiation. In paraguariensis also attenuates the lung inflammatory response induced by cigarette smoke in mice. Mate tea reduce oxidative stress, inflammatory cell influx, cellular metabolic activity, and MMP-9 and TNF-a expression. Other research tested the effects of topical application of ferulic acid (FA), a phenolic compound present in various medicinal plants and similar compound to caffeic acid (present in *I. paraguariensis*), on UVB radiation-induced MMP-2 and -9 activities in mouse skin. The skin treated with FA showed a significant reduction in chronic UVB radiation-induced levels of MMP-2 and -9, showing its possible long-term beneficial effects against the deleterious effects of UVB radiation.

Thus, the present study aimed to test *in vitro* and *in vivo* effect of the *I. paraguariensis* leaves extract on the MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity and *in vivo* study in mice of a topical formulation containing the *I. paraguariensis* extract (YME) in to prevent skin damages promoted by acute exposure to UVB radiation. Also, was evaluated *in vitro* YME cytotoxicity in human fibroblasts.

#### **EXPERIMENTAL SECTION**

General Experimental Procedures. Standard compounds used in analyses by HPLC and spectrophotometric assays were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solvents used were HPLC grade, and water was purified by deionization in 0.22 µm membrane filtration (Millipore, Billerica, MA, USA). The reagents and equipment used for SDS-PAGE purchased from Bio-Rad Co. Ltd. (Hercules, CA, USA). were by Shimadzu Spectrophotometric analyses were performed 1201 **UV-Vis-NIR** Spectrophotometer.

**Plant Material and Extraction Procedure.** Leaves of *I. paraguariensis* were collected in Santa Maria, RS, Brazil (29°43'05.3"S 53°43'46.2"W) in September 2014. The plant identification was performed by Prof. Dr. Renato Zachia and voucher specimen (SMDB 15.449) was deposited in the Botany Department Herbarium of Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. The dried leaves of *I. paraguariensis* was extracted by maceration with EtOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v) at room temperature. After filtration, the extract was concentrated under reduced pressure by rotary evaporation (~45°C). The EtOH extract was lyophilized, getting the yerba mate extract (YME), and used in the analysis.

**Total Phenolic Content.** The determination of total phenolic content (TPC) was according to the method of Chandra and Mejia<sup>18</sup>, using the FolinCiocalteau reagent. Absorbance was measured at 730 nm, in triplicate. The results were expressed as gallic acid equivalents (mg) per 100 g of dry weight extract (GAE mg/100 g DW).

**Total Flavonoid Content.** The total flavonoid content (TFC) was performed according to Zhishen et al.<sup>19</sup> The extract was diluted in methanol and as standard was used catechin. Absorbance was measured at 510 nm, in triplicate. The results were expressed as catechin equivalents (mg) per 100 g of dry weight extract (CE mg/100 g DW).

**Total Tannins Content.** Total tannins content (TTC) was evaluated according to Vanillin assay<sup>20</sup> with modifications. Standard used was catechin and absorbance was

measured at 490 nm. Results were expressed as catechin equivalents (mg) per 100 g of dry weight extract (CE mg/100 g DW).

**DPPH Assays.** The antioxidant activity of YME was evaluated by monitoring their ability to quench the stable free radical DPPH. The first assay was performed by the method described by Choi et al.<sup>21</sup> with brief modifications. YME and the ascorbic acid standard solutions were prepared at concentrations of 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 1.5625 and 3.125 mg / mL in ethanol. In test tubes were added 2.5 ml of each solution with 1 ml of 0.3 mM DPPH solution in ethanol, leaving to react at room temperature in the dark. After 30 minutes the reading was taken at 518 nm. The control (blank) was used EXB without adding the DPPH. As negative control was used 1 ml of DPPH 2.5 ml of ethanol in a test tube. The test will be performed in triplicate and calculated the antioxidant activity (% inhibition of DPPH radical) as the following equation: % inhibition =  $100 - [(A_{sample} - A_{blank}) \times 100 / A_{negative control}]$ . The antioxidant concentration required to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (IC<sub>50</sub>) was used for comparison of YME and ascorbic acid antioxidant activity.

Other DPPH assay consisted in analysis by Thin Layer Chromatography (TLC) using Merck Kieselgel 60  $F_{254}$  plates (layer thickness, 0.25 mm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and the spots were visualized with a UV lamp (254 nm). Samples were prepared in 1% methanol and applied to aluminum plates with eluent system containing ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: distilled water (100 : 11: 11:. 27 v / v). Caffeic acid, quercetin, and rutin were used as standards. After elution and total evaporation of the eluent, the plate was misted with a solution of 0.004% DPPH diluted in methanol. The plate was exposed at room temperature for 30 min. When the reading has antioxidant activity, characterized by the formation of yellow spots comparable to those observed in the standard of the violet coloration characteristic of DPPH.  $^{21}$ 

B-Carotene Linoleate Assav. Antioxidant activity was measured using the methods of Mokbel and Hashinaga<sup>22</sup> with slight modification. A 3.34 mg β-carotene solution in chloroform (1 mL), 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween-20 were mixed well. Chloroform was removed at 40°C under vacuum using a rotary evaporator. The resulting mixture was at once diluted with 5-10 ml of triple distilled water and was mixed well. The emulsion was further made up to 100 ml with 0.01 M hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Aliquots (2 mL) of this emulsion were transferred into different test tubes containing 0.1 ml of test samples (50, 25 and 12.5 µg/mL) in methanol. In this experiment, BHT was used for comparative purposes, in the same concentrations. A control containing 0.2 mL of methanol and 4 ml of the above emulsion was prepared. The tubes were placed at 50°C in a water bath. Absorbances of all the samples at 470 nm were taken at zero time and every 15 min until 120 min, observing the color of β-carotene disappeared in the control reaction. A blank mixture was prepared as above, but without β-carotene. The results were expressed as % inhibition, according to the equation: % inhibition =  $[1 - (A_{S(0)} - A_{S(120)} / A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$ , where  $A_{S(0)}$  and  $A_{S(120)}$  are the absorbance values at 0 and 120 minutes of the incubation for sample.  $A_{C(0)}$  and  $A_{C(120)}$  are the absorbance measured in the control at 0 and 120 minutes of the incubation.

Quantification and Identification of Chlorogenic (CHL) and Caffeic Acid (CAF) in YME by Liquid Chromatography with UV and MS Detection. Analyses of plant extract were performed with two LC systems. The first, HPLC-UV-DAD, comprised a Shimadzu CBM-20A (Kyoto, Japan) system equipped with an LC-20AT pump, an SIL-20A automated sample injector, and an SPD-M20A photodiode array detector controlled by LC Solution software. The analytical column used was Shim-pack CLC-ODS (M), 5  $\mu$ m particle diameter, dimensions of 4.6 mm x 150 mm. Chromatographic runs on the HPLC system were performed at a 0.6 mL/min flow rate using mixtures of two solvents: A (98% H<sub>2</sub>O, 2% CH<sub>3</sub>COOH v/v) and B (50% MeOH, 50% H<sub>2</sub>O, v/v). The elution steps were: 0-10 min, 31%

B; 10-25 min, 31-56% B, 25-33 min, 56% B, 33-45 min, 56-77% B, 45-50min, 77-56% B and 50-55 min, 56-31% B. To quantify the ATL and CAF content in the YME, the calibration curves were carried out using standards concentrations of 30, 50, 100, 150, 200 and 250  $\mu$ g/mL.

The second analysis, by LC-MS/MS, were performed using an Agilent Technologies 1200 series High-Pressure Liquid Chromatograph interfaced with an Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS (San Jose, CA, USA), using negative ion electrospray ionization (ESI). Gas temperature was 300 ° C and the dry gas flow was 5 L/min. The nebulizer remained at 45 psi. The voltage of the capillary and shredder was 3500 and 3 eV, respectively. Flow rate of sample was 0.8 mL/min. Introduction of the sample was by direct insertion without a chromatographic column. Nebulizer and the collision gas utilized was nitrogen. The sample analysis was in negative SCAN mode. Analysis of fragments of selected precursor ions was in the production method, with a collision energy of 15 eV.

