

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**Avaliação do efeito fotoquimioprotetor do extrato etanólico do oxicoco
(Cranberry- *Vaccinium macrocarpon* Antion) e suas frações em fibroblastos
dérmicos humanos.**

BRASÍLIA

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**Avaliação do efeito fotoquimioprotetor do extrato etanólico do oxicoco
(Cranberry - *Vaccinium macrocarpon* Antion) e suas frações em fibroblastos
dérmicos humanos.**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

BRASÍLIA
2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MANUEL HUMBERTO MERA LOPEZ

**Avaliação do efeito fotoquimioprotetor do extrato etanólico do oxicoco
(Cranberry - *Vaccinium macrocarpon* Antion) e suas frações em fibroblastos
dérmicos humanos.**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Simone Batista Pires Sinoti
Secretaria de Estado da Educação do Distrito Federal

Profa. Dra. Carine Royer (Suplente)
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar na vida e ter me encaminhado na área de pesquisa.

À minha orientadora profa. Dra. Maria de Fátima Borin pela orientação e dedicação, paciência, cuidados e por ter me acolhido no puxadinho durante o tempo de doutorado.

Aos meus amados pais, Ivan e Maria Edilma, por dedicar todo seu amor, apoio incondicional.

Ao meu irmão, William Fernando, por sempre ser meu o exemplo de coragem, dedicação e luta.

À minha avó, Ana Lucia, por me ensinar a ser melhor todos os dias.

A toda minha família que sempre está presente na distância e aos meus amigos que sempre me apoiaram.

À Thais por seu grande amor, apoio, cuidados e compressão durante este período, por me acompanhar e fortalecer todos os dias.

Aos meus colegas do puxadinho da Fátima, Daniela, Laíza Magalhães, Michelly Oliveira, Rafael, Hanna Almeida, Paloma Almeida e Palloma Soares por sempre me ajudarem e se tornarem outra família.

As alunas do estágio e PIBIC, Andressa Vargas, Natália Almeida, por me acompanharem no dia a dia laboratório.

A todos os professores, técnicos e alunos que fazem parte importantíssima do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL).

À Universidade de Brasília e aos laboratórios LPN, LabPronat, LTMAC e toxicologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília (PPCGF) e da Fundação Universidade de Brasília (FUB)/Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília (DPG).

RESUMO

O cranberry é uma fruta bem estudada e relacionada com uma variedade de atividades biológicas, devido à grande variedade de fitocompostos que possui. Seu perfil químico inclui antocianinas, flavonoides, pró-antocianidinas, ácidos fenólicos e triterpenos. O presente estudo foi desenvolvido para determinar o papel do extrato total e frações de acetato de etila e aquosa do cranberry no estresse oxidativo induzido por radiação UVA em cultura celular de fibroblastos humanos. A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, o extrato total (ET) e a fração aquosa (Fr aquosa) da farinha do cranberry mostram uma atividade antioxidante moderada, com IC_{50} $383,9 \pm 0,93$ e $427,1 \pm 0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, por outro lado a fração acetato de etila (Fr Acetato) mostrou um IC_{50} de $17,45 \pm 0,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi a mais ativa. O teor de fenóis foi de $23,913 \pm 0,453$; $18,043 \pm 0,453$ e $14,783 \pm 0,547 \mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$ para o ET, Fr aquosa e FrAcOEt, e o conteúdo de flavonoides totais foi $19,422 \pm 1,47$; $27,181 \pm 0,48$ e $11,836 \pm 0,55 \mu\text{g EQ.mg de extrato}^{-1}$, maior na FrAcOEt. A inibição da peroxidação lipídica pelos ET, Fr aquosa e Fr Acetato foram superiores ao α -Tocoferol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($59,63 \pm 3,14$; $55,56 \pm 2,74$ e $60,18 \pm 2,25$, respectivamente). A citotoxicidade das amostras foi relativamente baixa com sobrevivência superior a 70% das células após o tratamento. Quanto aos efeitos observados nas células tratadas com os extratos, os três extratos mostraram efeito na diminuição dos níveis de peroxidação lipídica das células irradiadas, o efeito no sistema antioxidante mostrou que para a enzima catalase foram mais ativos o ET, Fr aquosa e Fr acetato, na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Fr acetato mostrou a maior eficiência na diminuição das ROS intracelulares, e também contribuiu para a manutenção dos níveis de colágeno extracelular. Esta mesma fração teve o melhor efeito no processo de cicatrização simulado pelo *scratch* teste. Os resultados sugerem uma ação agonista parcial dos extratos na isoforma de PPAR α . O extrato total e suas frações também diminuíram a expressão gênica de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 nas células irradiadas, mas não aumentaram a expressão gênica de colágeno, TIMP-1 ou PPAR α . Os perfis fitoquímicos dos extratos e suas frações foram identificados parcialmente e foram encontrados vários compostos anteriormente descritos para o fruto.

Palavras-chave: Cranberry, estresse oxidativo, pele, fotoquimioprevenção.

ABSTRACT

Cranberry is a well-studied fruit related to a variety of biological activities, due to the wide variety of phytochemicals it contains. Its chemical profile includes anthocyanins, flavonoids, pro-anthocyanidins, phenolic acids and triterpenes. The present study was developed to determine the role of the total extract and ethyl acetate and aqueous fractions of cranberry in oxidative stress induced by UVA radiation in human fibroblast cell culture. The antioxidant activity was determined by the DPPH method, the total extract (ET) and the aqueous fraction (Fr aqueous) of cranberry flour show a moderate antioxidant activity, with IC₅₀ 383.9 ± 0.93 and 427.1 ± 0.75 µg. mL⁻¹ respectively, on the other hand, the ethyl acetate fraction (Fr Acetate) showed an IC₅₀ of 17.45 ± 0.94 µg.mL⁻¹ and was the most active. The phenol content was 23.913 ± 0.453; 18.043 ± 0.453 and 14.783 ± 0.547 µg EAG.mg of extract-1 for ET, aqueous Fr and FrAcOEt, and the total flavonoid content was 19.422 ± 1.47; 27.181 ± 0.48 and 11.836 ± 0.55 µg EQ.mg of extract-1, higher in FrAcOEt. The inhibition of lipid peroxidation by ET, aqueous Fr and Acetate Fr were superior to α-Tocopherol at a concentration of 100 µg.mL⁻¹ (59.63 ± 3.14; 55.56 ± 2.74 and 60.18 ± 2.25, respectively). The cytotoxicity of the samples was relatively low with survival of more than 70% of the cells after treatment. Regarding the effects observed in the cells treated with the extracts, the three extracts showed an effect on reducing the levels of lipid peroxidation of the irradiated cells, the effect on the antioxidant system showed that ET, aqueous Fr and acetate Fr were more active for the catalase enzyme. at a concentration of 25 µg.mL⁻¹. Fr acetate showed the greatest efficiency in reducing intracellular ROS, and also contributed to the maintenance of extracellular collagen levels. This same fraction had the best effect on the healing process simulated by the scratch test. The results suggest a partial agonist action of the extracts on the PPARα isoform. The total extract and its fractions also decreased the gene expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 in irradiated cells, but did not increase the gene expression of collagen, TIMP-1 or PPARγ. The phytochemical profiles of the extracts and their fractions were partially identified and several compounds previously described for the fruit were found.

Keywords: Cranberry, oxidative stress, skin, photochemoprevention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele.....	4
Figura 2. Curva padrão ácido gálico.....	46
Figura 3. Curva padrão de quercetina.....	48
Figura 4 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm do Extrato total espectro Uv.....	51
Figura 5 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm da Fração Acetato de etila.....	51
Figura 6 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm da Fração Aquosa. ...	52
Figura 27 Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm do Padrão Cianidina-O-glicosídeo.	52
Figura 8. Representação das curvas obtidas no ensaio de inibição do radical DPPH·.....	53
Figura 9. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com o extrato etanólico do cranberry e suas frações.....	58
Figura 10. Tratamento com extrato e frações do cranberry a após 1h de irradiação com determinação da viabilidade celular após 1 h, 24 h e 48 h..	61
Figura 11. Viabilidade de células HeLa tratadas com o extrato etanólico do cranberry e suas frações.....	62
Figura 12. Atividade da enzima SOD em células submetidas ou não ao estresse oxidativo e tratadas com extratos de cranberry.....	64
Figura 13. Avaliação dos níveis de superóxido nas células.....	65
Figura 14. Atividade da enzima catalase sem indução do estresse.....	67
Figura 15. Atividade da enzima catalase com indução do estresse.....	68
Figura 16. Avaliação da peroxidação lipídica em células não irradiadas e tratadas.....	70
Figura 17. Avaliação da peroxidação lipídica em células irradiadas e tratadas.....	71
Figura 18. Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio.....	73
Figura 19. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPAR α	76
Figura 20. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPAR β/δ . L-165041 – agonista de PPAR β/δ	77
Figura 21. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPAR γ	78
Figura 22. Influência dos tratamentos do cranberry em fibroblastos dérmicos humanos sem exposição à radiação Uv, na expressão gênica relativa do mRNA de alguns genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica.....	84

Figura 23. Influência dos tratamentos do cranberry em fibroblastos dérmicos humanos após exposição a radiação UV, na expressão gênica relativa do mRNA de alguns genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica.	88
Figura 24. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF-1 tratadas com: a) o extrato total (ET), b) fração aquosa (FrAq) e c) fração acetato de etila (FrAcOEt).	89
Figura 25. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF-1 expostas ao estresse oxidativo.	90
Figura 26. Fotomicrografia das culturas celulares para avaliação da migração celular <i>in vitro</i>	93
Figura 27. Efeito dos tratamentos com extrato total ET, Fração aquosa (FrAq), Fração Acetato de etila (FrAcOEt) na migração celular no <i>scratch</i> teste acompanhada por 24 h.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Rendimento do processo de obtenção do extrato bruto de Cranberry.	45
Tabela 3. Rendimento das frações do extrato bruto do Cranberry.....	45
Tabela 4. Quantificação de polifenóis totais no extrato e frações	46
Tabela 5. Quantificação de flavonoides totais no extrato e nas frações.....	48
Tabela 5. Perfil fitoquímico dos extratos utilizados.....	50
Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato, frações e padrões – valores de IC ₅₀	54
Tabela 7. Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica obtida para o extrato e suas frações	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
AMP ciclico	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAT	Catalase
COL1A1	Colágeno do tipo I alfa-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET	Extrato Etanólico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Fr AcOEt	Fração acetato de etila
Fr Aq	Fração aquosa
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
GSH-px	Glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MEC	Matriz extracelular
MDA	Malondialdeído
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MTT	3-(4,5 dimetilthiazol-2-il) 2,5- difenil-tetrazólio
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta

UVC	Radiação ultravioleta na faixa do espectro de 100 a 280 nm
UVB	Radiação ultravioleta na faixa do espectro de 280 a 320 nm
UVA	Radiação ultravioleta na faixa do espectro de 320 a 400 nm
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PPAR	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERÁRIA	3
1.1 A pele	3
1.2 Radiação ultravioleta e a pele.....	8
1.3 Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo.....	9
1.4 O fotoenvelhecimento	11
1.5 Mecanismos do fotoenvelhecimento	12
1.6 Sistema antioxidante dérmico	15
1.7 Produtos naturais contra o fotoenvelhecimento - fotoquimioproteção	18
1.8 Espécie vegetal sob estudo - <i>Vaccinium macrocarpon</i> Aniton. 19	
1.8.1 Aspectos botânicos.....	19
1.8.2 Composição Fitoquímica	21
1.8.3 Ações biológicas	24
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Material vegetal	31
4.2 Obtenção do extrato bruto e fracionamento	31
4.3 Avaliação do teor de flavonoides totais.....	31
4.4 Avaliação do conteúdo de fenóis totais.....	32
4.6 Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico do cranberry pelo método do DPPH·	33
4.7 Cultura de fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1).....	33
4.8 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e HeLa tratadas com o extrato de <i>cranberry</i>	34

4.9	Tratamento das culturas de fibroblastos dérmicos humanos para os ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase e peroxidação lipídica	35
4.10	Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	36
4.11	Avaliação da atividade da enzima catalase	36
4.12	Avaliação da peroxidação lipídica.....	37
4.13	Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio	38
4.14	Avaliação dos níveis de superóxido nas células	39
4.15	Avaliação da atividade agonista do extrato total e frações obtidas do <i>cranberry</i> às isoformas alfa, beta/delta e gama do PPAR.....	40
4.16	Extração de RNA e ensaio RT-qPCR.....	41
4.17	Avaliação da cicatrização de feridas em fibroblastos – <i>Scratch assay</i>	42
4.18	Ensaio de quantificação de colágeno	43
4.19	Análise estatística.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Produção e caracterização química do extrato bruto e suas frações	45
5.1.1	Avaliação do conteúdo de fenóis totais.....	46
5.1.2	Avaliação do teor de flavonoides totais.....	48
5.1.3	Análise do perfil fitoquímico.....	49
5.2	Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico do <i>cranberry</i> pelo método do DPPH·	53
5.4	Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e células HeLa tratadas com o extrato de <i>cranberry</i>	57
5.5	Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	63
5.6	Avaliação da atividade da enzima catalase.	66
5.7	Avaliação da peroxidação lipídica.....	69
5.8	Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS)	72
5.9	Avaliação da atividade agonista do extrato total e frações obtidas do <i>cranberry</i> às isoformas alfa, beta/delta e gama do PPAR.....	75
5.10	Quantificação da expressão gênica relativa de alguns genes relacionados com a homeostase da pele	80

5.11	Ensaio de quantificação de colágeno no meio de cultivo das células.....	88
5.12	Avaliação da cicatrização de feridas em fibroblastos – <i>Scratch assay</i>	91
6.	CONCLUSÕES.....	97
7.	REFERENCIAS.....	98
	Apêndice 1	103

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo natural que ocorre de forma constante. O processo que se inicia com o nascimento e acontece de igual forma ao longo da vida é denominado como envelhecimento cronológico ou intrínseco. Está ligado à diminuição gradual da capacidade de realizar processos em nível celular, à perda da homeostase, e se manifesta como falhas progressivas na capacidade de manter as funções dos diferentes tecidos e órgãos (ZUSSMAN; AHDOUT; KIM, 2010). Um dos órgãos que é afetado diretamente é a pele, que sofre estes efeitos que, combinados com fatores externos ambientais, danificam a sua aparência e funções celulares, processo denominado como envelhecimento extrínseco (DEL BINO; DUVAL; BERNERD, 2018).

O envelhecimento extrínseco na pele, principalmente acelerado pela exposição à radiação UV, e nesse caso conhecido como fotoenvelhecimento, é considerado também como um fenômeno prematuro de envelhecimento (DEL BINO; DUVAL; BERNERD, 2018). É causado por fatores externos e agentes xenobióticos, que ao entrarem em contato com a pele, alinhados com fatores genéticos, provocam distintas formas de dano, e desencadeiam o processo de envelhecimento extrínseco (POON; KANG; L. CHIEN, 2015). Um destes fatores é a radiação ultravioleta (RUV), capaz de danificar, em nível celular, proteínas, lipídeos e o DNA (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI; NIKOLAKIS, 2019). A RUV é emitida principal e naturalmente pelo sol, assim como por fontes artificiais (SAMPLE; HE, 2018).

Um dos mecanismos propostos para a explicação do processo de fotoenvelhecimento envolve um conjunto de efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser geradas tanto pelo metabolismo celular como pela exposição à RUV (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006). A produção excessiva de ROS favorece o desequilíbrio redox, causa o estresse oxidativo, tornando insuficiente o sistema antioxidante que a pele possui e que normalmente a defende e anula os efeitos das ROS (RYU et al., 2009). Quando as concentrações de ROS são elevadas, estas tornam-se prejudiciais e o dano à pele é inevitável, uma vez que o desequilíbrio redox altera a síntese do

colágeno e induz a sua degradação, alterando as capacidades biológicas e mecânicas da pele (GU et al., 2020).

Os produtos naturais são amplamente considerados como fonte de compostos antioxidantes. Obtidos a partir de plantas e microrganismos, este tipo de metabolitos surge como uma alternativa no combate dos efeitos causados pelo fotoenvelhecimento, conhecidos pelo importante papel que desempenham ao retardar ou prevenir o dano crônico gerado pelas ROS, por reforçar o sistema antioxidante natural (KOSTYUK et al., 2018), atenuando a expressão de manchas na superfície da pele, além de evitar que se torne espessa, áspera, e com rugas acentuadas (TRUSWELL, 2020).

Os produtos naturais podem influenciar na regulação dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais e a expressão de componentes como o fator nuclear kappa-B, que induzem a expressão de citocinas, que são promotores de respostas inflamatórias, induzidos pelo fotoenvelhecimento, assim como a interleucina 1 (IL1), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de necrose tumoral alfa em queratinócitos e células dérmicas (PARRADO et al., 2016). A diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios responsáveis pela degradação do colágeno é de vital importância para prevenir a aparição dos sinais do dano na pele, assim como a progressão do envelhecimento causado pela RUV (GU et al., 2020).

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos biológicos resultantes do tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com o extrato etanólico total obtido do *cranberry*, fruto da planta *Vaccinium macrocarpon* A. O fruto foi escolhido para a realização deste trabalho pelo fato de ter demonstrado, em estudos anteriores, atividade antioxidante (MORAES, 2018), relacionada com presença de compostos bioativos tais como, antocianinas, procianidinas e flavonóis, que mostraram efeitos positivos na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e saúde do trato urinário (ZHAO; LIU; GU, 2018).