Cell Culture. Cells fibroblast HFF-1 line of newborn human foreskin (ATCC® SCRC-1041  $^{TM}$ ) were acquired in the Cells Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). These were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's culture medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (0.1 mg/mL) and amphotericin B (0.25  $\mu$ g/mL); and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured every 2-3 days using 0.9% saline solution to wash them, and 0.25% trypsin to disaggregate them bottle.

A mass referring to the 20  $\mu g$  of YME leaves exposed and non-exposed to UVB was added in 5 mL volumetric flask and completed with distilled water to give a concentration of 4  $\mu g/mL$ . Concentrations were prepared in 40  $\mu g/mL$ , 200  $\mu g/mL$  and 400  $\mu g/mL$  of the extract exposed and not exposed to UVB using distilled water as the solvent.

Cytotoxicity was assessed in fibroblasts HFF-1 lines by MTT assay.<sup>23</sup> HFF-1 lineage cells were seeded in DMEM in 96-well plates at a density of 2x10<sup>4</sup> cells/well and incubated in an oven at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours for adhesion. After, the medium was replaced with 50 μL of samples, previously prepared, and the cells were treated with the YME, irradiated (IR) and non-irradiated (NI) to UVB. Final concentrations were: control; 1 μg/mL IR; 1 μg/mL NI; 10 μg/mL of NI; 50 μg/mL of IR; 50 μg/mL of NI; 100 μg/mL of IR; 100 μg/mL of NI; The cells were again incubated for 24 and 72 hours in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. At the end of the incubation period, was added 10 μL of MTT reagent (10%) and 5 mg/mL of PBS, and incubated again for 4 hours at 37°C. Then 100 μL of DMSO were added per well to solubilize the formazan crystals. The absorbance of each well was measured at 570 nm using Benchmark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell viability was expressed as a percentage of viable cells compared to the untreated control group.

**Topic Formulation.** A concentrated base cream was prepared, whose composition is shown in Table 1. After it was added the YME to the base cream in enough quantity for final concentration of 5%. The emulsions containing non-ionic emulsifier are widely used in cosmetic formulations due to their characteristics and properties, as, for example, compatibility with the skin pH stability compared at different pH values and the possibility of incorporation of different active substances such as acids in general and plant extracts (MILAN et. al., 2007). The concentration (5%) was used in the study based on the results found by Barg et al.<sup>15</sup>

Table 1. Base cream composition.

Components	% (w/w)
Polawax	17,2
Cetiol 868	7,143
Cetostearyl alcohol	3,6
ВНТ	0,0715
Propylene glycol	1
Cosmoguard	0,4
Silicon	2,85
Distillated water qsp	100

Animals. Animal experiments were performed in female Swiss albino mice, weighing 20-30 g. Mice were housed in a temperature-controlled room, with 12 h light and 12 h dark cycles and access to water and food ad libitum. All experiments were conducted following National Institutes of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (registered under the number CEUA 9844100315). The dorsal hair of mice were shaved and randomly designated to different groups with 5 mice each: non-irradiated and untreated (Control group), irradiated and untreated (Exposed group), irradiated and treated with cream without YME – base cream (Base group), irradiated and treated with YME cream (YME group) and irradiated and treated with nimesulide gel (NIM group). The animals were acclimated for at least 1 hour before exposure. It was applied to the dorsal area of 1.77 cm<sup>2</sup> in an amount of 0.3 g of the formulations in the dorsal shaved skin 1 hour before exposure to UVB radiation.

**Irradiation.** The animals were first anesthetized (100 mg/kg ketamine and 10 mg / kg of xylazine hydrochloride, intraperitoneal), and then exposed to UVB radiation (290-320 nm), equivalent to 2 MED (minimal erythema dose) for 6 minutes, which corresponds to the dose of 0.23 J / cm². As a source of light with UVB radiation was used a Philips TL40W/12RS lamp (Medical-Eindhoven, Holland). The output of UVB radiation was measured by an IL-1700 model radiometer (International Light, USA). The lamp was positioned 12 cm from the Animals (irradiance of approximately 0.61 mW/cm²). The animals were sacrificed by administration of anesthetic thiopental (150 mg / kg) and lidocaine (100 mg / kg) two hours after the last exposure to avoid the increase of MMPs caused by the inflammatory response erythema.<sup>24</sup> After euthanasia, the skin of the back were immediately removed and sectioned for further analysis.

Measure of Myeloperoxidase (MPO) Activity. The neutrophil infiltration in the inflammatory response caused by UVB radiation was measured using the MPO colorimetric assay. Skin samples were homogenized in acetate buffer (80 mM, pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and kept at 4°C. Immediately before the assay, the tissue homogenate was centrifuged at 11,000 ×g for 20 min and the supernatant was then collected for assay. To determine the MPO enzyme activity, 10  $\mu$ L of supernatant was incubated with 200  $\mu$ l of acetate buffer and 40  $\mu$ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (18.4 mM) for 3 min at 37 °C. The reaction was stopped on ice by addiction of 30  $\mu$ L acetic acid. The color formed was analyzed by a spectrophotometer at 630 nm.

**Gelatin Zymography.** This assay was performed in Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) to detect gelatinases (MMP-2 and -9) activities in skin samples. One day before the experiment, the skins were put into Eppendorf tubes and added to 700  $\mu$ L of lysis buffer, composed of 100 mM Tris-base pH 6.8 containing 100 mM NaCl, 0.1% SDS, 5 mM EDTA and 0.02% sodium azide (1: 4 tissue: buffer). The skins were homogenized in Ultra turrax at 20,000 rpm in an ice bath to avoid overheating

caused by rotation and possible degradation of MMPs.<sup>26</sup> The skin homogenate was centrifugated at 13000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant was used as the skin-extract solution employed as a sample. The Lowry method was used to measure protein concentration in skin homogenates.<sup>27</sup> Assay was performed according to protocol of Ropke with slight modifications.<sup>24</sup> The homogenate volume (equivalent to 10 µg of protein) of all animals groups were loaded onto 8% polyacrylamide gel containing 10% sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and copolymerized with 0.5% gelatin (substrate for MMP-2 and -9). In the skin homogenate was added the sample buffer, containing 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 with 10% SDS, 20% glycerol and 0.5% bromophenol blue and without reducing agent (β-mercaptoethanol), because this breaks the disulphide bonds and inhibit the MMPs refolding after electrophoresis. <sup>26</sup> After inoculating the samples on the gel, the electrophoretic run was started with 80 V, current 120 mA, and output of 120 W for about 4 hours. To remove SDS, the gels were washed with 2% Triton-X100 solution (renaturing buffer) for 30 min. Gels were washed with incubation buffer for 30 min (50 mM Tris-HCl pH 7.5 and 5 mM CaCl<sub>2</sub>) and incubated at 37°C for 18h. Gels were stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue solution in water containing 25% methanol and 10% acetic acid for 30 minutes at room temperature and destained with water containing 10% acetic acid and methanol. Each band of MMP was quantified by image analysis on the software.

In vitro Gelatin Zymography. Skin homogenate from IR group was subjected to SDS-PAGE with gelatin, washed in Triton-X100 and rinsed with incubation buffer as described before. Gels were incubated at  $37^{\circ}$ C overnight in separate recipients containing incubation buffer with YME (50 and 100  $\mu$ g/mL) and 400 mM EDTA (MMP inhibitor, positive control), and other gel was only incubated with incubation buffer (negative control).

Collagen Degradation. For the evaluation of collagen degradation was used the method Sirius Red staining.<sup>28</sup> The tissue fixed in neutral buffered formalin were processed and embedded in paraffin, and then sectioned to a thickness of 4 micrometers. After this treatment, sections were deparaffinized in xylene bath; then hydrated and stained with Sirius Red for 1 hour; rapidly washed and counterstained with hematoxylin for 3 minutes; then being dehydrated and mounted blades. After fabrication of the blades, four fields were captured in the polarized light microscope, at random from each plate. These sections were scanned with a digital camera attached to the microscope. Images were captured using standardized 20-fold increase objective, the greatest intensity of light and polarization microscope in the 90° plan.