2. REVISÃO LITERÁRIA

1.1 A pele

A pele é um importante órgão do corpo humano, que protege todos os outros órgãos do contato com o meio exterior, garantindo assim a sua sobrevivência (GRAVITZ, 2018; NIELSEN; BENFELDT; HOLMGAARD, 2016).

A pele é considerada como o maior órgão do corpo humano e, em conjunto com o cabelo, pelos, unhas e receptores, compõe o sistema tegumentar, cuja principal função é agir como barreira mecânica (GRAHAM et al., 2019). Assim, considerada como uma barreira, a pele isola e protege o interior do corpo humano contra as condições do meio externo, como as temperaturas extremas e diferentes tipos de agentes xenobióticos que poderiam comprometer ou alterar a sua estrutura, provocando infecções (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020; WONG et al., 2016).

Dentre as tantas funções da pele, esta ajuda manter o balanço de fluidos e a temperatura do corpo, permite uma comunicação com o ambiente externo e é onde acontecem os processos envolvidos na síntese da vitamina D (PIOTROWSKA; WIERZBICKA; ŻMIJEWSKI, 2016).

Formada por três diferentes camadas, a mais superficial conhecida como epiderme, uma intermediária, a derme, e a mais interna, a hipoderme, cada uma com uma função e constituição específica. A epiderme é considerada como uma barreira seletivamente permeável, que atua simultaneamente como a interface entre o ambiente e o interior do corpo, é formada em grande parte por queratinócitos, mas também por células de Langherans, Merkel e melanócitos, presentes em menor proporção (WEIHERMANN et al., 2017; WONG et al., 2016). A epiderme é composta por várias camadas, o estrato córneo, o estrato lúcido, o estrato granuloso e o estrato basal. O estrato córneo contém corneócitos, que são queratinócitos diferenciados, e cuja matriz é rica em lipídeos, o que provê permeabilidade à barreira, protegendo contra efeitos dos diferentes agentes xenobióticos externos, além de regular a perda de fluidos. Essas células são continua e periodicamente substituídas por queratinócitos provenientes do estrato basal. O estrato lúcido é uma camada fina e clara

composta de queratinócitos mortos. Predomina a eleidina, uma proteína intracelular clara, que confere a essa camada sua aparência transparente (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020; WONG et al., 2016).

O estrato granuloso é uma fina camada que separa o estrato lúcido do estrato basal. Nesta camada os queratinócitos contêm grânulos de cisteína e histidina, que unem os filamentos de queratina. O estrato basal contém queratinócitos progenitores, células imunes, como células de Langherans e células T, e melanócitos que sintetizam a melanina, pigmento próprio da pele (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

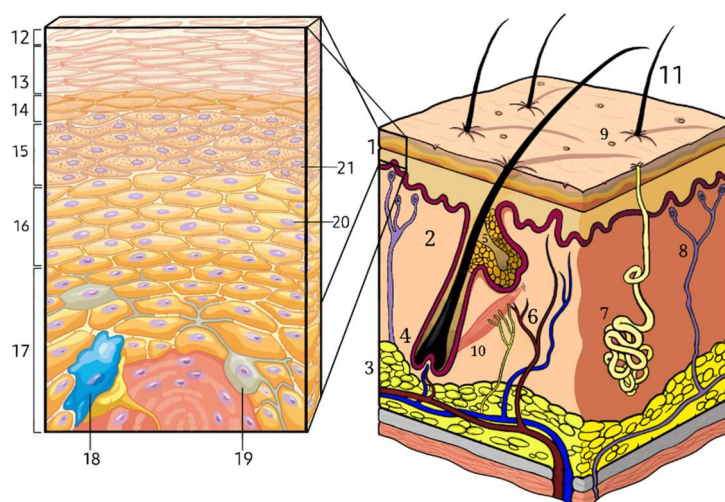


Figura 1. Estrutura da pele

1, epiderme; 2, derme; 3, hipoderme; 4, folículo piloso; 5, glândula sebácea; 6, vaso sanguíneo; 7, glândula sudorípara; 8, receptor de pressão; 9, poro; 10, músculo eretor; 11, pelo; 12, células mortas; 13, estrato córneo; 14, estrato lúcido; 15, estrato granuloso; 16, estrato espinhoso; 17, estrato basal; 18, célula de Merkel; 19, melanócito; 20, queratinócito; 21, grânulos lamelares (Figura adaptada de KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011.).

A derme é a camada que segue à epiderme, categorizada nas subcamadas papilar e reticular. A derme papilar forma extensões que atingem a epiderme e contém capilares que facilitam o transporte de nutrientes. A derme reticular é composta por folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Devido à presença e à densa concentração de fibras de colágeno e fibras reticulares que se entrelaçam nessa camada, a derme reticular é significativamente mais espessa do que a derme papilar. Ambas as camadas

dérmicas contêm fibroblastos, miofibroblastos e células imunes, como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Os fibroblastos, são as células encarregadas de sintetizar a matriz extracelular (MEC) composta pelo colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e fibras elásticas, que contribuem com a integridade estrutural da derme (GRAHAM et al., 2019; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

A estrutura da pele tem como base principal as fibras de colágeno. O colágeno é a principal proteína encontrada tanto no tecido conjuntivo como na matriz extracelular dérmica. É uma proteína de natureza fibrosa e insolúvel em água, que proporciona tanto a capacidade mecânica (força) como a flexibilidade necessárias à pele. Inicialmente, o colágeno forma-se a partir de precursores, os pró-colágenos, que são expressos nos fibroblastos dérmicos após a codificação de genes específicos. As formas com a maior abundância na região dérmica são o colágeno do tipo I e do tipo III (SHARMA; ZAKKA; MIHM, 2017; SRIVASTAVA et al., 2018).

As fibras elásticas, ricas em resíduos de glicina, prolina, alanina, leucina e valina, constituem aproximadamente 2% da proteína dérmica total. As fibras elásticas formam uma rede que provê elasticidade e resiliência para a pele normal. As macromoléculas de glicosaminoglicanos e de proteoglicanos, por sua vez, são responsáveis por manter a hidratação da pele (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; WEIHERMANN et al., 2017).

Depois da derme encontra-se a camada mais interna da pele, o tecido subcutâneo. Essa camada é composta por fibrócitos e adipócitos, e predomina nela a presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Esse conjunto de macromoléculas conferem-lhe propriedades idênticas ao muco. O tecido subcutâneo age como reserva de ácidos graxos, desta forma a pele armazena energia e funciona como um órgão endócrino, necessário para o controle da homeostase da glicose e o metabolismo lipídico. Nesta camada também são produzidos diversos tipos de mediadores, como fatores de crescimento, adipocinas e citocinas, e encontram-se vários tipos de células imunes. Além disso, a camada serve como isolante para o corpo, regulando a temperatura (NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A proteção, assim como os diferentes cuidados com a pele, tem como objetivos fundamentais mantê-la íntegra e prevenir danos na sua estrutura, uma vez que qualquer compromisso à sua integralidade pode desencadear o aparecimento de uma série de doenças no indivíduo, as quais dependem das alterações que o tecido cutâneo venha a sofrer, podendo ser tanto agudas como crônicas e variando desde uma irritação leve, expressão dos sinais de envelhecimento precoce ou a aparecimento de doenças malignas (GRAHAM et al., 2019). O envelhecimento cutâneo é um processo biológico e se define como uma alteração progressiva tanto das funções fisiológicas como da morfologia nas distintas camadas que compõem a pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo) (D. LEPHART, 2016). O conjunto de fatores envolvidos no complexo processo de envelhecimento da pele no indivíduo provoca, simultaneamente, a indução de sinais biológicos e clínicos (GRUBER et al., 2020)

Em primeiro lugar, sinais biológicos estão associados a fatores externos, como o meio ambiente (poluição, radiação UV, por exemplo). Hábitos alimentares e de vida induzem no indivíduo respostas a esses fenômenos de estresse, assim como aos processos pelos quais sua capacidade adaptativa é desafiada. Como consequência deste grupo de fatores externos (chamado exposoma), o processo de envelhecimento resultante é conhecido como envelhecimento extrínseco. Em decorrência desse processo aparecem sinais clínicos regularmente associados ao envelhecimento intrínseco, que atinge de igual forma todos os órgãos incluindo a pele, e é determinado em grande parte por fatores genéticos (CHANG, 2016; KAMMEYER; LUITEN, 2015a; TOBIN, 2017).

A soma dos fatores e sua constante ação, o que resulta tanto no envelhecimento extrínseco como intrínseco, danificado de forma significativa o tecido cutâneo. Em pessoas adultas, com idade superior a 50 anos, é comum encontrar desordens relacionados com os sinais característicos de uma pele envelhecida, como o ressecamento, desordens autoimunes, danos circulatórios, assim como uma maior suscetibilidade a infecções e aumento da incidência de câncer de pele (A COLE et al., 2018).

Os dois tipos de envelhecimento, intrínseco e extrínseco, apresentam sinais clínicos característicos e diferenciados. A pele envelhecida intrinsecamente apresenta uma série de características fenotípicas facilmente perceptíveis, tais como afinamento da derme, ressecamento, rugas finas, flacidez, processos de cicatrização mais demorados, diminuição da resistência mecânica e elástica relacionada com a baixa renovação e desorganização das fibras de colágeno e elásticas, diminuição da capacidade autoimune, alterações nos receptores sensoriais resultantes da pouca capacidade das terminações nervosas (A COLE et al., 2018; CHANG, 2016; GRAHAM et al., 2019; KAMMEYER; LUITEN, 2015b; KRUTMANN et al., 2017).

A MEC danificada, pela diminuição de biomoléculas próprias, diminuição tanto de capilares quanto de vasos sanguíneos, diminuição na capacidade de glândulas sebáceas e sudoríparas, pouca proliferação de melanócitos e células de Langerhans, notável diminuição da junção dermo-epidérmica, e alteração da função de barreira (LEPHART, 2016; MASAKI, 2010; TOBIN, 2017; ZHANG; DUAN, 2018).

Por outro lado, os sinais visíveis das alterações promovidas pelo envelhecimento extrínseco, conhecido como fotoenvelhecimento por ser causado principalmente pela exposição à radiação ultravioleta (RUV) proveniente do sol, consistem na aparição de rugas profundas, pigmentação excessiva, perda de elasticidade, dano permanente ao tecido conjuntivo da derme, endurecimento do tecido elástico na derme, diminuição da junção dermo-epidérmica, alterações funcionais e estruturais dos fibroblastos, baixa síntese e incremento da degradação do colágeno, acúmulo de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, aparecimento irregular de células como mastócitos e neutrófilos, e capilares sem suporte pela falha da estrutura da MEC. Cabe ressaltar que certas áreas do corpo com maior grau de exposição apresentam sinais mais evidentes causados pela RUV (A COLE et al., 2018; DEL BINO; DUVAL; BERNERD, 2018; GRAHAM et al., 2019; KAMMEYER; LUITEN, 2015b; KRUTMANN et al., 2017; TOBIN, 2017; ZHANG; DUAN, 2018).

As diferentes estruturas que compõem a MEC, que são os elementos que fornecem à pele humana suporte integral, mantendo sua força, elasticidade e

hidratação, e determinando sua aparência, são produzidas, estruturadas e secretadas por fibroblastos. No entanto, com o passar do tempo, a capacidade proliferativa das células diminui, fenômeno que também acontece com os fibroblastos, impedindo que se cumpram as necessidades biológicas para o correto funcionamento do tecido cutâneo (A COLE et al., 2018; ALEXIS; OBIOHA, 2017).

1.2 Radiação ultravioleta e a pele.

O espectro da luz solar abrange várias regiões que correspondem aos tipos de radiação, segundo seu comprimento, desde o infravermelho (acima de 760 nm), luz visível (400 a 760 nm) e luz ultravioleta (UV) (abaixo de 400 nm). A região do espectro UV, pode ser dividida em UVA (400 a 315 nm), UVB (315 a 280 nm) e UVC (280 a 100 nm). Atualmente, a luz solar é considerada como um dos fatores exógenos ou agente xenobiótico mais prejudicial, capaz de induzir a formação de uma grande quantidade das espécies reativas de oxigênio (ROS) na pele (PETRUK et al., 2018).

Tanto a radiação UVA quanto a UVB são consideradas como fatores desencadeantes no processo de fotoenvelhecimento. A radiação UVA tem sido considerada como um importante contribuinte neste processo porque penetra mais profundamente na derme e pode interagir com queratinócitos epidérmicos e fibroblastos dérmicos, além de ser o componente prevalente da radiação UV solar, representando mais de 95% dos raios UV que atingem a superfície terrestre (KOSTYUK et al., 2018).

A radiação UVA penetra a epiderme, chegando até a derme; está relacionada com o processo que facilita a transferência de elétrons e de energia das espécies fotossensibilizantes presentes nas células para moléculas de oxigênio presentes na pele, o que, como consequência, intensifica a produção e leva ao aumento na concentração de várias espécies reativas do oxigênio, tais como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) (MORENO et al., 2019), as quais contribuem com a formação de metaloproteinases de matriz (MMPs) na

epiderme e derme e subseqüentes alterações dos componentes da matriz extracelular (MEC) (POURANG et al., 2022).

A radiação UVB tem capacidade de atravessar a epiderme e chegar à derme superior em pequena quantidade (BATTIE et al., 2014; CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017; HAN; L. CHIEN; KANG, 2014). Na derme, a UVB causa danos cumulativos ao DNA e aumento do estresse oxidativo, e por isso é considerado o componente mais prejudicial da luz solar para a pele (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017; HAN; L. CHIEN; KANG, 2014). O UVB é responsável por queimaduras solares e imunossupressão, e a exposição crônica ao UVB leva ao fotoenvelhecimento e à fotocarcinogênese (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017; HAN; L. CHIEN; KANG, 2014).

Portanto, o aumento da radiação UVB na superfície terrestre devido à destruição da camada de ozônio se tornou uma grande ameaça, aumentando o risco de danos à pele com consequências a longo prazo, como fotoenvelhecimento, foto-imunossupressão e fotocarcinogênese, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio que, conseqüentemente, levará ao aumento do estresse oxidativo (P. LAWRENCE et al., 2018).

1.3 Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo refere-se à série de processos que acontecem quando os níveis intracelulares de ROS aumentam significativamente, devido ao sistema antioxidante das células ser incapaz de transformar ou eliminar as ROS geradas. As espécies reativas acumuladas nas células causam danos significativos nas biomoléculas disponíveis no meio, tais como lipídeos, proteínas e nas bases que formam a estrutura do DNA, e, como consequência, a integridade e a sobrevivência celular são comprometidas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). As ROS são consideradas como um grupo químico caracterizado por ser instável. Esses compostos contêm, pelo menos, um átomo de oxigênio na sua estrutura molecular, podem ter um elétron não emparelhado ou estar em um estado energético excitado, sendo capazes de reagir ao transferir o elétron desse átomo (HARRIS; DENICOLA, 2020), o que justifica o

seu alto grau de reatividade (capacidade oxidante) superando inclusive o oxigênio molecular. Dentre as ROS, se encontram algumas espécies como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), radical peroxila ($LOO^{\cdot}$), radical alcooxila ($LO^{\cdot}$), bem como espécies não radiculares como o ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido lipídico ($LOOH$), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), entre outros (LI; TRUSH, 2016; ZHANG et al., 2016).

As ROS, podem ter origem no próprio organismo, derivadas dos processos metabólicos celulares (fonte endógena), como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e enzimas tais como as NAD(P)H oxidases ou a CP450, mas sua geração pode ser induzida também por fatores externos (fonte exógena), como as diferentes tipos e fontes de radiação, poluentes, compostos químicos e consumo de substâncias nocivas (LI; TRUSH, 2016; MASAKI, 2010).

Apesar da sua reatividade e toxicidade, as ROS não são totalmente vilãs, uma vez que desempenham, em alguns casos, papéis importantes na homeostase do organismo, e, em nível celular, estão envolvidas na regulação de algumas vias de sinalização, diferenciação, mas também na promoção de danos celulares e no apoptose (MITTLER, 2017). Não é de surpreender que seus níveis sejam intensamente regulados pelos diferentes sistemas de defesa antioxidantes celulares, para evitar que consequências indesejadas aconteçam como resultado das suas reações com biomoléculas. Embora geralmente agrupadas, as ROS são uma classe diversificada de moléculas com efeitos distintos nos componentes celulares. Consequentemente, sua influência nos processos celulares é complexa e eles têm efeitos tumorigênicos (HARRIS; DENICOLA, 2020).

As ROS, compostos altamente reativos, são a causa de mutações em várias espécies, dependendo do ambiente. Por esta razão, vários sistemas endógenos capazes de inibir ou transformar as ROS se desenvolveram com a evolução de mamíferos, para proteger as células (MASAKI, 2010). Os antioxidantes endógenos geralmente são descritos como uma enzima ou cofator que participam do processo de eliminação das ROS, sendo que o antioxidante endógeno mais abundante é o cofator metabólico glutathiona (GSH) (HARRIS;

DENICOLA, 2020). Existem vários tipos de sistemas antioxidantes endógenos em nível celular nos tecidos humanos, os quais possuem basicamente três formas de agir frente às ROS: (a) eliminação das ROS formadas diretamente; (b) inibição da sua formação a partir de suas fontes celulares; e (c) remoção ou reparação de danos ou modificações causadas (LI; TRUSH, 2016).

As consequências importantes do estresse oxidativo no envelhecimento cutâneo têm se tornado um objeto importante de estudos por um motivo especial, a constante produção ROS na pele, pela participação de produtos do metabolismo celular, resultantes da cadeia respiratória da mitocôndria, que resultam na produção da espécie ânion radical superóxido, ou mediante a contínua exposição da pele ao meio ambiente (LI; TRUSH, 2016).