**Statistical Analysis.** The bars in the figures show the mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 5 mice per group. For comparisons between groups on tests of enzymatic activity of MMPs was used two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test. In analyzing of the activities of MPO it was used one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. The results were analyzed using GraphPad Prism software v. 6.4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results were considered significantly different when p<0.05.

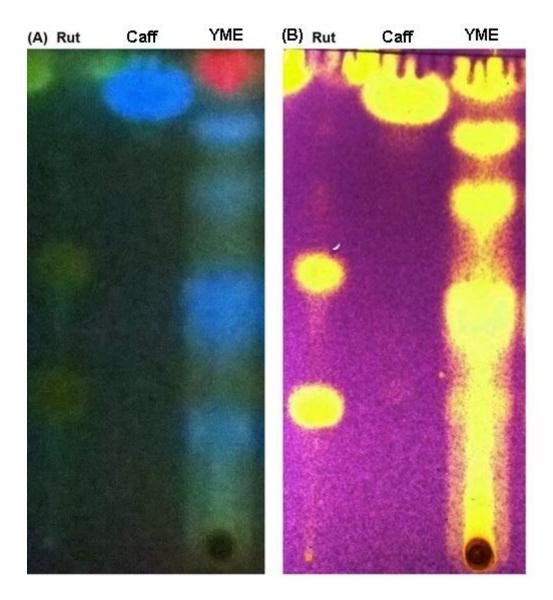
#### **RESULTS AND DISCUSSION**

**TPC, TFC and TTC.** The data showed a high content of polyphenols ( $26540 \pm 526.6$  mg GAE/100 g DW) in YME. This amount was higher than that found in other studies with YM extracts (11050 - 15500 mg GAE/100 g DW). <sup>29-31</sup> Also, was higher than found in green tea (*Camellia sinensis*) aqueous extract (14877 mg GAE/100 g DW), one of the plants with the highest levels of polyphenols . <sup>18</sup> TFC found in YME was 9718 mg CE/100 g DW, higher that found in YM leaves hydroethanolic extracts at 40% (4115 mg CE/100 g DW). <sup>32</sup> TTC found in YME was 15.87 g CE/100 g DW, higher that found in YM leaves methanolic extract

(1.15 mg CE/100 g DW).<sup>31</sup> Therefore, the high TPC, TFC and TTC indicated that YME is an excellent source of polyphenols. It is believed that the extraction method and the solvent used influences the high polyphenol content found in YME.

Antioxidant Activity. TLC analysis (Figure 1) suggests the presence of substances with antioxidant activity, characterized by yellowish spots resulting from the reduction of DPPH. In the DPPH assay, it can be seen that at a concentration of YME 100  $\mu$ g/mL inhibited 89.42% of DPPH radical, while ascorbic acid inhibited 96.93%. The YME had a good activity inhibition of DPPH radical compared to standard. At the concentration of 200  $\mu$ g/mL, the YME obtained near the inhibition of ascorbic acid, the respective values being 92.2% and 96.82%. However, the results have been statistically different. With respect to the IC<sub>50</sub>, there was a significant difference between the YME (39.73  $\mu$ g/mL) and ascorbic acid (5.79  $\mu$ g/mL). A study using an ethanol extract of YM showed an IC<sub>50</sub> of 112  $\mu$ g/mL, demonstrating that the solvent chosen for the extraction may influence the antioxidant capacity.

Antioxidant analysis by  $\beta$ -carotene linoleate assay showed the percentage of inhibition of linoleic acid peroxidation. The found values were 50.48±0.5% (YME) and 77.87±0.9% (BHT). The values showed significant difference, although the YME has shown good inhibition potential. Dartora et al. <sup>33</sup> found in YM mature and young leaves extract the inhibition of 48.37% for the mature leaves exposed in the sun, in the same concentration of this research (50  $\mu$ g/mL).



**Figure 1.** Antioxidant capacity of YME by TLC. (A): UV visualization; (B): DPPH revelation. Mobile phase: ethyl acetate: glacial acetic acid: water (100:11:11:27). Rut: Rutin; Caff: Caffeine.

Quantification and Identification of CHL and CAF by LC-MS and HPLC-UV-DAD. According to the HPLC-UV-DAD chromatogram obtained (Figure 2), was identified the CHL (3) and CAF (4) in YME, which was diluted in methanol: water (1: 1). From the chromatographic method used, it was observed that the retention time of CHL (1) and CAF (2) standards were, respectively, 29.61 and 32.53 min. The concentration of CHL found in YME was 19.26 mg/g extract (1.92%), while for CAF was 4.17 mg/g extract (0.41%). Another studies with YM related similar concentrations of CHL (10.4 – 18.4 mg/g extract), 30,34 but the CAF amount of this research was more higher (0.33 mg/g extract).

In order to confirm the presence of CAF and CHL in YME, was performed the analysis by LC/MS. Mass spectra of CAF and CHL standards (Figure 3A), and YME (Figure 3B) were obtained with their respective ion fragmentation patterns (Figure 4). All the m/z obtained were in negative mode. CHL and CAF were identified in YME, through of their characteristics fragment peaks (m/z 353.2 and 133.1, respectively). Other studies have reported the presence of the CHA, CAF and its derivatives. (Bravo 2007, Jaiswal 2010). 35,36

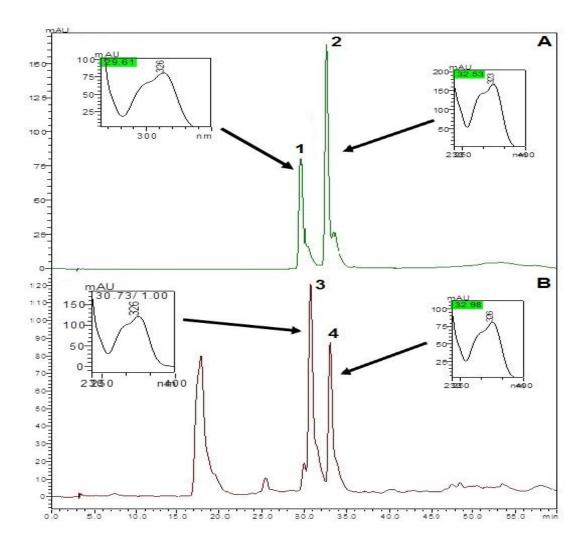


Figure 2. HPLC-UV-DAD chromatogram of YME (A) and standards (B).

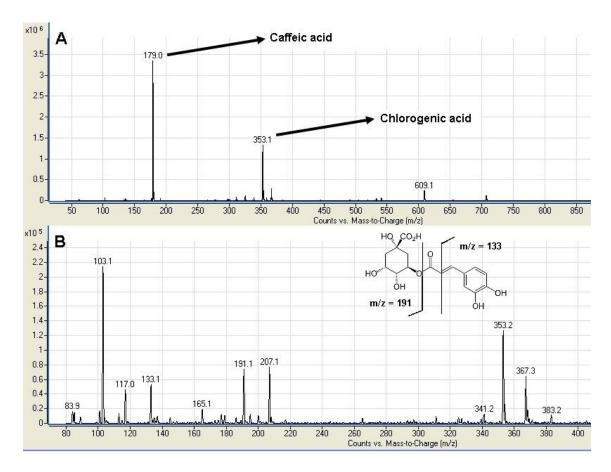


Figure 3. Mass spectra of CAF and CHL standards (A) and YME (B).