1.4 O fotoenvelhecimento

O envelhecimento da pele é o culminar de fatores genéticos e ambientais, e é amplamente influenciado pelos danos acumulados causados pela exposição crônica à radiação ultravioleta (POON; KANG; L. CHIEN, 2015). Não é um processo que segue um padrão estabelecido, é influenciado pelo tipo de pele e etnia. O grau de fotoenvelhecimento também depende de fatores como a localização geográfica, grau da exposição solar, estilo de vida, assim como o uso de medidas preventivas, que incluem o uso de filtros solares, roupas de proteção e da sombra (HAN; L. CHIEN; KANG, 2014).

O fotoenvelhecimento descreve o conjunto complexo de alterações das características clínicas, histológicas e funcionais da pele, observadas de forma prematura nas diferentes áreas da pele, as quais continuamente tiveram um grau crônico de exposição à RUV (HAN; L. CHIEN; KANG, 2014). Consiste em danos crônicos predominantemente sobrepostos ao chamado envelhecimento cronológico ou intrínseco. O fotoenvelhecimento é responsável pela maior parte das alterações indesejadas na aparência da pele que ocorrem ao longo do tempo e, de igual forma, facilita a deterioração das capacidades tanto fisiológicas como protetivas das células (A GILCHREST, 2013).

As alterações dérmicas que acontecem com maior frequência devido ao dano excessivo causado pela radiação RUV são: hiperpigmentação, rugas e ressecamento da pele. Em particular, a pigmentação anormal das regiões e formação de rugas após a exposição à RUV se destacam como alguns dos fatores-chave no processo de fotoenvelhecimento (ROH et al., 2017).

1.5 Mecanismos do fotoenvelhecimento

A exposição prolongada da pele à RUV desencadeia uma série de mecanismos através dos quais se evidenciam as consequências clínicas do fotoenvelhecimento. As propriedades físicas da RUV facilitam sua penetração na pele e a interação com as células nas diferentes camadas da pele, epidérmica e dérmica, induzindo respostas biológicas distintas. Existem vários mecanismos que têm sido sugeridos para explicar o processo de envelhecimento dérmico, complementares entre si, e incluem a diminuição na proliferação das células dérmicas, a senescência celular, mutações no DNA mitocondrial, pouca eficiência na reparação do DNA, diminuição de telômeros e alterações cromossômicas (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

O dano causado pelas ROS nas macromoléculas aumenta na medida que o indivíduo envelhece e, proporcionalmente, também a capacidade de atenuação desse dano provocado diminui. As alterações que a MEC dérmica sofre em decorrência do envelhecimento da pele relacionam-se diretamente com o estresse oxidativo, pela ativação por parte das ROS de vias de transdução de sinal no citoplasma, as quais conseqüentemente favorecem à degradação do tecido conectivo (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

A radiação UV exerce um papel importante na produção de ROS, relacionado principalmente com o grau de exposição ao sol. A RUV provoca reações fotoquímicas em moléculas com grupos químicos fotossensíveis, que podem ser de dois tipos, as do tipo I, que implicam uma excitação e transferência de elétrons e, conseqüentemente, a geração de compostos radicalares, e as do tipo II, nas quais há transferência de energia para o oxigênio molecular (O₂)

resultando na formação do oxigênio singleto, $^1\text{O}_2$, interação que provoca rearranjos estruturais, quando estas espécies interagem com algumas moléculas bioativas, como os aminoácidos aromáticos e proteínas, como a melanina, NADH, NADPH, carotenoides, ácidos orgânicos e vitaminas (ONOUE et al., 2017; TEDESCO; MARTÍNEZ; GONZÁLEZ, 1997).

A relação entre a radiação UVA e UVB e seus efeitos no decorrer do fotoenvelhecimento e na fotocarcinogênese ainda estão sob estudo. No entanto, o que está claro é o tipo de respostas biológicas que são induzidas, devido ao grau de penetração da RUV nas diferentes camadas da pele (POON; KANG; L. CHIEN, 2015).

As ROS, produzidas após a exposição à radiação UV, ativam uma via de sinalização que é conhecida como a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), regulando positivamente esta via de transdução. MAPK têm um papel fundamental na regulação do crescimento celular e na formação de pró-colágeno I (ZHANG et al., 2016).

Dentre os vários fatores de transcrição que compõem esta via de sinalização está o complexo AP-1, formado pelos fatores c-Fos e c-Jun, que desempenha várias funções que facilitam a manutenção da homeostase da MEC dérmica, como a regulação de diversas metaloproteinases de matriz extracelulares (MMPs), como a MMP-1, que promove a degradação de colágeno fibrilar do tipo I e III, MMP-2 e MMP-9, que degradam fibras menores resultantes da ação das collagenases sobre o colágeno íntegro, assim como a MMP-3 que facilita a degradação do colágeno do tipo IV que faz parte da membrana, além de ativar a pró-MMP-1. Outros fatores de transcrição que estão envolvidos no processo são o Elk-1(ETS Like-1) e proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) (A COLE et al., 2018; MUKHERJEE et al., 2011)

A ativação do complexo AP-1, e o seu consequente aumento, induz indiretamente a diminuição na biossíntese de colágeno. O efeito do AP-1 leva à diminuição drástica dos níveis de expressão do regulador mais importante na síntese de colágeno, o receptor do fator de crescimento transformador β (TGF- β) do tipo II. Essa regulação negativa do TGF- β se dá possivelmente por meio

do aumento da proteína 61 rica em cisteína (CYR61), importante reguladora da síntese de colágeno, que é ativada pela RUV. A CYR61 superexpressa regula negativamente o receptor de TGF- β do tipo II e causa a ativação do fator de transcrição AP-1. AP-1 ativa a transcrição de MMP-1 e regula negativamente a expressão de pró-colágeno do tipo 1, que pode ser mediada pela trans-repressão de Smad3. Além disso, a regulação negativa do receptor de TGF- β do tipo II afeta diretamente os níveis de fosforilação do fator de transcrição Smad3, o que reduz a síntese de colágeno (POON; KANG; L. CHIEN, 2015; TAKAHASHI et al., 2017; HUANG et al., 2020). O estresse oxidativo não afeta exclusivamente as vias de expressão das enzimas que regulam os componentes da MEC e a síntese do colágeno, ele também causa um aumento significativo na liberação dos mediadores inflamatórios (DOBRZYŃSKA et al., 2016).

O aumento na concentração de ROS provoca a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, que por sua vez está associado com várias respostas biológicas. A função do NF- κ B é regular a expressão das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), assim como a dos fatores de necrose tumoral alfa (TNF α) e de crescimento epidérmico (EGF), um conjunto de fatores que incidem na iniciação do processo inflamatório na pele, o que aumenta a expressão da MMP-1. Outras enzimas, como a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) relacionadas com o fator NF- κ B, aumentam sua expressão bem como a da presença de óxido nítrico (NO), cujo papel está ligado ao processo de apoptose das células da pele e sua regulação (SAMPLE; HE, 2018)

As células da pele respondem aos danos produzidos pela inflamação e pelo estresse oxidativo entrando em um estado de cessação do crescimento e de alterações de suas funções (GU et al., 2020). Estas alterações são manifestadas pelo aparecimento do fenótipo secretor associado à senescência (SASP). O SASP inclui diversos compostos que consistem em fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas como a IL-6, a IL8 e o TNF α (de Magalhães e Passos, 2018; Rahimi et al., 2018). De forma conjunta, estes são os principais fatores envolvidos na etiologia do envelhecimento cutâneo (SALMINEN; KAARNIRANTA; KAUPPINEN, 2022).

1.6 Sistema antioxidante dérmico

A homeostase da pele é mantida pelo seu sistema antioxidante, que neutraliza as ROS e diminui os seus efeitos. À medida que a pele envelhece, seu sistema antioxidante também é afetado, comprometendo sua capacidade de controlar a abundante presença das ROS, o que causa o desequilíbrio redox e, como consequência, a capacidade natural da pele de se proteger é deteriorada (KAMMEYER; LUITEN, 2015c).

A resposta antioxidante é regulada por vários fatores celulares, um dos mais importantes é o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). No momento em que o fenômeno oxidante atinge a célula, o Nrf2 é liberado. Nrf2 se encontra associado, formando um complexo, com seu repressor, a proteína Keap1 do inglês *Kelch-like ECH-associated Protein 1* ou INrf2. Após sua liberação no citoplasma, o Nrf2 irá exercer o controle do equilíbrio redox, mediante indução da expressão de várias enzimas antioxidantes e desintoxicantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), assim como moduladores do metabolismo da glutathione, entre outras (ALTOBELLI et al., 2020).

O conjunto de compostos que são ativados pela via do Nrf2 fazem parte do sistema antioxidante endógeno da pele, o qual está composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No primeiro grupo se encontram enzimas como a CAT, a SOD, a glutathione peroxidase (GSH-px), a glutathione redutase (GR). Antioxidantes não enzimáticos presentes nas células são isoformas do α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, ubiquinol, glutathione (GSH) e ácido úrico (LEWANDOWSKI; KEPINSKA; MILNEROWICZ, 2018).

A resposta inicial do sistema antioxidante à presença das ROS, especificamente ao ânion radical superóxido, é a ativação da enzima SOD, considerada como a primeira linha de defesa contra estas espécies, pois é responsável pela conversão do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A SOD depende de co-fatores como cobre, manganês e zinco. Há uma distribuição das três diferentes isoformas da SOD nas células, a presente

na MEC é a SOD3 (CuZn-SOD), na mitocôndria encontra-se a SOD2 (Mn-SOD) e, finalmente, no citoplasma e no núcleo das células a SOD1 (EC-SOD) (ALTOBELLI et al., 2020; LEWANDOWSKI; KEPINSKA; MILNEROWICZ, 2018).

A manutenção da homeostase da pele é considerada uma das atividades mais importantes da SOD, o que a torna um dos fatores mais relevantes frente ao controle dos danos cumulativos provocados pela RUV e regulação de alguns processos inflamatórios. As consequências negativas causadas pela deficiência de enzimas da família SOD podem se manifestar desde o nível celular, como senescência, envelhecimento acelerado, danos mitocondriais, até em um nível macro, como a degradação de fibras elásticas e a perda de colágeno, manifestações que são visíveis na pele com a aparição dos sinais do envelhecimento (AGRAHARI et al., 2020).

O sistema antioxidante enzimático é uma rede que trabalha de forma cooperativa e sequenciada na eliminação de produtos tóxicos, sendo assim, inicialmente a SOD é ativada, eliminando seletivamente o ânion radical superóxido, e posteriormente outros produtos, como o H_2O_2 ou peróxidos orgânicos, são eliminados por diversas enzimas, como catalase e glutathione peroxidase (CHOI, 2019; GU et al., 2020; WANG et al., 2019).

Uma das vias de conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio está a cargo da enzima CAT. A enzima possui quatro cadeias polipeptídicas idênticas na sua estrutura, com um grupo heme cada uma. Descrita como uma reação de duas etapas, a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, se inicia por uma reação entre o peróxido de hidrogênio e o grupo heme, cujos produtos são uma molécula de água e o cátion radical oxoferril porfirina. A segunda etapa, é a reação do radical oxoferril do grupo heme com uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio, que tem como produtos água e oxigênio molecular e, finalmente o grupo prostético heme é regenerado (JANKOVIC et al., 2019). A decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular também pode acontecer por outras vias alternativas, a primeira pela ação da tioredoxina e a segunda pela glutathione peroxidase (CHOI, 2019; GU et al., 2020; WANG et al., 2019).

Como parte do sistema antioxidante cutâneo não enzimático, destaca-se a glutathione (GSH) como o principal agente. A inibição das ROS por parte da GSH implica na sua ação como co-fator da GSH-px para dar início à conversão do peróxido de hidrogênio em substâncias menos oxidantes, como água e oxigênio molecular. Durante esta conversão catalítica, por meio de uma ligação dissulfeto a GSH é oxidada e liga-se a outra GSH para formar a glutathione oxidada (GSSG) que é um dímero intermediário. A GSH pode ser regenerada, por ação da redução catalisada pela glutathione redutase que age rompendo a ligação do dímero GSSG (CHOI, 2019; GU et al., 2020; WANG et al., 2019).

Entre as camadas da pele, existe uma diferença na capacidade antioxidante, dependente da concentração tanto de compostos enzimáticos como não enzimáticos em cada camada. No tecido dérmico mais jovem e, especificamente, na camada epidérmica da pele humana é encontrada uma maior atividade tanto das enzimas CAT, glutathione redutase e glutathione peroxidase como dos antioxidantes não enzimáticos, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e glutathione, do que na camada dérmica (ALBINI, 2020; CHOI, 2019; GANCEVICIENE et al., 2012).

Qualquer um dos tipos de envelhecimento cutâneo provoca o decaimento das concentrações das moléculas antioxidantes e, como consequência, o sistema antioxidante irá apresentar menor eficiência tanto da epiderme quanto na derme. A deterioração da atividade enzimática torna-se progressiva, diminuindo conforme a pele envelhece. De igual forma os níveis de vitamina C, vitamina E e glutathione são afetados pelo envelhecimento (ALBINI, 2020; CHOI, 2019; GANCEVICIENE et al., 2012).

O equilíbrio redox nas células envolve a ação coordenada dos vários mecanismos de proteção antioxidante para seu adequado funcionamento. A perda da funcionalidade dos seus elementos, como consequência dos fatores extrínseco ou intrínseco, e em função do desequilíbrio redox, é o sinal característico e o fator mais relevante no processo de envelhecimento (DOBRZYŃSKA et al., 2016, 2018). Desta forma, identificar as vias, assim como os mecanismos que regulam o sistema antioxidante, que favorecem a regulação da expressão e atividade enzimática, assim como a integração dos componentes

não enzimáticos ao mesmo, poderá facilitar a integração de novas substâncias de origem natural capazes de estimular estes processos, com o objetivo de mitigar ou controlar os danos cumulativos causados pelas ROS nas células (LONGO, 2016; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI; NIKOLAKIS, 2019).

1.7 Produtos naturais contra o fotoenvelhecimento - fotoquimioproteção

A fotoquimioproteção é termo designado para definir o uso de agentes, especialmente antioxidantes de origem natural, capazes proteger contra os danos ou de reverter os efeitos adversos da radiação UV, e representa uma estratégia realista para controlar a incidência do fotoenvelhecimento e outras patologias na pele (KOSTYUK et al., 2018)

As plantas superiores, assim como vários outros organismos, como as micro e macroalgas, corais, entre outros organismos marinhos, são capazes de sintetizar dois tipos de metabolitos, os primários, essenciais para garantir sua sobrevivência, e os metabólitos secundários (ZAYNAB et al., 2018, 2019). A função dos metabólitos secundários não está diretamente associada aos processos vitais da planta, ou outros organismos, como o crescimento, divisão e propagação, mas desempenham um papel essencial na transdução de sinais, coordenação das funções celulares, assim como na sua defesa e proteção, como também são necessários na adaptação às mudanças contínuas (estresses) que acontecem nas condições externas tanto bióticas como abióticas (ISAH, 2019). Por estas razões, cada espécie é capaz de produzir uma série única destes compostos ou em outras palavras, um perfil fitoquímico característico de metabolitos secundários (YANG et al., 2018).

Existe uma grande variedade de metabólitos secundários que são sintetizados pelas plantas, alguns destes podem interagir com a RUV, embora de maneira diferente. Entre diversos compostos fotoquimioprotetores, antioxidantes fitoquímicos, pertencentes a diferentes classes de metabolitos secundários, aparecem como alternativa promissora em razão de seus efeitos fotoprotetores, que incluem: (i) absorção direta da radiação UV; (ii) inibição da inflamação crônica, (iii) modulação da imunossupressão, (iv) indução de

apoptose, (v) atividade antioxidante direta (sequestro de ROS); e (vi) atividade antioxidante indireta (indução de respostas citoprotetoras intrínsecas) (KOSTYUK et al., 2018).

1.8 Espécie vegetal sob estudo - *Vaccinium macrocarpon* Aiton.

1.8.1 Aspectos botânicos

Cranberry pertencente ao gênero *Vaccinium*, com cerca de 450 espécies, e à família Ericaceae (EDWARDS et al., 2015).

A família Ericaceae possui espécies bem distribuídas em regiões pertencentes a países da Europa, América do Norte, América Central, numa pequena região do Sudeste e no centro da África, Madagascar, Japão e Ásia. *Cranberry* é geralmente considerado como uma espécie do gênero *Vaccinium*, que possui 22 espécies distribuídas em territórios correspondentes à América do Norte, Columbia Britânica e Canadá (SANDLER; DEMORANVILLE, 2008 ;BROWN et al., 2012).

O *cranberry* americano, *Vaccinium macrocarpon* Aiton. é uma espécie botânica nativa da América do Norte. Encontra-se especificamente em algumas regiões dos Estados Unidos e Canadá, e é também encontrada e cultivada em países como o Reino Unido, Bélgica, Canadá, Alemanha e na América do Sul, no Chile (BROWN et al., 2012) (THE ROYAL BOTANIC GARDENS, 2020).

Possui vários sinônimos botânicos aceitos: *Oxycoca macrocarpa* (Aiton) Raf, *Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pers., *Oxycoccus palustris* var. *macrocarpos* (Aiton) Pers., *Schollera macrocarpa* (Aiton) Steud., *Schollera macrocarpos* (Aiton) Britton (THE PLANT LIST, 2020; TROPICOS, 2020). O nome *cranberry* vem dos primeiros alemães e holandeses, como consequência da semelhança entre a flor e à cabeça e bico do pássaro guindaste (*crane bird*) (KOUR; BAKSHI; SHARMA, 2019).