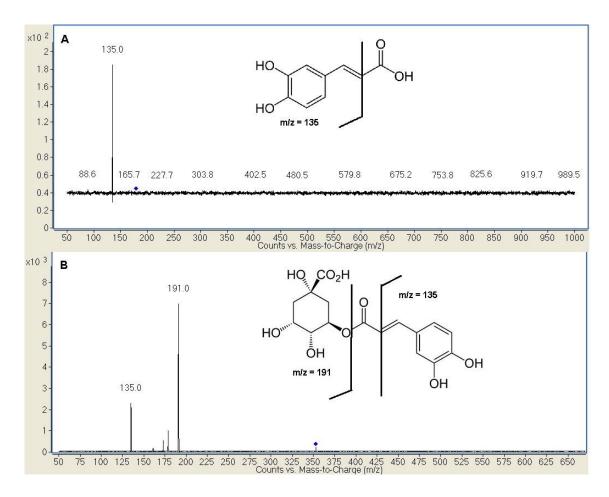
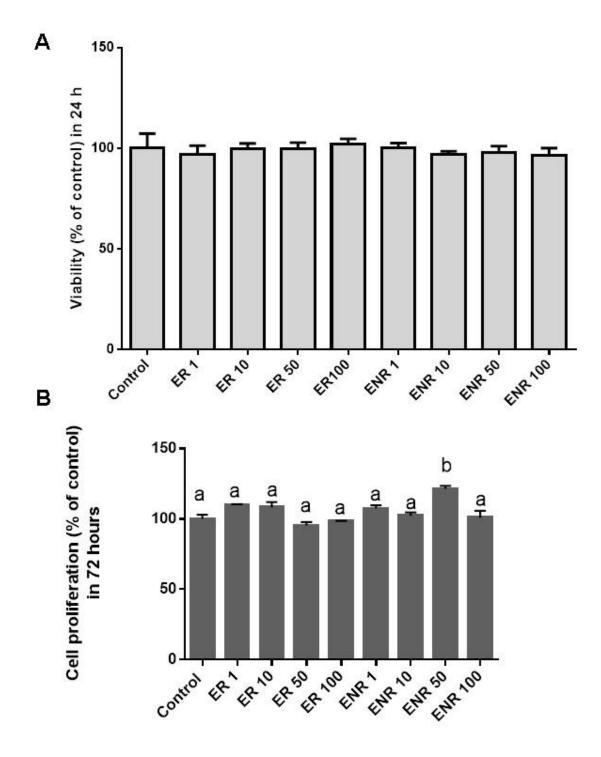


Figure 4. Ion fragmentation pattern of CAF (A) and CHL (B).

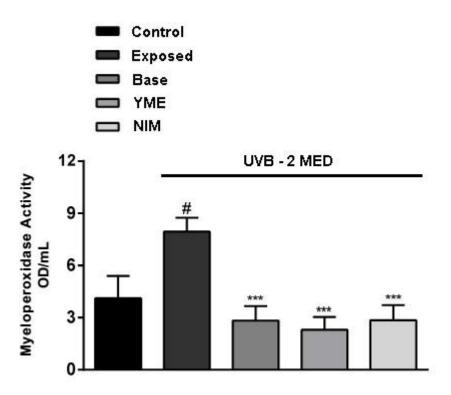
YME Protects and Induces Proliferation of Fibroblasts. The cytotoxicity observed in 24 hours on HFF-1 fibroblast cells treated with different concentrations (1, 10, 50 and 100  $\mu$ g/mL) of the irradiated and non-irradiated YME on UVB (0.23 J / cm2) was expressed as percentage of cell viability. The increase of YME concentration applied in the cells not caused cytotoxicity, remaining with high rates of viability, like the control used (Figure 5A). However, occurred a proliferation of HFF-1 cells (p <0.05) compared to controls using non-irradiated YME in 50  $\mu$ g/mL (ENR 50) at 72 hours (Figure 5B). Therefore, suggested that irradiated YME may have presented the photoinstability, because only the non-irradiated YME promoted fibroblast proliferation. It is likely that responsible constituents for the proliferation may have been degraded with UVB radiation. Another research observed that saponins of YM not presented cytotoxicity in CCD-33co normal colon fibroblasts.<sup>37</sup>



**Figure 5.** Percentage of fibroblasts viability in 24 hours (A) and proliferation in 72 hours (B) after treatment with radiated YME (ER) and non-irradiated YME (ENR) in concentration range 1 to 100  $\mu$ g/mL. Data were analyzed using One-way ANOVA with Dunnett's test (p <0.05). The results represent the average of five determinations  $\pm$  SD.

YME Reduces MPO Activity in Skin of Swiss Albino Mice. The exposure of the skin to UV induces an imbalance between ROS and endogenous antioxidant systems. Neutrophils are also activated, stimulating the activity of MPO, a ROS-generator enzyme. Topical administration of the formulation with YME and base formulation, after 24 hours, led to a decrease, respectively,  $71.1\pm4\%$  and  $64.4\pm5\%$  in MPO activity compared to irradiated

control (IR) (p <0.001) (Figure 6). It is suggested that the constituents of the formulation, e.g. BHT, an antioxidant, may block ROS generated by exposure and responsible for activation of the mediators of inflammation, such as neutrophil migration into the exposed area. However, there was no significant difference between the YME and base formulation, suggesting that the YME not modulates the anti-inflammatory effect. There was also a 64.1% reduction in MPO activity in the positive control (nimesulide). Nimesulide reduces the functions of MPO activity to exert an inhibitory effect directly on cells by regulating the superoxide anion and  $H_2O_2$ , thereby reducing their availability for converting the MPO, or by direct inactivation of the HOCl generated by MPO (Ottonelo 1993).<sup>39</sup> Thus, the present study showed that the YME formulation inhibited MPO activity, probably by the antioxidant activity of these phytochemical components, reducing the action of  $H_2O_2$ , substrate for MPO activity.



**Figure 6.** Myeloperoxidase activity. Bars represent mean + S.E.M. to 5 animals. \*\*p <0.001 when compared to control, \*\*\*p <0.001 compared to exposed animals. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

YME Inhibit MMP-2 and pro-MMP-2 and -9 Activities in Skin of Swiss Albino Mice. MMPs are produced by various cells and secreted as zymogens (inactive enzymes) or pro-metalloproteinases (pro-MMPs), which can be activated by proteolytic cleavage of the amino-terminal domain (pro-domain) or conformational change. Analyzing the results of the MMP-2 activities (Figure 7 and Table 2), observed that the NI (control) and IR (exposed) groups showed similar activities, which confirms that the MMP-2 is constitutively expressed in health tissues. Based on the results of the treated groups, the formulations showed inhibitory potential of MMPs. The base formulation inhibition may have occurred because this has BHT in its composition, an antioxidant used in cosmetic formulations. The nimesulide (NIM), a selective inhibitor of COX-2 is also known to inhibit MMPs, probably by the similar mechanism proposed by celecoxib.

According to Han et al., <sup>44</sup> TNF-α promotes the activation of pro-MMP-2 through NF-kB signaling pathway, which promotes transcription of MT1-MMP that activates pro-MMP-2

in MMP-2 active enzyme. Zhang et al. 45 showed that caffeic acid possesses anti-inflammatory activity and the ability to reduce levels of TNF- $\alpha$  production. Thus, we suggest that caffeic acid present in YME may have inhibited TNF- $\alpha$  expression, reducing the activation of MMP-2. The formulation containing nimesulide and cream base also promote the inhibitory activity of MMP-2.

In the pro-MMP-9 activity, the likely mechanism of inhibition may be due to inhibition of TNF- $\alpha$  by CAF present in the YME, as reported by Zhang et al.<sup>45</sup> Thus, the expression of TIMP-1 is increased by inhibiting the activity of pro-MMP-9, because TNF- $\alpha$  has the capacity to inhibit TIMP-1.<sup>46</sup> The inhibition of pro-MMP-9 expression may have occurred due to the anti-inflammatory mechanism of the YME constituents, mainly the phenolic acids (CAF and CHL) and its dicaffeoylquinic derivatives.

Supporting our results, Schinella et al $^{47}$  showed the anti-inflammatory effect of yerba mate aqueous extract topical application in animal model of inflammation demonstrating the inhibitory effect of COX-2 and prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>). Also showed a reduction in the TNF- $\alpha$  secretion and infiltration of neutrophils and macrophages. The authors used indomethacin as control, a non-selective COX inhibitor. Nimesulide, a selective inhibitor of COX-2, was used as a control in the present study, showing that the YME have a potential anti-inflammatory effect, possibly by COX-2 inhibition, which can so have decreased expression of pro-MMP 9, as before described.

Interestingly, MMP-9 was not expressed in any of the treated groups, including the IR group. Possibly it was caused by ROS, which can activate (via oxidation of the thiol group of the pro-domain followed by autolytic cleavage) and after inactivate MMPs (via modification of critical amino acids for the catalytic activity). Hypochlorous acid (HOCl) is a product of neutrophils MPO, which was highly expressed in the IR group. The hydroxyl radicals of HOCl can activate pro-MMP-9, because the thiol of cysteine pro-domain is the preferred target of HOCl and its oxygen leads to a rapid activation. Nevertheless, sustained production of HOCl modifies more sites of enzyme, causing to lose of catalytic activity. 48

Several studies have correlated the CAF with anti-inflammatory, antioxidant, photoprotective and skin protection properties.

Ballupilai et al.<sup>49</sup> evaluated the effect of CAF in UVB-induced inflammation in mice. Topical and intraperitoneal administration of CAF before exposure decreased inflammatory markers TGF-β, VEGF and iNOS in the skin, being also as a sunscreen. Other study investigated the CAF effects in the mice chronic skin inflammation and *in vitro* keratinocytes. The results show that topical treatment with CAF significantly reduced TNF-α production and activation of NF-κB induced by TNF-α in keratinocytes, also blocking the activity of MPO. The authors suggested that CAF might be a potential therapeutic agent against inflammatory skin diseases.<sup>45</sup>

Chung et al.<sup>50</sup> isolated CAF of stems extract of *Euonymus alatus*. The isolated CAF inhibited the activity of MMPs 2 and 9 but not the activities of MMPs 1, 3 and 7. The caffeic acid phenethyl ester (CAPE) showed a stronger inhibitory effect. The CAF and CAPE showed block NF-kB activation mediated by PMA, activator of NF-Kb, by blocking its nuclear translocation. This inhibitory activity can be explained by other study, where the authors showed that CAF and CAPE selectively inhibit MMP-2 and MMP-9 by binding of the largest ester groups of CAPE in the site S1 'of enzymes and oxygen carbonyl in the zinc of active site.<sup>51</sup>

Some studies also evaluated the potential of plant extracts front MMPs induced by UVB in skin tissues.

Oral administration of the ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduced the activity and expression of MMP-2 and MMP-9 in hairless mouse skin induced by UVB radiation, also to NF-kB inflammatory mediators that increase the production of MMPs.<sup>52</sup>

Jung et al.<sup>53</sup> analyzed the effect of *Pinus densiflora* extract in photoaging and investigated the mechanism of action in human fibroblasts after exposure to UVB. The authors showed that the extract inhibited the cytotoxicity induced by UVB, the expression of MMP-1, -3, and -9 in fibroblasts and decreased activity and expression of MMP-2, showing to be a potential anti-photoaging agent. Another study evaluated the *in vitro* and *in vivo* inhibition of MMPs in hairless mouse by *Pothomorphe umbellata* extract and its main active isolated 4-nerolidilcatechol (4-NC). Through zymography assay, authors concluded that the extract (100 µg/mL) had strongest inhibition that 4-NC, suggesting the presence of other compounds that may act synergistically enhancing the inhibitory effect. On the other hand, a significant inhibition of the MMP-9 in the group treated with the *P. umbellata* extract in comparison with other groups, suggest that the extract was able to inhibit the constitutive MMP-9.

It is also reported in the literature that CAF and CHL can permeate the skin layers. Marti-Mestres et al.<sup>54</sup> performed a study of comparative permeation between CAF and CHL on pig ear skin. The authors demonstrated that both compounds are able to penetrate through the stratum corneum, and the CHL has a higher percutaneous absorption compared to CAF. This study support the idea that the formulation with YME may have presented the inhibitory effect of MMPs through these phenolic compounds, proving the possibility of having been the permeation in the skin of treated animals. However, is necessary a suitability study of a formulation that really proves the permeation of these compounds.

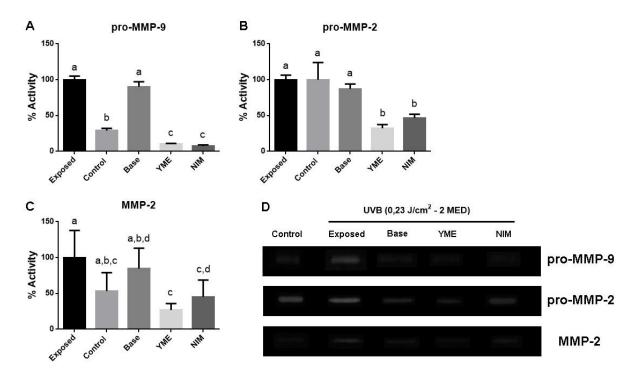
Thus, the results of inhibition of the MMPs activity reported in the present study become promising for possible development of an anti-aging formulation using the YME, due to the lack of studies using yerba mate to the proposed aim.

YME presents a high content of bioactive of great interest in cosmetics as phenolic acids (CAF and CHL), also having an excellent antioxidant activity and not showed cytotoxicity. The results of this study show that topical treatment with the cream containing the hydroethanolic extract of *Ilex paraguariensis* exerts a protective effect on the skin against the damaging effects of acute exposure to UVB, such as collagen degradation and inhibition of MMPs, may thus, having an anti-aging effect. However, it needs to be more studies to prove the molecular mechanism of inhibition of the activity and/or expression of MMPs by phytochemical constituents of the extract and a permeation study of phenolic extract compounds and a better adaptation of the topical formulation.

Table 2. Enzyme activity (%) of MMPs in the groups treated in the *in vivo* test.

Enzymatic activity $\pm$ SD (%) $^*$				
	pro-MMP-9 <sup>***</sup>	pro-MMP-2 <sup>#</sup>	MMP-2 <sup>&amp;</sup>	
Exposed*	100±5,1 <sup>A</sup>	100±6,29 <sup>A</sup>	100±37,96 <sup>A</sup>	
Control	29,2±2,99 <sup>B</sup>	102,51±20,99 <sup>A</sup>	45,37±26,6 <sup>A,B,C</sup>	
Base	90,2±6,97 <sup>A</sup>	87,35±6,61 <sup>A</sup>	84,72±28,51 <sup>A,B,D</sup>	
YME	10,14±1,04 <sup>C</sup>	32,29±5,08 <sup>B</sup>	26,92±8,84 <sup>c</sup>	
NIM	7,47±1,53 <sup>c</sup>	46,8±5,01 <sup>B</sup>	45,26±23,43 <sup>C,D</sup>	

<sup>\*</sup>percentage of enzyme activity considering the 100% activity of Exposed group. Different letters indicate significant difference in the columns values (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). [\*\*\*p<0,001; \*p<0,001; \*p<0,005.]



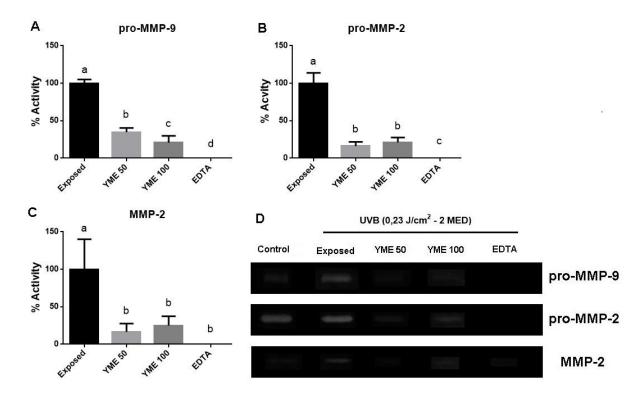
**Figure 7.** Results of the MMPs activities (A, B and C) and gelatin zymogram (D) *in vivo*. Enzyme activity (%) expressed in arbitrary units normalized by the Exposed group (irradiated) to which was assigned 100% activity. Different letters indicate significant differences (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). [A: p < 0.001; B: p < 0.001; C: p < 0.05.]