A planta é descrita como um arbusto lenhoso, perene, rasteiro, de caule fino, geralmente apresenta uma altura máxima dentre 15 e 25 cm, com aparência emaranhada, com folhas pequenas com um tamanho de 0,8-1,3 cm, oblongas e

alternadas no caule (STANG. ELDEN, 1993). Tende a formar uma camada como consequência da agrupação dos galhos e ramos (EDWARDS et al., 2015; SANDLER; DEMORANVILLE, 2008). O sistema radicular da planta é fibroso, sem pelos radiculares, caracteristicamente superficial, com uma profundidade de 2,5 a 7,5 cm (STANG. ELDEN, 1993).

As flores do *cranberry* apresentam cores rosa e branco, os ramos de flores tornam-se visíveis durante o verão ou início do outono. Cada um dos ramos chega a conter entre duas a sete flores, além de folhas e um ponto de crescimento. O período de dormência finaliza em abril e as novas folhas começam seu desenvolvimento no final de maio. Em meados do mês de junho, o período de floração inicia e dura de três a seis semanas. Os primeiros frutos são visíveis no final de junho ou início de julho (SANDLER; DEMORANVILLE, 2008).

As plantas do *cranberry* possuem tanto flores femininas como masculinas, e por tal motivo é considerada hermafrodita, capaz de se auto fertilizar. Em outras palavras, o pólen da flor masculina pode fertilizar o óvulo da mesma flor feminina. A agitação ou o vento podem levar à polinização bem sucedida, mas, geralmente, em taxas muito baixas. Assim, a maioria dos produtores utilizam insetos como as abelhas abelhões, a fim de aumentar as possibilidades de fertilização (SANDLER; DEMORANVILLE, 2008).

Os frutos exibem uma forma esférica, inicialmente são de cor verde mudando posteriormente a vermelho na etapa madura. No seu interior são ocos, com diâmetro de 1 a 2 cm. O fruto atinge a maturidade cerca de 80 dias após a floração. Normalmente a colheita se inicia no final do mês de agosto e é finalizada ao início de novembro (SANDLER; DEMORANVILLE, 2008; STANG. ELDEN, 1993).

No Brasil, o fruto desta planta é conhecido comumente com os seguintes nomes: uva-do-monte, mirtilo-vermelho ou oxicoco (LOPES DA FONSECA; BRÁS DE OLIVEIRA, 2007).

Alguns relatos históricos do século XVII registraram o uso etnobotânico do fruto do *cranberry* no tratamento de infecções do trato urinário pelos nativos americanos. Este era consumido como alimento e também usado para o

tratamento de feridas e de coágulos (ZHAO; LIU; GU, 2020). Algumas tribos da América do Norte, como a Algonquin, Chippewa, Ojibwa e Iroquois, os consumiam em alimentos cozidos, secos, misturados com pão a base de milho, e os utilizavam também no comércio (BROWN et al., 2012).

Na década de 80, o interesse pelos possíveis benefícios para a saúde do fruto do *cranberry* se tornou mais intenso, e desta forma, diversas pesquisas e estudos foram iniciados a fim de entender seus efeitos biológicos. Além dos frutos, as folhas também possuem uso para distúrbios urinários, diarreia e diabetes. O *cranberry* é consumido na forma de frutas frescas ou secas maduras, como suco da fruta, ou em preparações líquidas e também em cápsulas (EDWARDS et al., 2015).

1.8.2 Composição Fitoquímica

O perfil fitoquímico do *cranberry* é complexo e variado. Destacam-se principalmente as proantocianidinas (PACs), grupo de polifenóis representativo desta espécie botânica, cuja estrutura base se representa como $C_6-C_3-C_6$, do tipo A, cuja presença é majoritária, e as tipo B, também chamadas taninos condensados ou poliflavan-3-óis (C NETO; A VINSON, 2011; DÉZIEL et al., 2010; VAN DOOREN et al., 2018). As PACs encontradas no *cranberry* são diversas, devido a características relacionadas à sua estrutura química, tipo de ligação e grau de polimerização. As do tipo A possuem na sua estrutura química uma ligação interflavana adicional ($C_2 \rightarrow O \rightarrow C_7$) ou ($4\beta \rightarrow 8$ ou $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$) tipo éter, e para as do tipo B uma ligação carbono-carbono ($4\beta \rightarrow 8$), os dois tipos de ligações ocorrem entre moléculas de epicatequina (C NETO, 2007; KANDIL et al., 2002; ZHAO; LIU; GU, 2018; GUDŽINSKAITĖ et al., 2020).

Outros compostos fitoquímicos presentes no fruto do *cranberry* são, antocianinas, relacionadas com a pigmentação própria do fruto, de cor vermelha. Tanto seu perfil fitoquímico como o teor de antocianinas são particulares, o que as torna o marcador biológico da espécie. Estudos realizados por Prior e colaboradores (PRIOR et al., 2001; NEMZER et al., 2022) contribuíram na identificação e quantificação das antocianinas características do fruto,

confirmando assim a presença de peonidin-3-O-galactosídeo, cianidin-3-O-galactosídeo, cianidin-3-O-arabinosídeo, peonidin-3-O-arabinosídeo e em menor concentração, cianidin-3-O-glucosídeo e petunidin-3-O-galactosídeo, resultados ratificados posteriormente por Brown e Shipley (N. BROWN; R. SHIPLEY, 2011).

Os compostos do grupo flavonol existem sob as formas monoméricas conjugadas com um número variado de cadeias de açúcar. São um grupo de metabólitos também encontrados em *V. macrocarpon* e incluem quercetina (aglicona), quercetina 3-O-galactosídeo (hiperina, mais abundante), quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina); e miricetina 3-O-arabinosídeo e 3-O-digalactosídeo (KANDIL et al., 2002). A quercetina-3-O-galactosídeo e quercetina-3-O-arabinosídeo foram isolados e posteriormente suas estruturas foram identificadas mediante técnicas HPLC e GC-MS (CHEN; ZUO, 2007).

Análises da farinha do *cranberry* identificaram miricetina-3- β -xilopiranosídeo, quercetina-3- β -glicosídeo, quercetina-3- α -arabinopiranosídeo, 3'-metoxiquercetina-3- α -xilopiranosídeo, quercetina-3-O-(6"-p-cumaroil)- β -galactosídeo e quercetina-3-O-(6"-benzoil)- β -galactosídeo. Da mesma forma foi identificada uma classe diferente que conjuga flavonol, açúcar e ácido carboxílico (ácidos benzóico ou hidroxicinâmico), a quercetina-3-O-(6"-p-coumaroil)- β -galactosídeo e a quercetina-3-O-(6"-benzoil)- β -galactosídeo, e mostraram uma maior abundância de quercetina seguida da miricetina e o kaempferol (RAGHAVAN; RICHARDS, 2006; VVEDENSKAYA et al., 2004). Esses compostos são de cor amarela e estão associados ao período inicial do desenvolvimento tanto das flores como dos frutos (VVEDENSKAYA; VORSA, 2004).

Em estudos desenvolvidos recentemente por Wang e colaboradores, 2017, e Wang e colaboradores, 2019, foram isolados e caracterizados durante o desenvolvimento do fruto, novos compostos presentes tais como quercetina-3-o-glucosídeo, quercetina-3-xilopiranosídeo, quercetina-3-arabinopiranosídeo, quercetina-3-arabinofuranosídeo, quercetina-3-ramnopiranosídeo, quercetina-hexosídeo, quercetina-pentosídeo, quercetina-metil-pentosídeo além de miricetina-3-galactosídeo e miricetina-3-arabinofuranosídeo (WANG et al., 2017;

WANG, 2020). Santana e colaboradores reportaram a identificação da quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) (SANTANA et al., 2018).

A determinação da presença no *cranberry* do grupo de flavonoides conhecidos como flavan-3-ol mostrou a epicatequina como um dos compostos em abundância (Harnly et al., 2006). O *cranberry* apresenta também teor mais alto de monômeros (catequina + epicatequina) que outras espécies, como *blackberry*, *red raspberry* e *blueberry* (Gu et al. 2004). Foi confirmada a presença das formas de catequina (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina, (-)-epicatequina, assim como a presença de um dímero por Kowalska e colaboradores, Moraes e Wang e colaboradores (KOWALSKA et al., 2017; MORAES, 2018; WANG et al., 2016), assim como galocatequinas (C NETO, 2007). Santana e colaboradores reportaram a presença galato epicatequina (SANTANA et al., 2018). Michalaska e colaboradores reportaram a separação dos dímeros de procianidina (MICHALASKA et al., 2018).

Como muitas plantas, no *cranberry* também há presença de ácidos fenólicos e outros ácidos orgânicos, os dois mais comuns e principais são o ácido benzoico e o ácido *p*-cumárico (4-hidroxicinâmico) (DAO; PATEL; NETO, 2012), ácido bezocarboxílico e o ácido ascórbico também foram detectados (ČESONIENĚ; DAUBARAS, 2016). Também foram encontrados no fruto do *cranberry* ácido quínico, ácido málico, ácido cítrico e ácido benzóico (WANG et al., 2017; WANG, 2020). Numa fração do suco de *cranberry* combinado com maltodextrina a 15%, da qual previamente foram removidos os açúcares presentes no fruto seco, foram identificados, mediante a técnica LC-PDA-MS, ácido clorogênico, *p*-cumaroil hexose e cafeoil hexose (MICHALASKA et al., 2018).

A presença de terpenos tem sido mostrada numa série de compostos, tais como ácido oleanólico, ácido ursólico, cis-3-O-*p*-hidroxicaminoil ursólico, ácido trans-3-O-*p*-hidroxicamoil, ácido ursólico, β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucosídeo (HE; LIU RUI, 2006; KONDO et al., 2011), monotropeína, 6,7-di-hidromonotropeína (JENSEN et al., 2002), 10-*p*-cis-coumaroil-1S-di-hidromonotropeína e 10-*p*-trans-coumaroil-1S-di-hidromonotropeína (TURNER et al., 2007). A presença de carotenos no fruto foi reportada por Curl (CURL, 1964).

Ácidos fenólicos, derivados de ácidos hidroxicinâmicos, foram identificados por He e Rui (HE; LIU RUI, 2006); catequinas e flavonóis por Neto

e Zhao, Liu e Gu (C NETO, 2007; ZHAO; LIU; GU, 2018), e triterpenoides, derivados do tipo ursano, identificados por Kondo e colaboradores (KONDO et al., 2011).

Os esteróis, comuns em vários tipos de plantas, também já foram detectados no *cranberry*, como β -sitosterol, β -sito-esterol-3-O e β -D-glucosídeo, assim como o composto 3,5,7,3',4'- pentahidroxiflavanol-3-O- α -L-arabinofuranosídeo (HE; LIU RUI, 2006).

As sementes do *cranberry* já foram classificadas como uma fonte rica em ácido linoleico, além da presença das formas β - e γ -tocoferol (RAGHAVAN; RICHARDS, 2006).

Alguns outros compostos que podem se encontrar no fruto do *cranberry* são a luteína, niacina, ácido pantotênico, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), adermina (vitamina B6), ácido fólico (vitamina B9), β -caroteno e α -tocoferol, assim como oligossacarídeos possuindo vários graus de polimerização (DUKE, 2017; PAPPAS; SCHAICH, 2009; WANG, 2020). Análises de identificação química adicionais (por GC-MS e NMR) revelaram a presença de xiloglucano e arabinano (SUN et al., 2015).

1.8.3 Ações biológicas

O consumo do fruto do *cranberry* ao longo da história tem sido associado com múltiplos benefícios para a saúde. Mais recentemente, estudos que têm mostrado seu potencial biológico relacionado com a sua capacidade na prevenção de inúmeras doenças, sua alta capacidade antioxidante, baixa toxicidade, bem como a ausência de respostas indesejadas (ZHAO; LIU; GU, 2020).

Um dos usos mais destacados do *cranberry* é no tratamento de infecções urinárias, e um dos primeiros registros que existem do uso medicinal do *cranberry* foi exatamente no tratamento de doenças dos rins e na bexiga pelos nativos americanos (SHAHEEN; NOREEN, 2016). Alguns dos relatos que remontam ao século XVII, destaca o uso tradicional do *cranberry* no tratamento

de feridas e de envenenamento do sangue, causado por bactérias (STANG. ELDEN, 1993).

As pesquisas e evidências relacionadas com os benefícios do consumo de *cranberry* pra saúde, assim como o uso e a aplicação do *cranberry* nas suas diferentes apresentações, iniciou na década de oitenta, com um crescimento contínuo, embora mais intenso nas últimas duas décadas e meia, devido, em grande parte, ao seu perfil fitoquímico, que é considerado como uma fonte de moléculas com um diverso potencial biológico, capazes de agir frente a vários tipos de patologias (ZHAO; LIU; GU, 2020), dando ao *cranberry* uma perspectiva promissora de aplicações futuras, pelas suas possíveis contribuições para a saúde humana.

Ao longo dos últimos 25 anos, diversos estudos têm avaliado o efeito, tanto *in vivo* como *in vitro*, desta espécie de *cranberry*, presente na dieta ou aplicado como tratamento, nas infecções urinárias, tais como cistite, pielonefrite ou síndrome uretral, que são um tipo de infecções bacterianas bastante comuns e que afetam uma grande parte da população no mundo (VASILEIOU et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O extrato hidroalcóolico do própolis (P) combinado com extrato aquoso do *cranberry* (C) foram testados para avaliar sua capacidade de diminuir a motilidade e inibir a formação do biofilme de uma série de 12 de cepas da *E. coli* uropatológica (ECUP), e foi mostrado que a combinação (C+P) possui uma capacidade significativamente melhor ao diminuir as duas variáveis nos tempos de tratamento de 2 e 5 horas, do que quando aplicados separadamente (RANFAING et al., 2018).

A fração rica em carboidratos e livre de compostos fenólicos (cranf1b-F2) reduziu a produção de biofilme da cepa patogênica de *E. coli* CFT073 em mais de 50%, na concentração de 1,25 mg/mL, mas não inibiu o crescimento microbiano. Também inibiu a formação do biofilme da cepa não patogênica de *E. coli* MG1655 em aproximadamente 60%, de forma dose dependente, nas concentrações de 0,625 a 10 mg/mL. Esses resultados sugerem que não só os metabólitos de origem fenólica de *cranberry* possuem atividade, mas também os

oligossacarídeos podem apresentar efeitos preventivos contra infecções do trato urinário (SUN et al., 2015).

A determinação da liberação de flavonóis glicosídeos e flavonoides, assim como de seus metabólitos, na urina de mulheres identificou e quantificou cinco flavonóis glicosídeos, embora as concentrações dos compostos detectadas foram relativamente baixas para bioatividade significativa no trato urinário. Esses resultados demonstram que estes metabólitos podem ser absorvidos no sistema circulatório humano e excretados pela urina de forma intacta, o que poderia contribuir com a saúde, porém é desconhecido a sua distribuição no resto dos órgãos (WANG et al., 2016).

Em condição clínica de infecção do trato urinário, o consumo de produtos de *cranberry* reduziu significativamente a incidência de infecções, conforme indicado pela razão de risco ponderada (0,6750, 95% IC 0,5516-0,7965, $p < 0,0001$). Os resultados mostraram que os pacientes com algum risco de infecções recorrentes no trato urinário eram mais suscetíveis aos efeitos benéficos da ingestão de *cranberry*, podendo reduzir a administração de antibióticos, o que poderia ser benéfico ao impedir o aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos (LUÍS; DOMINGUES; PEREIRA, 2017).

O tratamento com 36 mg do princípio ativo proantocianidinas (PACs), iniciado em trinta e quatro pacientes com infecções do trato urinário associadas a uso de cateter (CA-ITU), e concluído por 22 pacientes mostrou que o *cranberry* foi eficaz na redução do número de CA-ITUs sintomáticos em todos os pacientes. A resistência aos antibióticos foi reduzida em 28%. Além disso, as contagens de colônias foram reduzidas em 58,65%. Nenhum sujeito teve eventos adversos enquanto tomava *cranberry* (THOMAS et al., 2017).

O estudo num modelo experimental de infecção do trato urinário (ITU) em camundongos, tratados com a fração aquosa do suco natural de *cranberry* fresco, comercial, mostrou que as contagens de *E. coli* encontradas na bexiga de camundongos tratados foram reduzidas. O mesmo efeito foi exibido por alguns ácidos (quínico, málico, shiquímico e cítrico) presentes no suco, e as combinações de ácido málico/ácido cítrico e ácido málico/quínico tiveram maior efeito, mostrando que os compostos do fruto podem controlar a avanço

bacteriano nas infecções do trato urinário em modelos murinos (JENSEN et al., 2017).

A meta-análise feita por Roshdinonab e colaboradores mostrou que a prescrição de *cranberry* reduziu significativamente as chances de manifestação de ITU em crianças em comparação com o placebo. De forma paralela, foi observado que existe um grau de semelhança com efeito do tratamento com antibióticos. Na análise foram incluídos 10 estudos (414 casos no grupo de controle e 380 no grupo de tratamento com extrato de *cranberry*) (ROSHDIBONAB et al., 2017).

O tratamento de camundongos por 35 dias com doses de PACs de 11 mg/kg de PAC-A e 4 mg/kg de PAC-B, monitorado por cromatografia (UPLC-MS) para avaliação da presença de metabolitos como ácido valérico e derivados de valerolactona, assim como compostos glucuronidados, na urina dos camundongos mostrou que a atividade antibacteriana foi determinada em amostras de urina coletadas 2, 4, 8 e 24 horas após a ingestão. A maior atividade foi observada depois de 8 horas. A composição da urina foi determinada por (UPLC - QTOF), e foi encontrada a presença de PACs (ng/mL) após 4 h. Os autores sugeriram que a atividade antiadesiva pode estar relacionada aos produtos do metabolismo da PAC-A em vez de um efeito direto (PERON et al., 2017).