YME inhibit activity of MMPs in vitro in the UVB-exposed skin of mices. Analyzing the results (Figure 8), YME presented high inhibitory potential in vitro of MMPs activities. In the test where the gels were incubated with YME, inhibition of MMP-2 similarly occurred to inhibition of pro-MMP-2, with the YME 50 showing greater inhibitory activity than the EXB 100, showing that the inhibitory activity over MMP-2 is not dose-dependent. Regarding, the activity inhibition of pro-MMP-9 by YME 100 was slightly higher than YME 50, but with statistically significant difference (Table 3). As with the pro-MMP-2, caffeic acid and its derivatives present in the YME may have chelated zinc active site, preventing partial activity of pro-MMP-9.

Table 3. Enz	ymatic activity	(%)	of the	MMPs in	the gels	treated wi	ith YME.
I WOIC OF LINE	y minute activity	( / U	, or the	TANTANT D III	tile Scip	ti catea m	

Enzymatic activity $\pm$ SD (%) $^*$				
	pro-MMP-9 <sup>***</sup>	pro-MMP-2 <sup>#</sup>	MMP-2 <sup>&amp;</sup>	
Exposed*	100±5,1 <sup>A</sup>	100±13,81 <sup>A</sup>	100±40,17 <sup>A</sup>	
YME 50	34,72±5,63 <sup>B</sup>	16,14±5,66 <sup>B</sup>	16,53±11 <sup>B</sup>	
YME 100	20,69±9,61 <sup>c</sup>	21,05±6,63 <sup>B</sup>	25,07±12,4 <sup>B</sup>	
EDTA	$O^D$	$0^{c}$	$O_{B}$	

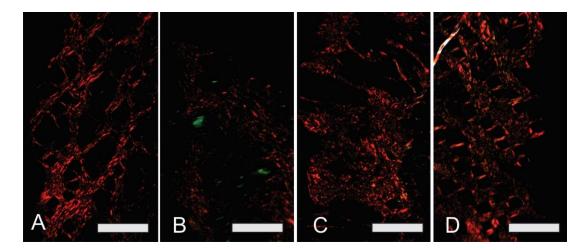
<sup>\*</sup>percentage of enzyme activity considering the 100% activity of Exposed group. Different letters indicate significant difference in the columns values (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). [\*\*\*\*p<0,01;  $^{*}p$ <0,001; MMP-2:  $^{\&}p$ <0,001.]



**Figure 8.** Results of the MMPs activities (A, B and C) and gelatin zymogram (D) *in vitro*. Enzyme activity (%) expressed in arbitrary units normalized by the Exposed group (irradiated) to which was assigned 100% activity. Different letters indicate significant differences (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). [A: p < 0.01; B: p < 0.001; C: p < 0.001.]

YME maintains the collagen fibers arranged in the skin. In this study, acute UVB radiation (0.23 J/cm²) on the skin significantly decreased levels of type I collagen (Figure 9B). The fibers proved disorganized, besides the increase in the ratio of type III and type I collagen, which could be observed by the greenish fibers, which are young fibers (type III collagen). Histological changes such as disorganization of collagen fibers, excessive deposition of abnormal elastic fibers, reduced collagen content, and an increase in the ratio of type III collagen and type I collagen occurs in photoaging .<sup>55,56</sup> In treated group with nimesulide (Figure 9A) was observed type I collagen bundles arranged in parallel and interlocked extended while type III collagen can hardly be seen between the beams. In the group treated with the base formulation (Figure 9C), the fibers shown to be disorganized, with

the formation of grooves in the structure, and can view the type III collagen (young fibers). In the group treated with formulation containing YME (Figure 9D), type I collagen bundles showed up intertwined, more organized, homogeneous and better distributed in the dermal structure.



**Figure 9.** Photomicrograph of picrosirius stained skin sections. A: NIM; B: Exposed; C: Base; D: YME.

Fonseca et al.<sup>57</sup> investigated the potential use of topical formulations containing *Calendula officinalis* against skin damage induced by UVB radiation. The authors evaluated several parameters: GSH levels, skin proteinase activity, leukocyte migration, histological analysis of inflammatory infiltrates and the appearance and arrangement of collagen. The formulation with *Calendula officinalis* extract preserved dermal structure, the collagen bundles proved thick, strongly intertwined and slightly wavy.

Another study evaluated the effect of hydrolysed gelatin (HG) of *Gadus macrocephalus* in reducing collagen and UV induced inflammation in mice photoaged skins. This study has demonstrated that HG can improve pathological changes induced by UV irradiation in the connective tissue. In addition, the HG improved distribution of types I and III collagens and inhibited the increase in the ratio between type III and type I collagen (Chen; HOU, 2016).<sup>58</sup>

In this study, the dose of UVB was sufficient to cause collagen degradation in the irradiated group. Concomitant with the increased of release / secretion of MMP-2 and myeloperoxidase, enzymes responsible for disruption of the dermal collagen. <sup>59,60</sup> The loss of the interlocking, characteristic of collagen, observed in the group exposed and treated with formulation without EXB shows the result of an imbalance in the dynamin synthesis and collagen degradation, resulting in breakdown of the architecture of these molecules. Furthermore, the release of MMP-2 was higher in the group treated with the formulation without YME, justifying the similarity in colagenous pattern with the exposed group.

The YME proved stimulate the fibroblasts proliferation *in vitro*, as reported in this study. Therefore, the composition applied this test may result in an increase in collagen synthesis as a result of an increase in the number of cells that produce collagen. Rutin, despite not having been identified in YME, is present in yerba mate<sup>35</sup> and may be secondarily involved in colagenous process. It has been shown that rutin is able to impair the glycation of collagen, a biochemical events involved in the pathogenesis of cellular damage caused by UV radiation. The formation of cell glycation products has previously been related to decrease in collagen resorption. <sup>61-63</sup>

Gugliucci et al.<sup>64</sup> evaluated the anti-glycation ability of some bioactive substances that are the major components of the aqueous extract of yerba mate (chlorogenic acid, caffeic acid and oleanolic acid). This study showed that the polyphenolic bioactives presented strong anti-glycation effect, and in many cases greater effect that aminoguanidine, a known anti-glycation agent, justifying the importance of synergy between the different classes found in the extract.

The results indicate that topical treatment with a formulation containing the YME exerts a protective effect on skin against the harmful effects of acute exposure to UVB, such as collagen degradation and inhibition of MMPs, may thus have an anti-aging effect. However, it needs to be more studies to prove the molecular mechanism of inhibition of the activity and / or expression of MMPs by phytochemical constituents of the extract, a permeation study of phenolic extract compounds and a better match of the topical formulation.

#### REFERENCES

- (1) Meloni, M.; Nicolay, J. F. In Toxicology in vitro; 2003; Vol. 17, pp 609–613.
- (2) Ivan, A. L. M.; Campanini, M. Z.; Martinez, R. M.; Ferreira, V. S.; Steffen, V. S.; Vicentini, F. T. M. C.; Vilela, F. M. P.; Martins, F. S.; Zarpelon, A. C.; Cunha, T. M.; Fonseca, M. J. V; Baracat, M. M.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A.; Casagrande, R. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *138*, 124–133.
- (3) Rittié, L.; Fisher, G. J. Ageing Research Reviews. 2002, pp 705–720.
- (4) Chen, B.; Li, R.; Yan, N.; Chen, G.; Qian, W.; Jiang, H.; Ji, C.; Bi, Z. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11* (5), 3344–3348.
- (5) Saito, M.; Tanaka, M.; Misawa, E.; Yao, R.; Nabeshima, K.; Yamauchi, K.; Abe, F.; Yamamoto, Y.; Furukawa, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, 1–9.
- (6) Campanini, M. Z.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Ivan, A. L. M.; Ferreira, V. S.; Vilela, F. M. P.; Vicentini, F. T. M. C.; Martineza, R. M.; Zarpelon, A. C.; Fonseca, M. J. V; Faria, T. J.; Baracat, M. M.; Verri, W. A.; Georgetti, S. R.; Casagrande, R. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *127*, 153–160.
- (7) Quan, T.; Qin, Z.; Xia, W.; Shao, Y.; Voorhees, J. J.; Fisher, G. J. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2009**, *14* (1), 20–24.
- (8) Inomata, S.; Matsunaga, Y.; Amano, S.; Takada, K.; Kobayashi, K.; Tsunenaga, M.; Nishiyama, T.; Kohno, Y.; Fukuda, M. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120* (1), 128–134.
- (9) Liotta, L. A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Hart, I.; Foltz, C. M.; Shafie, S. *Nature* **1980**, 284 (5751), 67–68.
- (10) Filip, G. A.; Postescu, D.; Tatomir, C.; Muresan, A.; Clichici, S. *J Physiol Pharmacol* **2012**, *63* (4), 423–432.
- (11) Bracesco, N.; Sanchez, A. G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, pp 378–384.

- (12) Filip, R.; Lotito, S. B.; Ferraro, G.; Fraga, C. G. Nutr. Res. 2000, 20 (10), 1437–1446.
- (13) Gosmann, G.; Guillaume, D.; Taketa, A. T. C.; Schenkel, E. P. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (3), 438–441.
- (14) Gnoatto, S. C. B.; Dassonville-Klimpt, A.; Da Nascimento, S.; Galéra, P.; Boumediene, K.; Gosmann, G.; Sonnet, P.; Moslemi, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (9), 1865–1877.
- (15) Barg, M.; Rezin, G. T.; Leffa, D. D.; Balbinot, F.; Gomes, L. M.; Carvalho-Silva, M.; Vuolo, F.; Petronilho, F.; Dal-Pizzol, F.; Streck, E. L.; Andrade, V. M. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37* (1), 195–201.
- (16) Lanzetti, M.; Bezerra, F. S.; Romana-Souza, B.; Brando-Lima, A. C.; Koatz, V. L. G.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. *Nutrition* **2008**, *24* (4), 375–381.
- (17) Staniforth, V.; Huang, W. C.; Aravindaram, K.; Yang, N. S. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23* (5), 443–451.
- (18) Chandra, S.; De Mejia, E. G. J. Agric. Food Chem. **2004**, 52 (11), 3583–3589.
- (19) Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. Food Chem. **1999**, 64 (4), 555–559.
- (20) Agostini-Costa, T. D. A. S.; Garriti, D. D. O. S. S.; Lima, L.; Freire, S.; Abreu; Pinto, F. A.; Feitosa, T. Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment. 1999, 17 (2).
- (21) Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim, S. K. *Plant Sci.* **2002**, *163* (6), 1161–1168.
- (22) Mokbel, M. S.; Hashinaga, F. Food Chem. **2006**, 94 (4), 529–534.
- (23) Mosmann, T. J. Immunol. Methods **1983**, 65 (1–2), 55–63.
- (24) Ropke, C. D.; da Silva, V. V; Kera, C. Z.; Miranda, D. V; de Almeida, R. L.; Sawada, T. C. H.; Barros, S. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (2), 439–442.
- (25) Suzuki, K.; Ota, H.; Sasagawa, S.; Sakatani, T.; Fujikura, T. *Anal. Biochem.* **1983**, *132* (2), 345–352.
- (26) Kupai, K.; Szucs, G.; Cseh, S.; Hajdu, I.; Csonka, C.; Csont, T.; Ferdinandy, P. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2010**, *61* (2), 205–209.
- (27) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; others. *J biol Chem* **1951**, *193* (1), 265–275.
- (28) Junqueira, L. C. U.; Bignolas, G.; Brentani, R. R. Histochem. J. 1979, 11 (4), 447–455.
- (29) Deladino, L.; Teixeira, A. S.; Reta, M.; García, A. D. M.; Navarro, A. S.; Martino, M. N. *Food Nutr. (Roma).* **2013**, *4*, 154–162.
- (30) Gosmann, G.; Barlette, A. G.; Dhamer, T.; Arcari, D. P.; Santos, J. C.; de Camargo, E. R.; Acedo, S.; Gambero, A.; Gnoatto, S. C.; Ribeiro, M. L. *Plant Foods Hum Nutr* **2012**, *67* (2), 156–161.
- (31) Pagliosa, C. M.; Pereira, S. M.; Vieira, M. A.; Costa, L. A.; Teixeira, E.; Amboni, R. D. D. E. M. C.; Amante, E. R. *J. Sens. Stud.* **2009**, *24* (3), 415–426.

- (32) Grujic, N.; Lepojevic, Z.; Srdjenovic, B.; Vladic, J.; Sudji, J. *Molecules* **2012**, *17* (3), 2518–2528.
- (33) Dartora, N.; De Souza, L. M.; Santana-Filho, A. P.; Iacomini, M.; Valduga, A. T.; Gorin, P. A. J.; Sassaki, G. L. *Food Chem.* **2011**, *129* (4), 1453–1461.
- (34) Anesini, C.; Turner, S.; Cogoi, L.; Filip, R. LWT Food Sci. Technol. **2012**, 45 (2), 299–304.
- (35) Bravo, L.; Goya, L.; Lecumberri, E. Food Res. Int. 2007, 40 (3), 393–405.
- (36) Jaiswal, R.; Sovdat, T.; Vivan, F.; Kuhnert, N. J. Agric. Food Chem. **2010**, 58 (9), 5471–5484.
- (37) Puangpraphant, S.; Berhow, M. A.; Vermillion, K.; Potts, G.; Gonzalez de Mejia, E. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (10), 1509–1522.
- (38) Jantschko, W.; Furtmüller, P. G.; Zederbauer, M.; Neugschwandtner, K.; Lehner, I.; Jakopitsch, C.; Arnhold, J.; Obinger, C. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69* (8), 1149–1157.
- (39) Ottonello, L.; Dapino, P.; Pastorino, G.; Montagnani, G.; Gatti, F.; Guidi, G.; Dallegri, F. *Drugs* **1993**, *46* (1), 29–33.
- (40) Choi, H.-S.; Park, E. D.; Park, Y.; Han, S. H.; Hong, K. B.; Suh, H. J. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15* (6), 779–790.
- (41) Zhou, L.; Yan, C.; Gieling, R. G.; Kida, Y.; Garner, W.; Li, W.; Han, Y.-P. *BMC Immunol.* **2009**, *10*, 15.
- (42) Wang, Y.; Deng, X. L.; Xiao, X. H.; Yuan, B. X. Curr.Neurovasc.Res. 2007, 4 (3), 176–183.
- (43) Steenport, M.; Khan, K. M. F.; Du, B.; Barnhard, S. E.; Dannenberg, A. J.; Falcone, D. J. *J. Immunol.* **2009**, *183* (12), 8119–8127.
- (44) Han, Y. P.; Tuan, T. L.; Wu, H.; Hughes, M.; Garner, W. L. J. Cell Sci. **2001**, 114 (Pt 1), 131–139.
- (45) Zhang, M.; Zhou, J.; Wang, L.; Li, B.; Guo, J.; Guan, X.; Han, Q.; Zhang, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37* (3), 347–354.
- (46) Han, Y. P.; Nien, Y. D.; Garner, W. L. J. Biol. Chem. 2002, 277 (30), 27319–27327.
- (47) Schinella, G.; Neyret, E.; Cónsole, G.; Tournier, H.; Prieto, J. M.; Ríos, J.-L.; Giner, R. M. *Planta Med.* **2014**, *80* (12), 961–968.
- (48) Ra, H. J.; Parks, W. C. *Matrix Biology*. **2007**, pp 587–596.
- (49) Balupillai, A.; Prasad, R. N.; Ramasamy, K.; Muthusamy, G.; Shanmugham, M.; Govindasamy, K.; Gunaseelan, S. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91* (6), 1458–1468.
- (50) Chung, T.-W.; Moon, S.-K.; Chang, Y.-C.; Ko, J.-H.; Lee, Y.-C.; Cho, G.; Kim, S.-H.; Kim, J.-G.; Kim, C.-H. *FASEB J.* **2004**, *18* (14), 1670–1681.
- (51) Shi, Z.; Li, N.; Shi, Q.; Tang, Y. Drug Dev. Res. 2012, 73 (6), 317–324.