Um estudo avaliou a ingestão de cápsulas de *cranberry* ou placebo, diariamente, por pacientes do sexo feminino, com 60 anos ou mais, com fratura de quadril e cateter urinário (n = 227) do pré-operatório, desde a admissão até 5 dias de pós-operatório. As amostras de urina foram coletadas na admissão, 5 e 14 dias de pós-operatório. As análises mostraram que não houve diferença entre os grupos, sugerindo que o *cranberry* concentrado não previne infecções do trato urinário neste tipo de pacientes (GUNNARSSON et al., 2017).

Algumas das várias evidências dos efeitos biológicos que possui o *cranberry* como agente anti-inflamatório foram revisadas por Neto e colaboradores (C Neto, 2007), que destacaram e relacionaram a capacidade anti-inflamatória com os diferentes tipos de compostos fitoquímicos que estão presentes no fruto, além de mencionar que as evidências descritas provêm de

estudos que não envolvem modelos de câncer. Dentre os efeitos descritos encontram-se a inibição da expressão da COX-2 pelos polifenóis do cranberry, observado em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos, com produção induzida de citocinas inflamatórias IL-1b, IL-6 e IL-8 e TNF- α (C NETO, 2007).

Alguns estudos realizados por Caldas et al., 2018, mostram-se promissórios ao relatar algumas evidências do efeito regulatório do cranberry na expressão da COX em células de câncer de cólon, mostrando a possibilidade de existência de um efeito inibitório da COX-2 associado aos compostos químicos presentes no cranberry, como a quercetina e o ácido ursólico, os quais em estudos descritos durante a revisão publicada em 2018, foram descritos com ação como inibidores da expressão de COX em modelos celulares (CALDAS; COELHO; BRESSAN, 2018a). Além disso, o trabalho de Pappas e Schaich (PAPPAS; SCHAICH, 2009) mostrou que também poderia existir uma ação anti-inflamatória devida a triterpenos presentes no cranberry. Um outro composto com ação anti-inflamatória presente no fruto é o resveratrol (CALDAS; COELHO; BRESSAN, 2018). Caldas e colaboradores destacaram ações na sinalização celular, como o bloqueio ou regulação negativa dos receptores e fatores de transcrição, que têm como consequência uma menor expressão dos genes pró-inflamatórios, incluindo interleucinas e receptores *Toll-like* (TLR)-4, NF- κ B, proteína ativadora (AP-1), e JNK, ou ação como um ligante natural para o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ).

Como reguladores de diversas funções importantes da pele os PPARs têm sido considerados alvos terapêuticos potenciais para doenças deste órgão. Os receptores nucleares são importantes para manutenção da função de barreira e relacionados a regulação de mecanismos moleculares que controlam a resposta inflamatória, cicatrização assim como do envelhecimento cutâneo (MAJEWSKI; CRAW; FALLA, 2021).

Algumas das vias de resposta inflamatória descritas previamente são expressas na pele quando a radiação ultravioleta a atinge, causando o aumento nos níveis basais de estresse. Assim, é de grande interesse identificar se existem efeitos mediados pelo cranberry que diminuam as respostas nas vias tanto de sinalização celular como de expressão de genes pró-inflamatórios em células da

pele danificas pela RUV, com o objetivo de prevenir ou de reverter o dano causado pelo fotoenvelhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito fotoquimioprotetor do extrato de oxicoco (*Vaccinium macrocarpon* Antion) em cultura de fibroblastos dérmicos humanos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato total de *cranberry* e suas frações acetato de etila e aquosa em cultura de fibroblastos e células HeLa.
- Avaliar o teor de polifenóis e flavonoides do extrato e suas frações.
- Avaliar qualitativamente o perfil químico do extrato por HPLC.
- Determinar a atividade antioxidante do extrato pelos métodos de DPPH e inibição da peroxidação lipídica.
- Avaliar o efeito do extrato e frações no nível intracelular de espécies reativas de oxigênio na cultura de fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo.
- Avaliar o efeito do extrato e suas frações na atividade antioxidante das células por meio de avaliação de atividade da catalase, atividade da SOD, níveis de superóxido e peroxidação lipídica na cultura de fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo.
- Avaliar a atividade das frações e do extrato total frente às diferentes isoformas dos receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais
- Avaliar quantitativamente a influência do extrato na expressão gênica de MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, COL1A1, PPAR α nos fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo.
- Avaliar o efeito do extrato e suas frações na síntese de colágeno em cultura de fibroblastos induzidos ou não ao estresse oxidativo e no processo de cicatrização simulado pelo *scratch* teste

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A matéria-prima, farinha do fruto seco de *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*), foi adquirida da empresa Verdenutri/SP, e doada para este estudo pela professora Dra. Maria Jose Vieira Fonseca, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

4.2 Obtenção do extrato bruto e fracionamento

O método para a obtenção do extrato etanólico consistiu em submeter 200 g do material do fruto seco do *cranberry* à extração líquida em etanol (EtOH) 80%, sob agitação de 80 rpm por 5 h a 40°C. A proporção de planta:solvente utilizada na extração foi de 1:3 m/v (MORAES, 2018).

O extrato total de *cranberry* obtido foi filtrado em papel de filtro Whatman número 1, para eliminação dos resíduos da farinha dos frutos secos, e foi seco por evaporação sob pressão a 40°C. Uma quantidade do extrato obtido foi pesado e ressuspendido em água destilada na proporção (1:3, m/v). O extrato ressuspendido foi fracionado por partição líquido-líquido com acetato de etila na proporção (1:1) e os extratos obtidos foram secos, por rotaevaporação, posteriormente liofilizados, e finalmente pesados.

4.3 Avaliação do teor de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides foi realizada pelo método do cloreto de alumínio, de acordo com o descrito por CHIANG e colaboradores (2012). Neste ensaio, 50 µL de solução das frações e do extrato ressuspendido em metanol foram adicionadas a 500 µL de solução metanólica de AlCl₃ a 5%, e o volume final do meio de reação foi completado para 2,5 mL com metanol. A mistura foi

agitada em vórtex e incubada à temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos. Após o período de incubação foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão) a 425 nm. Como padrão foi utilizada a quercetina e os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina por massa de extrato ($\mu\text{g EQ.mg de extrato}^{-1}$)

4.4 Avaliação do conteúdo de fenóis totais

A quantificação de polifenóis totais foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, adaptado de SINGLETON e ROSSI(1965). Para isso, 100 μL das soluções tanto do extrato como das frações foram misturados com 100 μL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 10% e 100 μL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 1 N. O volume final de reação foi completado para 2 mL com água destilada e a mistura foi agitada, com agitador tipo vortex. Após 60 minutos, as absorbâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão) a 760 nm. Como padrão foi usado o ácido gálico e os resultados foram expressos em termos dos equivalentes de ácido gálico (EAG), $\mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$.

4.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de quantificação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.

A determinação da inibição da peroxidação lipídica foi determinada modificando o método descrito por HAZZIT e colaboradores (2006). Previamente, foi preparada uma emulsão (10%) com gema de ovo em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4. A seguir foram misturados 1 mL da emulsão de gema de ovo com 100 μL do extrato, nas concentrações finais de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em água destilada, à temperatura ambiente, e finalmente agitados por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado o α -tocoferol (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A indução da peroxidação lipídica foi provocada pela adição de 100 μL de solução de sulfato de ferro (0,07 M). A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C.

Após o período de incubação, uma alíquota de 500 µL de cada amostra foi misturada com 1000 µL de solução de ácido tricloroacético a 15% e centrifugadas por 15 minutos, a 1,2 xg (4000 rpm) e 23°C, em seguida 500 µL do sobrenadante foram misturados a 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. A mistura foi aquecida a 95°C durante 30 minutos. Após o resfriamento, as absorbâncias foram determinadas a 532 nm em espectrofotômetro (EnSpire Multimode Plate Reader-Perkin Elmer).

4.6 Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico do cranberry pelo método do DPPH·

A capacidade antioxidante do extrato foi determinada pela inibição do radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com o método descrito por (BLOIS, 1958), modificado por CHIANG e colaboradores (2012). No ensaio foram utilizadas concentrações de extrato entre 50 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹ e para os padrões de 0,2 µg.mL⁻¹ até 10 µg.mL⁻¹. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (EnSpire Multimode Plate Reader-Perkin Elmer) no comprimento de onda de 517 nm. Foram escolhidos o ácido ascórbico, a quercetina e o butilhidroxitolueno (BHT) como padrões. A porcentagem de inibição do radical DPPH· foi calculada de acordo com a equação abaixo e os resultados foram expressos pelo IC₅₀.

$$\%Inibição = \frac{Absorbância\ do\ controle - Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ controle} \times 100$$

Equação 1. Equação para o cálculo da porcentagem de inibição do DPPH·

4.7 Cultura de fibroblastos dérmicos humanos (HFF-1)

Fibroblastos dérmicos humanos (*Human Foreskin Fibroblasts*, HFF-1), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram utilizados para avaliar os efeitos do tratamento com o extrato bruto sobre parâmetros

importantes para a manutenção da homeostase da derme humana. Células HeLa, linhagem derivada de tumor cervical uterino, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram utilizadas para o ensaio de transfecção transiente e ensaio de gene repórter. Ambos os tipos de células foram cultivados no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina. As placas com as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa (UR) de 95% e temperatura de 37°C.

4.8 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e HeLa tratadas com o extrato de *cranberry*

A viabilidade celular das células tratadas com o extrato foi avaliada através do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], descrito por MOSMANN (1983). Fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados em cada poço de uma placa de 96 poços na concentração 5x10³ células e para as células HeLa de 1x10⁴ células. Em seguida o tratamento dos fibroblastos foi realizado com o extrato total e frações do extrato de *cranberry* nas concentrações de 6,25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹. Após incubação por 24 h ou 48 h (37°C / 5% CO₂ / 95% UR), o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 µL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas e, posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução 0,04 M de HCl em isopropanol para dissolução dos cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Beckman DTX 800).

De igual forma foi determinado o efeito do tratamento após a irradiação da cultura de fibroblastos dérmicos humanos, para o qual foram utilizadas as concentrações de 6,25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹ de extrato. Os tempos de análise da viabilidade celular foram 1 h, 24 h e 48 h depois da exposição das células à radiação UVA (10 J.cm⁻²) para indução do estresse oxidativo. Para a irradiação das células, o DMEM foi substituído com PBS. Após a irradiação, as placas de 96 poços foram removidas da câmara de

irradiação e o PBS foi substituído por 100 μL de meio DMEM com tratamento e as placas foram incubadas a 37°C, 5% CO_2 e 95% UR pelos períodos de tempo pré-estabelecidos. Ao término deste período o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 μL de DMEM e 10 μL de solução de MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas e, posteriormente, foram adicionados 100 μL de solução 0,04M de HCl em isopropanol para dissolução dos cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Beckman DTX 800).

4.9 Tratamento das culturas de fibroblastos dérmicos humanos para os ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase e peroxidação lipídica.

O tratamento das células HFF-1 foi realizado após o período de 48 horas, pois os resultados prévios do ensaio de MTT mostraram que o tratamento com o extrato teve uma capacidade de proteção contra citotoxicidade promovida pela irradiação com UVA nas células da pele neste período de tempo. Além disso, alguns dos efeitos provocados pela radiação UVA são progressivos e continuam chegando ao seu máximo cerca de 48 horas após a indução do estresse (ALGE-PRIGLINGER et al., 2009; BRENNEISEN et al., 1997)

Para a realização dos ensaios de avaliação da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e avaliação da peroxidação lipídica, fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração de 2×10^5 células em cada poço de uma placa de 6 poços e as células foram tratadas por 48 horas com as concentrações de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato ou frações do extrato de *cranberry*, após a irradiação. A indução do estresse oxidativo foi provocada por meio da irradiação das células com lâmpada ultravioleta (UVA, 10 J/cm^2) (DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2018). Após este período, 2 mL de meio DMEM ou DMEM com tratamento foram adicionados às células e estas foram incubadas por 48 horas (37°C/ 5% CO_2 / 95% UR). Ao término deste período, as células foram recolhidas e submetidas aos procedimentos experimentais de cada um dos ensaios.

4.10 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A avaliação da atividade da enzima SOD foi realizada pelo método bioquímico que utiliza o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de ($O_2^- \cdot$), e a redução do reagente *nitroblue tetrazolium* (NBT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), como indicador.

Fibroblastos dérmicos humanos tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento em temperatura ambiente (TA) para obtenção do lisado celular.

Uma solução de NBT na concentração de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e xantina na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} , pH 7,8, contendo $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ de EDTA. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ do lisado celular foram adicionadas a $170 \mu\text{L}$ da solução de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de NBT e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de xantina. Posteriormente $20 \mu\text{L}$ de xantina oxidase ($0,00375 \text{ U.mL}^{-1}$) foram adicionados às amostras no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão), que foi realizada no modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de 560 nm . Os resultados foram expressos como unidade de SOD por miligrama de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. Para a normalização dos resultados obtidos, a quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.11 Avaliação da atividade da enzima catalase

A conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima CAT foi medida por acompanhamento da diminuição da absorbância do H_2O_2 no comprimento de onda de 240 nm (AEBI, 1984).

Fibroblastos dérmicos humanos, tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos e submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento em TA para obtenção do lisado celular. Uma solução 30 mM de H_2O_2 foi preparada em tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} , pH 7. O meio reacional foi composto por 650 μL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, 300 μL da solução de H_2O_2 a 30 mmol.L^{-1} e 50 μL do lisado celular, o qual foi adicionado à solução de H_2O_2 no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1800, Kyoto, Japão), que foi realizada no modo cinético, por 2 minutos, no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos como unidade de CAT por miligrama de proteína sendo considerada uma unidade internacional de CAT como a quantidade de CAT necessária para decompor 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 por minuto no pH 7 e temperatura de 25°C (WEYDERT; CULLEN, 2010). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. Para a normalização dos resultados obtidos a quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.12 Avaliação da peroxidação lipídica

O ensaio de avaliação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) quantifica hidroperóxidos de lipídeos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), nos meios de cultura de células e no lisado celular. Este ensaio é baseado na reação do composto cromógeno, ácido 2-tiobarbitúrico, com o MDA. Uma molécula de MDA reage com duas moléculas do ácido 2-tiobarbitúrico, via condensação tipo Knoevenagel. para gerar cromóforos com absorbância máxima em 532 nm. O cromóforo formado também pode ser identificado por fluorescência, que pode ser medida em comprimento de excitação de 515 nm e de emissão de 553 nm (LIMA; ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica nos fibroblastos foi determinada segundo o método descrito por OHKAWA, OHISHI e YAGI (1979). Fibroblastos dérmicos humanos, tratados como descrito anteriormente, foram recolhidos em 500 μL de PBS e

submetidos a ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento em TA para obtenção do lisado celular. O meio reacional foi composto por 25 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS), 187,5 μL de ácido acético 20%, 187,5 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA), 25 μL do lisado celular e o volume de reação foi completado para 1 mL com água deionizada. O meio reacional foi incubado por 1 hora em estufa a 95°C e, após este período, a reação foi resfriada em banho de água gelada. A fluorescência do meio reacional foi medida em leitor de microplacas (PerkinElmer, EnSight Multimode Plate Reader, MA, EUA) nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm. O 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (MDA, Sigma-Aldrich) foi utilizado na construção da curva padrão e os resultados foram expressos como nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteína. Foram realizados três experimentos independentes para este ensaio.

4.13 Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio

A quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio foi realizada utilizando o reagente 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda estável lipofílica não fluorescente capaz de atravessar a membrana das células. No citosol das células, esterases desacetilam o DCFH-DA e formam a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que permanece no interior da célula devido a sua polaridade. As espécies reativas de oxigênio oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência que pode ser medida com comprimento de excitação de 510 nm e de emissão de 530 nm. Desta forma, os níveis intracelulares de espécies reativas podem ser medidos por meio da fluorescência emitida pelo DCFoxi (KALYANARAMAN et al., 2012).

Fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração de 10^4 células em cada poço de uma placa de 96 poços e as células foram tratadas por 48 h com as concentrações de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato

total do cranberry. Após este período, o meio com tratamento foi removido, os poços foram lavados e foram adicionados 100 μL de solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e a placa foi incubada por 30 minutos ($37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2/95\% \text{ UR}$). Posteriormente, a solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína foi removida, os poços foram lavados as células foram irradiadas com 10 J/cm^2 de UVA.

A fluorescência produzida foi detectada em leitor de microplacas (Beckman DTX 800, CA, EUA) no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530nm. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e com no mínimo três replicatas biológicas.