- (52) Park, J. E.; Pyun, H. B.; Woo, S. W.; Jeong, J. H.; Hwang, J. K. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2014**, *30* (5), 237–245.
- (53) Jung, H. Y.; Shin, J. C.; Park, S. M.; Kim, N. R.; Kwak, W.; Choi, B. H. *Toxicol. Reports* **2014**, *1*, 658–666.
- (54) Marti-Mestres, G.; Mestres, J. P.; Bres, J.; Martin, S.; Ramos, J.; Vian, L. *Int. J. Pharm.* **2007**, *331* (1), 139–144.
- (55) Hsieh, H. Y.; Lee, W. C.; Senadi, G. C.; Hu, W. P.; Liang, J. J.; Tsai, T. R.; Chou, Y. W.; Kuo, K. K.; Chen, C. Y.; Wang, J. J. *Med. Chem.* **2013**, *56* (13), 5422–5435.
- (56) Fan, J.; Zhuang, Y.; Li, B. *Nutrients* **2013**, *5* (1), 223–233.
- (57) Fonseca, Y. M.; Catini, C. D.; Vicentini, F. T. M. C.; Nomizo, A.; Gerlach, R. F.; Fonseca, M. J. V. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127* (3), 596–601.
- (58) Chen, T.; Hou, H. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2016, 162, 633-640.
- (59) Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri, W. A.; Dorta, D. J.; dos Santos, A. C.; Fonseca, M. J. V. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *84* (1), 21–27.
- (60) Vicentini, F. T. M. C.; Simi, T. R. M.; Del Ciampo, J. O.; Wolga, N. O.; Pitol, D. L.; Iyomasa, M. M.; Bentley, M. V. L. B.; Fonseca, M. J. V. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69* (3), 948–957.
- (61) Cervantes-Laurean, D.; Schramm, D. D.; Jacobson, E. L.; Halaweish, I.; Bruckner, G. G.; Boissonneault, G. A. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17* (8), 531–540.
- (62) DeGroot, J.; Verzijl, N.; Budde, M.; Bijlsma, J. W.; Lafeber, F. P.; TeKoppele, J. M. *Exp. Cell Res.* **2001**, *266* (2), 303–310.
- (63) Masaki, H.; Okano, Y.; Sakurai, H. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1428* (1), 45–5.
- (64) Gugliucci, A.; Bastos, D. H. M.; Schulze, J.; Souza, M. F. F. Fitoterapia **2009**, 80 (6), 339–344.

# ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais	
·	a ———
	Universidade Federal de Santa Maria

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Ilex paraguariensis A. St. Hil.: ESTUDO DA ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES E DA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB", protocolada sob o CEUA nº 9844100315, sob a responsabilidade de **Melânia Palermo Manfron** *e equipe; Camila Helena Ferreira Cuelho; Indiara Brusco; Laís Moreira ; Sara Marchesan de Oliveira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 29/04/2015.

We certify that the proposal "Ilex paraguariensis A. St. Hill.: METALLOPROTEINASE ACTIVITY AND PREVENTION OF THE ALTERATIONS INDUCED SKIN UVB RADIATION", utilizing 25 Heterogenics mice (25 females), protocol number CEUA 9844100315, under the responsibility of **Melânia Palermo Manfron** and team; Camila Helena Ferreira Cuelho; Indiara Brusco; Laís Moreira; Sara Marchesan de Oliveira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/29/2015.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2015 a 12/2015 Área: Farmácia Industrial

Origem: Biotério Central UFSM

Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Fêmeas idade: 10 a 10 meses N: 25

Linhagem: Swiss Peso: 30 a 30 g

Resumo: A pele está exposta a um elevado estresse oxidativo em que poucos tecidos estão sujeitos ao longo da vida. Existem diferentes fontes exógenas de estresse que agem com efeitos prejudiciais às células; dentre elas estão a radiação ultravioleta (RUV) e a poluição (MELONI; NICOLAY, 2003). A radiação UVB representa em torno de 10% da radiação UV capaz de chegar à superfície terrestre. No entanto, por promover dano direto ao DNA, RNA, proteínas e outros constituintes celulares, é considerada o maior responsável pelos efeitos biológicos relacionados ao câncer de pele e fotoenvelhecimento (INCA, 2014). A RUV, ao induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que desencadeiam mecanismos de sinalização capazes de alterar a expressão gênica via MAPquinase (MAPK) por ativação do fator de transcrição AP-1, contribui para aumentar a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). Aumento de expressão e atividade de MMP-2 e -9 são também observados em consequência ao processo inflamatório que acompanha a exposição à RUV (SHINDO et al, 1994; ROPKE, et al., 2006). As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases Zn-dependentes, que promovem a degradação da matriz extracelular (MEC), danificando desse modo a integridade estrutural da derme (WOESSNER Jr., 1991). A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas, as quais podem ser divididas em: colagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinas (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo a sua estrutura. Estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais e nos processos de doenças, como artrite, osteopatias e câncer (destrói a membrana basal, contribuindo para a metástase) (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002). Ilex paraguariensis A. St. Hil. é uma árvore nativa da América do Sul, que cresce naturalmente e é cultivada na Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. Através de suas folhas é preparado o chá tradicional (chimarrão), altamente consumido como tônico e estimulante (GRIGIONI et al., 2004). Investigações prévias desta planta mostraram a presença de muitos compostos bioativos como xantinas, derivados do ácido cafeoilquínico, flavonoides e saponinas triterpenoides (ALIKARIDIS, 1987; FILIP et al., 2001; GOSMANN et al., 1995). Os polifenóis presentes nas folhas da I. paraguariensis destacam-se por apresentarem as seguintes características: quimioprevenção e atividade terapêutica no tratamento do câncer; prevenção da lipoperoxidação em mamíferos; prevenção de efeitos adversos decorrentes da radiação UV, com redução do dano oxidativo (SILVA et al., 2010). Na classe das saponinas encontram-se as agliconas, ácidos ursólico e oleanólico, responsáveis pelo sabor amargo e pela atividade anti-inflamatória e adstringente da erva-mate (GNOATTO et al., 2008). Além disso, estudos comprovaram a capacidade das saponinas de inibir enzimas da MEC, como as colagenases (RIBEIRO, 2012). Devido a alta incidência de RUV e da prevalência da população caucasiana na Região Sul, o presente estudo contribui para a pesquisa de inibidores de MMPs, e outros parâmetros correlacionados com a exposição à RUV ainda não abordados na literatura para esta planta. Para tanto, os camundongos serão tratados topicamente com uma formulação em gel contendo o extrato da erva-mate,



#### Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Maria

antes da exposição à RUV, para analisar parâmetros inflamatórios; estresse oxidativo e degradação do colágeno. Duas horas após a exposição à RUV, será realizada a coleta de sangue e, imediatamente, os animais serão sacrificados e as peles serão removidas para análises dos parâmetros mencionados. Para analisar a atividade das MMPs, serão utilizados os grupos não tratados topicamente: exposto e não exposto à RUV (grupo controle). O homogenato da pele dos animais destes grupos serão utilizados para avaliar o efeito que o extrato de erva-mate, nas concentrações de 0, 50, 100 e 500 ug/mL, apresentam sobre a atividade das MMPs. Através dos resultados dos parâmetros abordados, que ainda não foram apresentados para as folhas de erva-mate, o presente estudo poderá contribuir para a pesquisa de futuros agentes quimioterápicos, possibilitando o isolamento de princípios ativos.

Local do experimento: O tratamento dos animais será realizado no laboratório de Bioquímica Toxicológica ( Prédio 18) da UFSM, assim como as análises da infiltração de neutrófilos, estresse oxidativo, doseamento de interleucina-6; análise da atividade de metaloproteinases será realizada no laboratório de Neurofarmacologia da UFSM (Prédio 21); e a análise da degradação de colágeno no laboratório de Morfofisiologia Experimental da UFSM (Prédio 19)

Santa Maria, 28 de novembro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Maria

Daniela 3 Leal

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Maria

# ANEXO C - IMAGEM DA EXSICATA