Para a normalização dos resultados obtidos, a quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

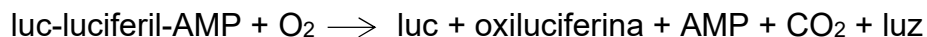
4.14 Avaliação dos níveis de superóxido nas células

A avaliação dos níveis de ânion radical superóxido nas células foi realizada pela determinação da redução do reagente *nitroblue tetrazolium* (NBT) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Para isso, 1×10^4 fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados na concentração em cada poço de uma placa de 96 poços. Após a adesão e confluência das células nos poços, o meio foi retirado e foi adicionado PBS para a irradiação das células com UVA (10 J/cm^2). Após o período de irradiação, 2 mL de meio DMEM ou DMEM com tratamento (extrato total e frações) nas concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram adicionados às células e as placas foram incubadas por 48 horas ($37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2/95\% \text{ UR}$). Ao término deste período, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 100 μL de solução NBT na concentração de 1 mg/mL nas células fixadas. Após 15 minutos, o NBT foi retirado cuidadosamente e foi adicionado ao precipitado 20 μL de metanol 100% para fixação. Foram então adicionados 120 μL de KOH 2 mol.L^{-1} e 140 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização do formazan produzido, que foi determinado por leitura da absorbância em leitor de placa a 600 nm (CAMPANINI

et al., 2013; BELEBECHA et al., 2020). Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. Para a normalização dos resultados obtidos, a quantificação de proteínas do lisado celular foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.15 Avaliação da atividade agonista do extrato total e frações obtidas do *cranberry* às isoformas alfa, beta/delta e gama do PPAR

A avaliação da atividade agonista do extrato total e das frações do extrato de *cranberry* aos receptores PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ foi realizada em cultura de células HeLa, pelo ensaio da transfecção transiente. A lipofetamina foi usada como método químico de transfecção gênica. Para o ensaio, em placas de 48 poços foram semeadas 30.000 células HeLa em cada poço, as quais foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, os ácidos nucleicos foram preparados de forma a obter 300 ng de material seguindo a proporção de 1:4 (receptor nuclear: elemento responsivo), e foram utilizados plasmídeos quiméricos das diferentes isoformas de PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ e o plasmídeo repórter da luciferase dirigido pelo elemento responsivo PPRE. As células foram tratadas com lipofetamina e os plasmídeos foram adicionados. O extrato e suas frações foram os tratamentos aplicados, cada um nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Como controles positivos de ativação dos receptores foram utilizados o bezafibrato 10^{-4} mol.L⁻¹ (controle positivo do PPAR α), L-165041 10^{-4} mol.L⁻¹ (controle positivo do PPAR β/δ), e rosiglitazona 10^{-5} mol.L⁻¹ (controle positivo do PPAR γ), e como controle negativo o veículo usado para o preparo das amostras. As culturas foram incubadas nas mesmas condições especificadas anteriormente, por 22 h. Ao final desse período, o meio foi retirado e 100 μL de tampão de lise, Tris/Triton 100X 100 m mol.L⁻¹ pH 7,6 foram adicionados em cada poço. Em seguida, 10 μL do lisado celular foram transferidos para um microtubo, 20 μL de luciferina foram adicionados ao mesmo, para a reação de oxidação da luciferase (Equação 2), a emissão imediatamente foi mensurada em luminômetro (Promega-GloMax®-20/20).



Equação 2. Reação de oxidação da luciferina (LIN; BARBOSA, 2002).

4.16 Extração de RNA e ensaio RT-qPCR

O efeito do tratamento das células HFF, com o extrato total e frações do cranberry, sobre a expressão de genes relacionados à manutenção da homeostase da pele (*COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*), assim como dos genes do PPAR (*PPARα*) foram analisados por meio do ensaio de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real.

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (*Invitrogen*, CA, EUA). As células foram recolhidas após cultivo em placas de cultura de 100 x 20 mm com 80 a 90% de confluência, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (*GE Healthcare Life Sciences*, UK). As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I (*Sigma-Aldrich*, MO, EUA) com o objetivo de remover contaminação por DNA genômico.

A quantificação de expressão dos genes *COL1A1*, *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1* e *PPARα* (Apêndice 1), nas células HFF tratadas foi feita por PCR quantitativa em um único passo com a utilização do kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step* (*Applied Biosystems*, CA, EUA). As reações foram realizadas com volume final de reação de 10 µL, sendo 5,5 µL de uma mistura composta por Power SYBR® Green, enzima transcriptase reversa (RT), *primers forward* e *reverse* (5 pmol.µL⁻¹), e 4,5 µL da amostra de RNA total, que continham 5 ng de amostra. As condições de reação utilizadas nos experimentos foram: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima Taq DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do primer e extensão. A curva de dissociação foi construída por meio de ciclos de dissociação, 15 segundos a 95°C; anelamento, 15 segundos a 60°C; e

dissociação, 15 segundos a 95°C. O nível de expressão gênica em cada amostra foi quantificado por meio do método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a β -actina como controle endógeno.

4.17 Avaliação da cicatrização de feridas em fibroblastos – *Scratch assay*

O ensaio de fechamento de ferida (*scratch assay*) permite avaliar o efeito de migração e proliferação de células, neste caso como resultado do tratamento com um agente externo. O resultado esperado é a migração celular observada pelo fechamento de uma lesão, por um dado período de tempo.

Para o ensaio foi utilizada a linhagem celular HFF-1. Para verificar a capacidade de fechamento da lesão e potencial de migração celular pós realização de ferida (*scratch*), as células foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade na concentração de 3×10^6 células por poço, em meio DMEM com 10% de SFB, e mantidas por 72 horas até a confluência das células. Após a formação da monocamada, foi realizado um corte manual sobre a mesma no sentido vertical com o uso de uma ponta de pipeta P200 (TPP).

O extrato e as frações do cranberry foram utilizados para o tratamento, feito nas concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Seguido ao tratamento foi feito o acompanhamento fotográfico da evolução do fechamento do corte, proporcionado pela migração celular, em intervalos periódicos de 6 h durante 48 horas, iniciando imediatamente após a realização do corte (0 h), em um microscópio de luz invertida (Zeiss Primo ert, G ttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, G ttingen, Alemanha) em objetiva de 10x. As taxas relativas de fechamento das feridas foram medidas e expressas em porcentagem da área inicial no momento zero do tratamento com os tratamentos em comparação com o controle. Para essa medida foram utilizadas áreas de 3 poços independentes para cada tratamento.

4.18 Ensaio de quantificação de colágeno

A quantificação do nível de colágeno foi realizada a partir da reação específica entre o colágeno e o corante *Sirius Red (Direct Red 80)*, com a formação de uma espécie cromófora que permite a mensuração espectrofotométrica dessa proteína de acordo com o método descrito por Walsh e colaboradores (1992). O tratamento das células foi realizado como descrito anteriormente e, ao término do tratamento, o meio de cultura foi recolhido para a quantificação de colágeno. Para construção da curva padrão foi utilizado colágeno de tendão equino (Helena Laboratories, TX, EUA).

O volume de 50 μL do meio de cultura ou das diluições do colágeno padrão foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços e a placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com água destilada pelo período de 1 minuto por lavagem. Foram adicionados a cada poço 100 μL de solução de *Direct Red 80* (Sigma-Aldrich, MO, EUA) 0,1% em ácido pícrico saturado (m/v) e as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 200 μL de solução de HCl 10 mmol.L^{-1} e foram adicionados 200 μL de solução de NaOH 0,1 M para dissolução do colágeno corado. O conteúdo dos poços foi transferido para nova placa de 96 poços e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (PerkinElmer, EnSight Multimode Plate Reader, MA, EUA) no comprimento de onda de 540 nm.

4.19 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente no programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software*, versão 7.0). Foram utilizados a análise de variância (*one-way ANOVA*) e o teste de comparações múltiplas de Tukey, os dados estão expressos como média $\pm$ erro-padrão da média e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e caracterização química do extrato bruto e suas frações

O rendimento do extrato total foi calculado com relação à massa de farinha a partir da qual o extrato foi obtido (Tabela 1), e para as frações resultantes do fracionamento com solvente, o rendimento foi calculado com relação à massa do extrato total usado no fracionamento, e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

A obtenção do extrato etanólico bruto mostrou um rendimento de 2,55%. O maior rendimento obtido nas frações foi para a fração aquosa e o menor rendimento foi o da fração extraída com acetato de etila. Não houve grande perda de massa durante o processo de fracionamento e secagem. De modo que o rendimento total das duas frações foi 99,47%.

Tabela 1. Rendimento do processo de obtenção do extrato bruto de Cranberry.

	Massa farinha de cranberry (g)	Massa do extrato bruto seco obtido (g)	Rendimento (% m/m)
Extrato bruto	200	5,1	2,55

Tabela 2. Rendimento das frações do extrato bruto do Cranberry.

Extrato e Frações	Massa do extrato bruto (g)	Massa da fração obtida (g)	Rendimento (% m/m)
Acetato de etila	2,3	0,243	10,56
Aquosa	2,3	2,045	88,91

5.1.1 Avaliação do conteúdo de fenóis totais

A quantidade de polifenóis totais nas frações do extrato foi medida por meio do ensaio de Folin-Ciocalteu, com utilização do ácido gálico como padrão para a construção da curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos como $\mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$ e estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 2.

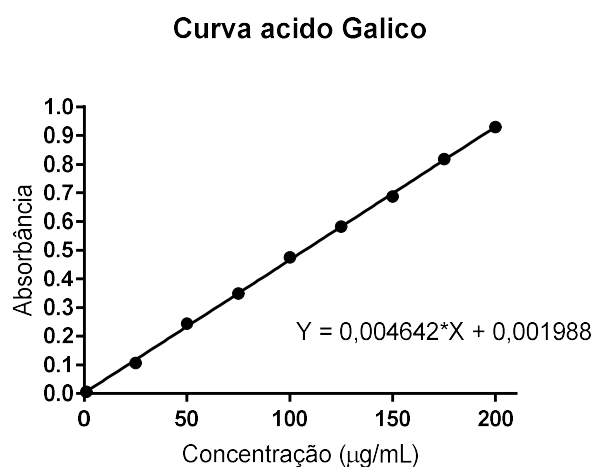


Figura 2. Curva padrão ácido gálico

Tabela 3. Quantificação de polifenóis totais no extrato e frações

Extrato e frações	Fenóis totais ($\mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$)
Extrato total	$23,913 \pm 0,453$
Fração AcOEt	$18,043 \pm 0,453$
Fração aquosa	$14,783 \pm 0,547$

A determinação do teor de polifenóis totais (TPC) no extrato total de cranberry e nas frações de acetato de etila e aquosa mostrou que o extrato total apresentou o maior valor, $23,913 \mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$, seguido da Fração AcOEt com $18,043 \mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$ (Tabela 3). A fração aquosa foi a que apresentou o menor valor, com $14,783 \mu\text{g EAG.mg de extrato}^{-1}$.

Em soluções aquosas do extrato, o conteúdo de fenóis varia de 10 a 20 miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de peso seco da amostra

(CHEN et al., 2015). Normalmente a baixa capacidade de inibição do radical DPPH se correlaciona a baixas concentrações dos compostos fenólicos solúveis, o que pode justificar a ação moderada do ET, ao ser comparada com as substâncias de referência no ensaio da capacidade antioxidante mencionado (CHEN et al., 2015).

A extração com uma solução contendo 50% de acetona, utilizada por PARRY et al., 2006, resultou em um extrato com um teor de 14,6 mg EAG/g, que é um valor similar ao encontrado para a fração aquosa neste trabalho, que foi o extrato que apresentou o menor teor de polifenóis. PARRY et al., 2006, reportaram também que o extrato de cranberry foi o que mostrou o menor teor de polifenóis (mg EAG/g) quando comparado com outras espécies como *black raspberry* (41,2), *red raspberry* (25,1) e *blueberry* (15,8), no mesmo ensaio.

O rendimento ideal sugerido por KRISHNAESWARI et al., 2019, de conteúdo de fenóis totais encontrado no extrato etanólico de cranberry foi de 13,07 mg EAG/g, valor mais baixo que o encontrado neste trabalho (Tabela 3) para o extrato total, diferença ligada possivelmente à metodologia de extração. Por outro lado, o teor de compostos fenólicos no extrato aquoso liofilizado encontrado pelos autores foi de 26,0 µg EAG/g, que foi muito menor que o encontrado na fração aquosa obtida neste trabalho, de 14,783 µg EAG /mg.

As espécies *Cranberry* (*V. macrocarpon*), *Lowbush Cranberry* (*V. vitis-idaea*), *Lowbush Blueberry* (*V. angustifolium*) e *Bog Blueberry* (*V. uliginosum*) foram comparadas quanto a seu teor de polifenóis, mostrando, respectivamente, os seguintes valores: 350,5; 624,4; 371,3; 504,5 mg de polifenóis/100 g.

No estudo realizado por OSZMIANŚKI et al., 2017, que identificou o teor de fenóis totais das cultivares de cranberry da Polônia, Ben Lear, Red Star, Howes Franklin, Pilgrim e Stevens, foram reportados valores entre 2500 e 4300 mg/100 g de matéria seca.

Duas amostras de suco comercial de cranberry apresentaram teores de fenóis totais de 117,57 e 788,38 mg.L⁻¹, respectivamente, o que dá a ideia de correlação com uma capacidade antioxidante moderada. O teor de polifenóis totais do suco de cranberry foi baixo quando comprado com o *Elderberry*

(GRANATO; KARNOPP; VAN RUTH, 2015), por exemplo. Por outro lado, CÁSEDAS et al., 2017, reportaram que o suco de *Blueberry* continha 27,44 μg EAG. mg^{-1} de suco liofilizado, teor mais alto que ao reportado no mesmo trabalho para o suco de cranberry liofilizado que continha 23,76 μg EAG. mg^{-1} .

5.1.2 Avaliação do teor de flavonoides totais

A quantidade de flavonoides totais do extrato e das frações foi determinada por meio do ensaio de formação do complexo de cor amarela entre o cloreto de alumínio e os grupos fenólicos livres presentes nos compostos. Como padrão, para a construção da curva de calibração, foi utilizada a quercetina (Figura 3). Os resultados obtidos foram expressos como μg EQ. mg de extrato $^{-1}$ e estão apresentados na Tabela 4.

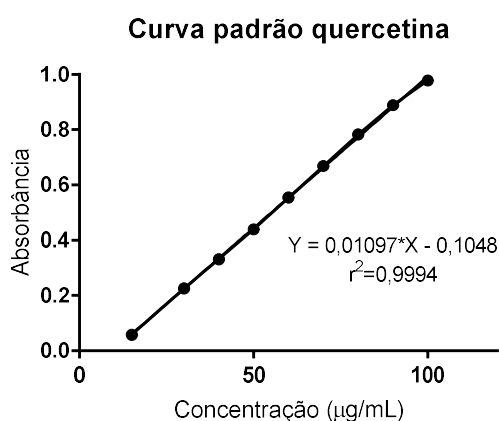


Figura 3. Curva padrão de quercetina.

Tabela 4. Quantificação de flavonoides totais no extrato e nas frações.

Extrato e frações	Flavonoides totais (μg EQ. mg de extrato $^{-1}$)
Extrato total	19,422 $\pm$ 1,47
Fração AcOEt	27,181 $\pm$ 0,48
Fração aquosa	11,836 $\pm$ 0,55

A quantificação de flavonoides totais no extrato total de cranberry e nas frações mostrou que o primeiro representa o segundo maior conteúdo destas

espécies com 19,442 $\mu\text{g EQ.mg}^{-1}$ e, apesar deste ter apresentado o maior teor de polifenóis totais dentre as três amostras quantificadas, a fração AcOEt apresentou o maior teor de flavonoides 27,181 $\mu\text{g EQ.mg}^{-1}$, fração que mostrou o segundo maior valor de polifenóis totais. Finalmente, a fração aquosa foi a que apresentou o menor valor quanto à quantidade de flavonoides, 11,836 $\mu\text{g EQ.mg}^{-1}$.

O teor de flavonoides reportado por KRISHNAESWARI et al., 2019, foi de 9,02 mg EQ/g de extrato de cranberry, por outro lado, o teor de compostos de flavonóis no extrato aquoso liofilizado foi de 7,06 $\mu\text{g EQ/g}$ (LAEC), diferentes dos encontrados neste trabalho, que foram maiores.

5.1.3 Análise do perfil fitoquímico

A avaliação do perfil fitoquímico do extrato total (Figura 4) de *cranberry*, fração aquosa (Figura 6) e fração acetato de etila (Figura 5) em comparação com a base de dados de padrões do HPLC do Laboratório de Controle da Qualidade da Universidade de Brasília, onde foram feitas as análises de cromatografia por HPLC, permitiu realizar a correlação dos espectros dos extratos avaliados com os compostos do banco de dados. Foram encontradas similaridades com alguns compostos como rutina, catequina e cianidina-3-O-glucosídeo (Tabela 5), compostos químicos já descritos por (BROWN; SHIPLEY, 2011).

Estudos prévios de avaliação do perfil fitoquímico do *cranberry* descreveram as antocianinas como os compostos majoritários presentes nesta fruta (BOOTH et al., 2012). Esses estudos também evidenciaram a natureza complexa dos compostos químicos que compõem os extratos.

Neste trabalho não foi possível a determinação de todo o perfil químico do *cranberry*, contudo foi possível identificar metabólitos já descritos em trabalhos prévios, como a rutina, quercetina e kaempferol, que já foram descritos por VVEDENSKAYA et al., 2004, e são característicos das espécies de *berries*. Estes compostos estão relacionados com a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS), inibindo a produção de citocinas e regulando a expressão da óxido nítrico sintetase induzível por LPS. Dao e colaboradores

(2012) reportaram ainda que frações ricas em proantocianidinas do cranberry foram ativas contra o crescimento de *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.

Os ácidos fenólicos, que formam parte do complexo grupo fitoquímico do fruto, mostraram potencial de proteção contra alguns tipos de fungos patogênicos humanos (DAO; PATEL; NETO, 2012). A capacidade anticancerígena e o potencial antioxidante destes compostos também foi descrito por HE e RUI, 2006.

De acordo com MA et al., 2018, extratos ricos em antocianinas, quando testados em modelos murinos, inibiram a fibrilação de A β induzida por calor e metilglioxal, reduziram o estresse inflamatório e oxidativo induzido por LPS e H₂O₂ na microglia BV-2, aumentaram a viabilidade das células BV-2 contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂, e diminuíram a atividade de uma protease apoptótica (capase-3/7) em células BV-2.

Tabela 5. Perfil fitoquímico dos extratos utilizados

Composto químico	Tempo e retenção (min)	ET	Fração aquosa (FrAq)	Fração (FrAcOEt)
Transanetol	44,14 ¹	x		
Atenol	43,18 ¹	x		
Resveratrol	41,70 ³			x
Hesperidina	52,79 ³			x
Ácido galico	50,08 ³	x	x	x
Cloridrato de Cianidina	25,37 ³	x	x	
Fenchona	44,10 ²	x		
Catequina	14,10 ³	x		
Rutina	26,88 ³		x	
Cianidina-3-O-Glucosideo	16,06 ²	x		
Kaemferol	52,44 ²	x		

¹, Porcentagem de semelhança acima do 99%; ², Porcentagem de semelhança entre 95-99%; ³, Porcentagem de semelhança entre 90-95%

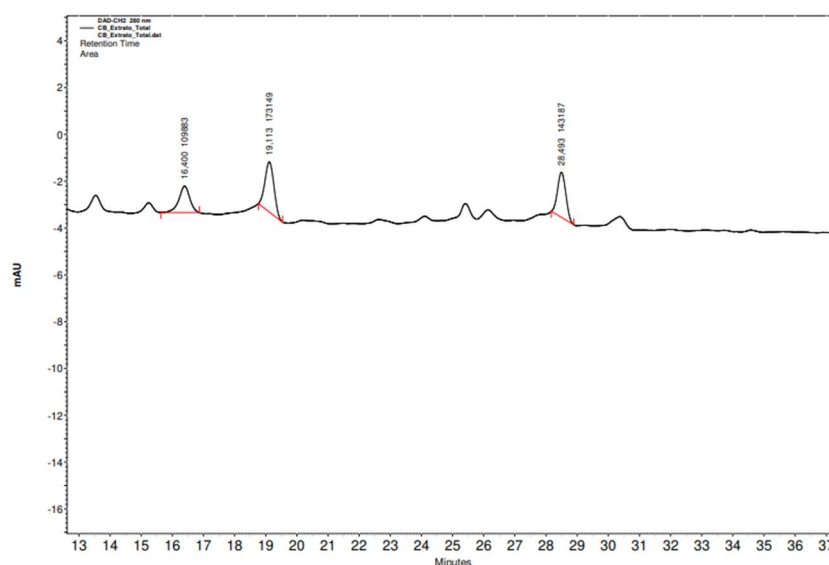


Figura 4. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm do Extrato total espectro UV.

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 280 nm.

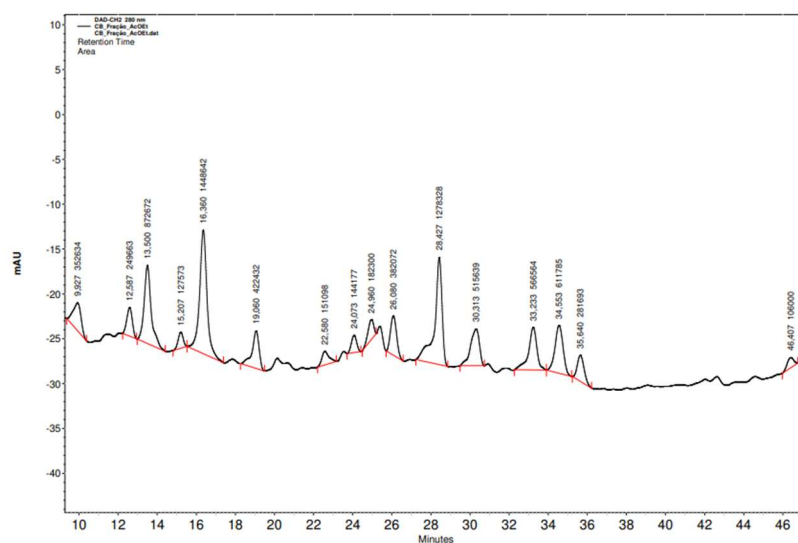


Figura 5. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm da Fração Acetato de etila.

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 280 nm.

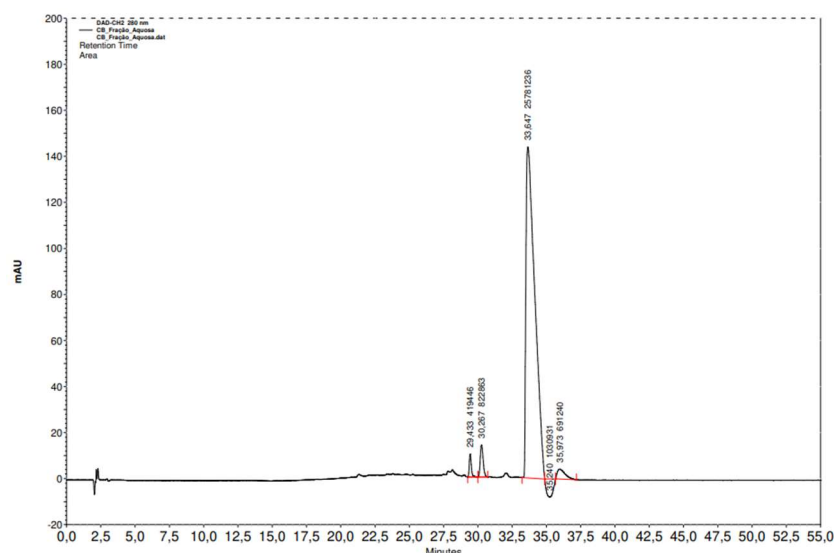


Figura 6. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm da Fração Aquosa.

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 280 nm.

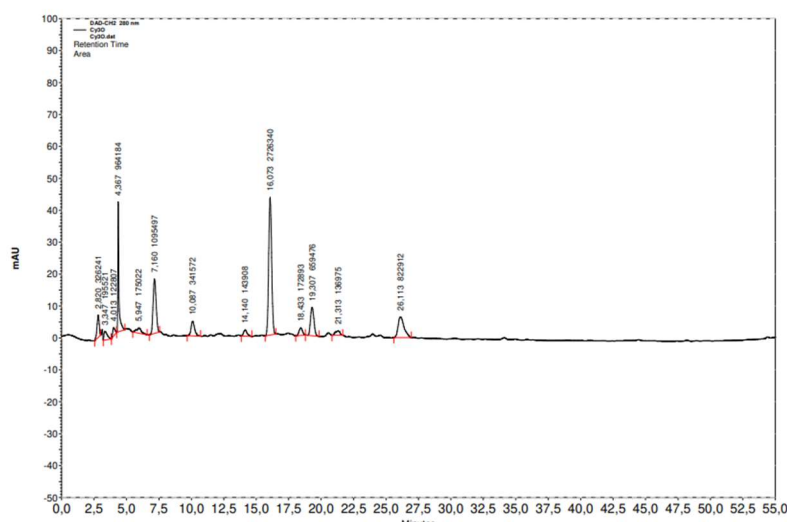


Figura 7. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD a 280 nm do padrão cianidina-O-glicosídeo.

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5 μ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 280 nm

5.2 Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico do cranberry pelo método do DPPH·

A atividade antioxidante do extrato total e das frações do extrato foi determinada por meio do ensaio de inibição do radical estável DPPH·. Os resultados obtidos foram expressos pelos valores de IC₅₀ e estão apresentados na Figura 8 e Tabela 6.

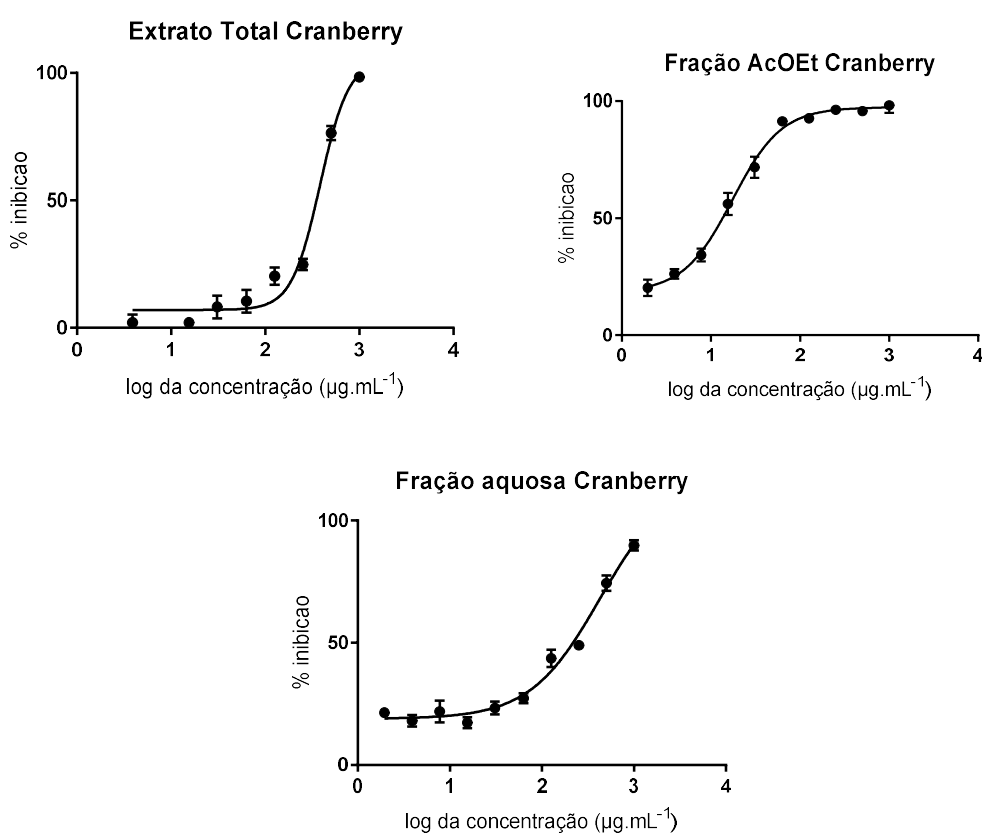


Figura 8. Representação das curvas obtidas no ensaio de inibição do radical DPPH·.

Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato, frações e padrões – valores de IC₅₀.

Amostras	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Extrato total	383,90 ± 0,93
Fração AcOEt	17,45 ± 0,94
Fração aquosa	427,1 ± 0,75
Ácido ascórbico*	1,91 ± 0,31
BHT*	8,92 ± 2,37
Quercetina*	1,52 ± 0,33

* Padrões utilizados no ensaio

A capacidade antioxidante do extrato total avaliada pelo método DPPH mostrou um valor intermediário dentre as três amostras testadas. O extrato total apresentou o valor do IC₅₀ de 383,9 µg.mL⁻¹, que foi bem próximo do valor obtido por MA et al., 2018 (392,6 µg.mL⁻¹), e, ao ser comparado aos valores de IC₅₀ de outras espécies analisadas pelo mesmo ensaio, também mostrou um valor próximo ao encontrado para o *blueberry* (IC₅₀ de 381,1 µg.mL⁻¹) e um pouco maior que o do *red raspberry* (268.5 µg.mL⁻¹). Este valor de IC₅₀ obtido para o extrato total pode ser considerado como correspondente a uma atividade antioxidante considerada como alta, quando comparada com os valores de IC₅₀ 1968,6 ± 22.3 e 2865.9 ± 62,8 µg.mL⁻¹ obtidos pelo mesmo ensaio para as espécies *black berry* e *black raspberry* (MA et al., 2018), os quais mostraram capacidades moderadas de sequestro do radical.

A fração de AcOEt, apresentou o menor valor de IC₅₀ (17,45 µg.mL⁻¹) dentre as três amostras, o que poderia, neste caso, sugerir que existe maior presença nesta fração de uma variedade de compostos químicos como antocianinas, flavonóides (flavonóis e flavonóides), ácidos fenólicos, estilbenoides, taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) e taninos condensados (proantocianidinas), comumente encontrados nesta espécie e em outras agrupadas sob o nome de *berries*. A fração aquosa apresentou o IC₅₀ mais alto 427,1 µg.mL⁻¹ o que por outro lado indicaria, a menor disponibilidade

ou presença de grupos químicos que estejam associados com a atividade antioxidante.

Comparativamente, estudos realizados em soluções aquosas do extrato nos quais a porcentagem de inibição foi de 10%, correlacionam a baixa capacidade de inibição do radical DPPH com baixas concentrações de compostos fenólicos solúveis o que pode justificar a ação moderada da fração aquosa (CHEN et al., 2015). No entanto, no estudo citado, a combinação do cranberry com outras espécies aumentou a presença em solução de compostos fenólicos, o que melhorou proporcionalmente a capacidade antioxidante.

O método de extração utilizado por CÁSEDAS et al., 2017, para a obtenção de extratos e frações, potencializou a capacidade antioxidante do extrato obtido da farinha do fruto. Os valores de IC_{50} correspondentes às soluções aquosas de *cranberry* e *blueberry* obtidas pelos autores foram de $177 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e $99 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Pelo método descrito pelos autores, a capacidade antioxidante do *cranberry* mostrou um incremento de 2,4 vezes quando comparado com o IC_{50} da fração aquosa obtida pelo método utilizado neste trabalho.

O extrato etanólico da farinha da fruta preparado por XIAO et al., 2017, usando extração por ultrassom, mostrou um IC_{50} de $38,31 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ no ensaio do radical DPPH, uma atividade antioxidante bastante superior às encontradas em trabalhos previamente publicados e neste trabalho, que foi de $383,9 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, sugerindo que este método de extração resulta em um extrato com um alto teor de compostos fenólicos disponíveis, que agem como inibidores do radical, o que se confirmou pelo teor de fenóis e flavonoides totais determinados por XIAO et al. (2017).

O estudo de KRISHNAESWARI et al., 2019, estimou qualitativamente que a capacidade antioxidante do extrato etanólico era maior do que a da fração aquosa. Quantitativamente, reportaram o valor de 81% de capacidade antioxidante para o extrato etanólico e 70% para a fração aquosa.

A comparação dos extratos metanólicos de três espécies, *Lycium barbarum* (GOJI), *Vaccinium macrocarpon* (CRAN) and *Vaccinium myrtillus*

(BLUE), por NARDI et al., 2016, mostrou uma baixa capacidade antioxidante da espécie CRAN, a qual numa concentração de $3200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ atingiu a inibição de 14,05% do radical DPPH, notavelmente diferente do IC_{50} de $383,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ encontrado pelo método usado neste trabalho, que claramente sugere uma atividade antioxidante superior.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição da peroxidação lipídica.

A inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela capacidade de diminuir a produção de malondialdeído, um dos subprodutos formados durante a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. O método avaliou a inibição da lipoperoxidação promovida por substâncias antioxidantes presentes no extrato e nas frações usando a gema de ovo como uma fonte de lipídeos (GUIMARÃES et al., 2010).

O efeito de inibição da peroxidação pelo extrato do cranberry e suas frações estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica obtida para o extrato e suas frações

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25,0	50,0	100
α-Tocoferol			$45,81 \pm 2,03$
Extrato total (ET)	$42,55 \pm 3,26$	$51,14 \pm 2,95$	$59,63 \pm 3,14$
Fração aquosa (FrA)	$43,87 \pm 2,09$	$50,91 \pm 3,32$	$55,56 \pm 2,74$
Fração AcOEt (FrAcOEt)	$43,08 \pm 3,33$	$53,56 \pm 3,26$	$60,18 \pm 2,25$

Os resultados obtidos mostram que tanto o extrato total quanto as suas frações de AcOEt e aquosa, representados na (Tabela 7), mostram um leve aumento da inibição da peroxidação lipídica conforme as concentrações aumentaram. As amostras foram capazes de inibir a peroxidação lipídica de forma comprável ao α -tocoferol, que inibiu a peroxidação lipídica em 45,806%

(Tabela 7) na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tanto o ET (59,63%), quanto as FrA (55,56%) e FrAcOEt (60,18%) apresentaram capacidade de inibir a peroxidação lipídica superior ao do α -tocoferol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e mesmo quando em concentrações menores, de 50 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.4 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos e células HeLa tratadas com o extrato de cranberry.

O efeito que os metabólitos presentes no extrato e frações do cranberry exerciam sobre a viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos foi determinado por meio do ensaio do MTT. Neste ensaio, a viabilidade das células é avaliada pela capacidade da transformação do produto inicial a cristais de formazan, produzidos através da clivagem do anel tetrazólio presente no sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), o que acontece na mitocôndria das células viáveis pela ação direta das enzimas desidrogenases presentes nesta organela. A viabilidade celular dos fibroblastos foi expressa em porcentagem, sendo considerada como 100% a viabilidade das células com ausência de tratamento algum.

A viabilidade celular dos fibroblastos tratados com o veículo usado na solubilização dos extratos foi considerada como 100%. A viabilidade celular atingiu valores superiores a 90% tanto para as células tratadas com o extrato total como para as células tratadas com as frações aquosa e AcOEt em todas as concentrações testadas. O tratamento dos fibroblastos com os extratos por 24 h ou 48 h não afetou de forma significativa a viabilidade celular nas concentrações testadas (Figura 9). Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com o extrato etanólico do cranberry e suas frações.).

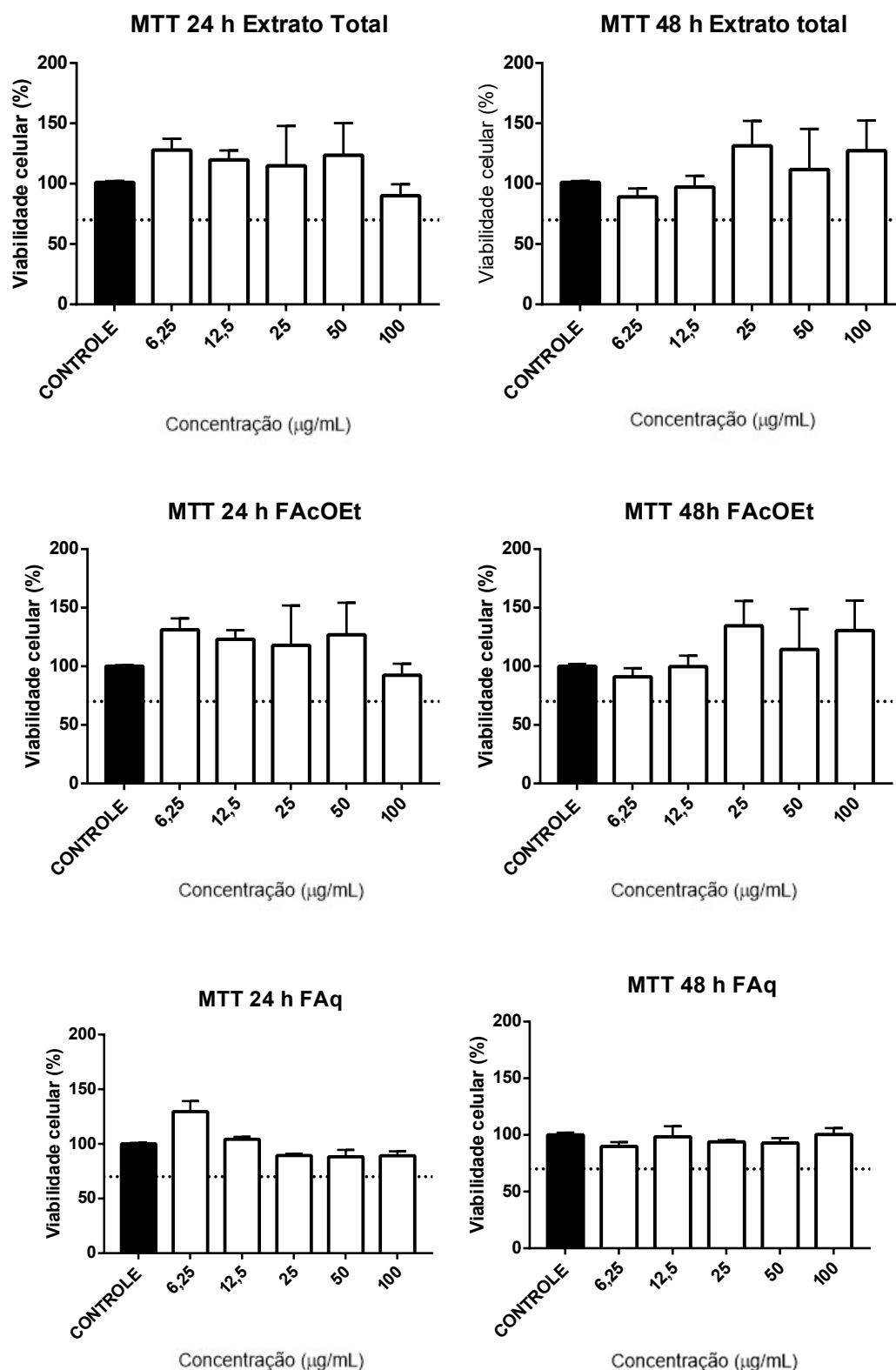


Figura 9. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com o extrato etanólico do cranberry e suas frações.

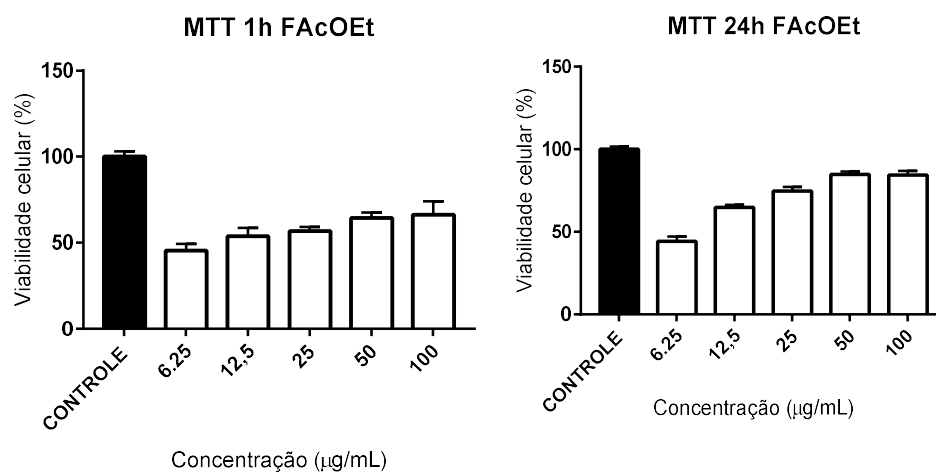
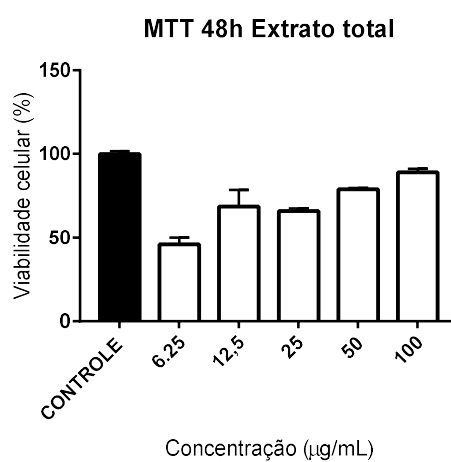
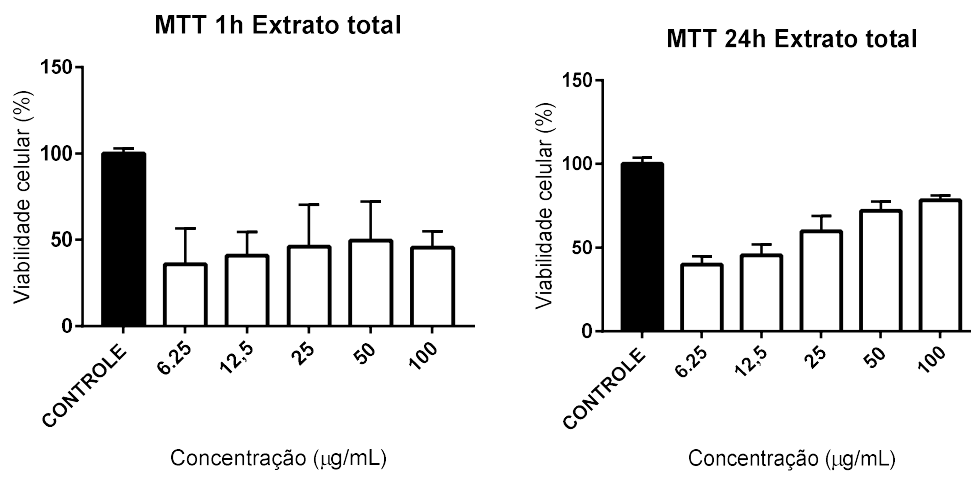
A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio do MTT após 24 h e 48 h de tratamento com diferentes concentrações do extrato e suas frações: 1) Extrato total; 2) fração Aquosa (F. Aq); 3) Fração acetato de etila (F. AcOEt). Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis, $n = 3$.

O potencial citoprotetor dos extratos e frações produzidas foi determinada também utilizando o método de viabilidade celular MTT, com variação do tempo de tratamento após a irradiação das células com UVA, que foram de 1 h, 24 h e 48 h, após os quais foi realizada a determinação da viabilidade celular (Figura 10).

Inicialmente o comportamento da cultura celular de fibroblastos dérmicos humanos após a irradiação para todos os tratamentos testados mostrou diminuição da viabilidade celular quando foi determinada após 1 h para o extrato total e para a fração aquosa em todas as concentrações com valores inferiores a 50%, porém as células tratadas com a fração de acetato de etila apresentaram viabilidade superior a 50% nas concentrações maiores a $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o período de incubação de 24 h das células HFF-1 com os tratamentos, a viabilidade celular mostrou uma tendência de recuperação o que se observa de forma paralela ao aumento nas concentrações de cada tratamento. Os valores mínimos de porcentagem a viabilidade celular iniciaram em 40% e os máximos atingiram 70%, quando comparados com o controle (Figura 10).

A viabilidade celular avaliada 48 h após a irradiação para o extrato total mostrou que as concentrações de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ facilitaram a recuperação da cultura celular, com viabilidade celular entre 70 e 80%, respectivamente, porém as concentrações de $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, também apresentaram melhoria quando comparadas com os períodos de tratamento de 1 h e 24 h (Figura 10).

O comportamento que é observado nos tratamentos das frações aquosa e acetato de etila, após 48 h de irradiação das células, é de uma porcentagem de viabilidade celular constante para todas as concentrações testadas, com valores de viabilidade celular em torno de 60% para a fração de acetato de etila e 70% para a fração aquosa, o que poderia estar relacionado as características das frações como a polaridade; todas as concentrações de tratamento proporcionaram uma boa capacidade de recuperação da cultura celular quando comparadas com os tratamentos prévios.



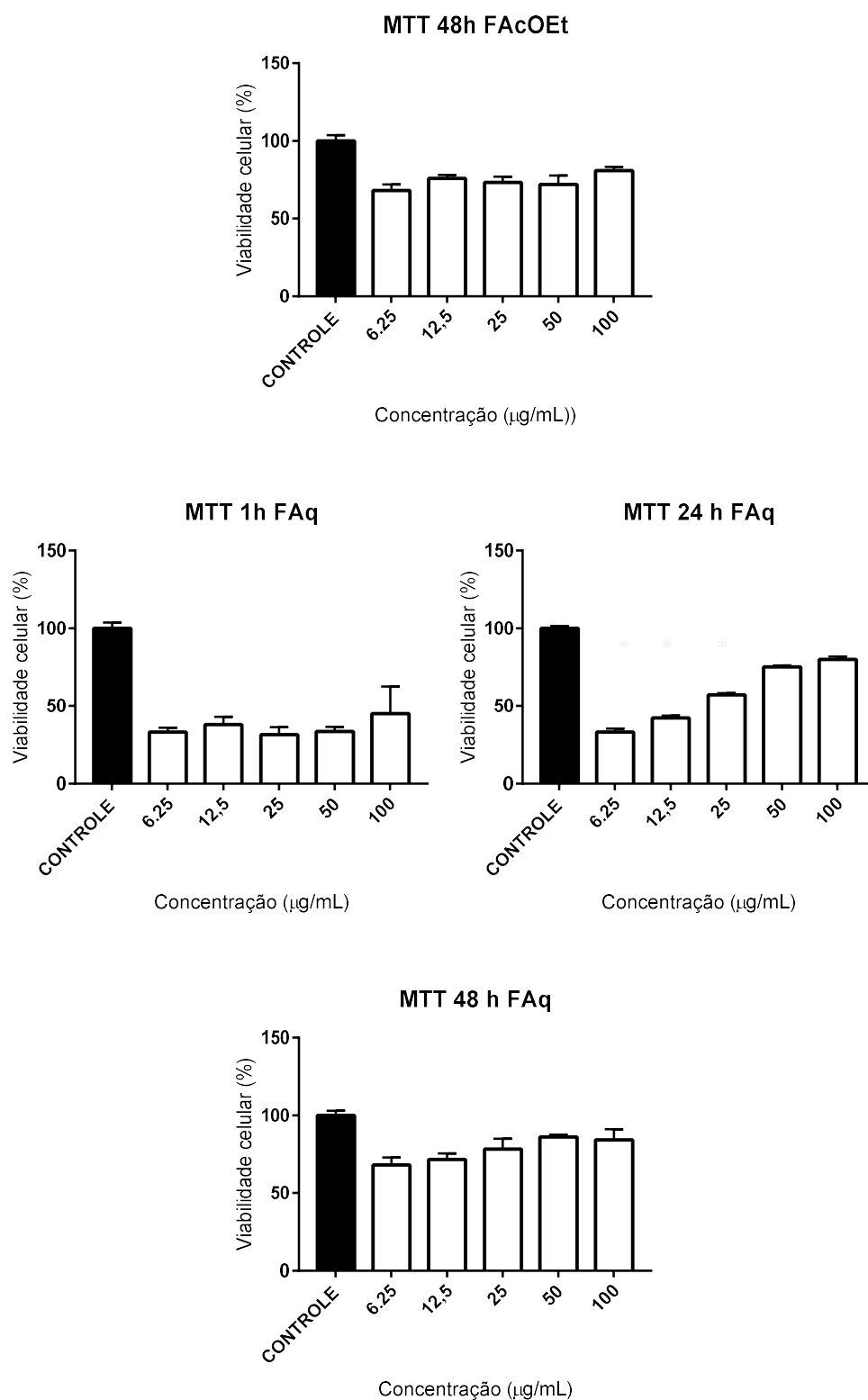


Figura 10. Tratamento com extrato e frações do cranberry a após 1h de irradiação com determinação da viabilidade celular após 1 h, 24 h e 48 h..

A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio do MTT após 24h e 48h de tratamento com diferentes concentrações do extrato e frações: 1) Extrato total; 2) fração Aquosa (F. Aq); 3) Fração acetato de etila (F. AcOEt). Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis, n = 3.

O ensaio de avaliação da viabilidade celular das células HeLa foi realizado com concentrações que variaram desde $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os tratamentos Extrato total, frações acetato de etila e aquosa, o efeito na viabilidade celular de células HeLa apresentado na Figura 11, mostrou que não houve diminuição considerável da viabilidade celular no tratamento com as concentrações inferiores a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pois não afetaram a viabilidade celular, e a mantiveram acima do 70%, porém concentrações a partir de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, promoveram e diminuiram a viabilidade celular, motivo pelo qual concentrações acima de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não foram utilizadas neste ensaio.

As concentrações, dos tratamentos entre $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram as escolhidas, para posteriormente para serem utilizadas no ensaio gene repórter, devido ao efeito na viabilidade celular mostrado quando as células HeLa foram tratadas com estas concentrações.

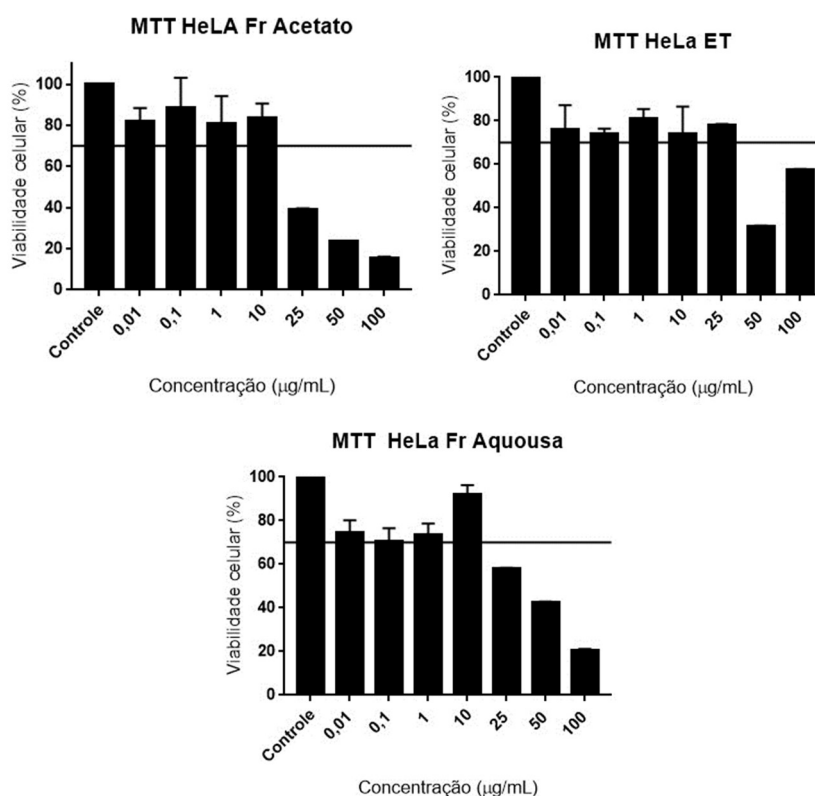


Figura 11. Viabilidade de células HeLa tratadas com o extrato etanólico do cranberry e suas frações.

A viabilidade de células HeLa foi avaliada pelo ensaio do MTT após 24 h de tratamento com diferentes concentrações do extrato e suas frações: ET, Extrato total; F.Aq, fração aquosa; FAcOEt, Fração acetato

de etila. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células viáveis, $n = 3$.

5.5 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada nas células tratadas com o extrato total e as frações de acetato de etila e aquosa, submetidas ou não à irradiação. Os resultados foram expressos como unidade de atividade da SOD/mg de proteína das células nas quais foi induzido o estresse oxidativo pela radiação UVA e que foram tratadas com ET, FrAq ou Fr AcOEt, e foram comparados ao controle, composto de células em que não houve a indução do estresse oxidativo e nem tratamento com ET, FrAq e Fr AcOEt.

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) está associada com a produção e o acúmulo de ROS, o que fomenta um dos principais fatores que promovem às alterações da pele. Uma enzima importante do sistema antioxidante é a superóxido dismutase (SOD), considerada como a principal enzima do sistema antioxidante celular, agindo de forma primária e seletiva na conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2). O H_2O_2 é posteriormente convertido em água pela catalase e glutathione peroxidase (GPx). Novas terapias cuja capacidade seja a de fortalecer a capacidade do nosso sistema antioxidante, um sistema de defesa fundamental à célula, são importantes na manutenção do equilíbrio redox, que exerce um papel fundamental na regulação da homeostase da pele.

Foi avaliado neste trabalho o efeito provocado pelo extrato de cranberry e suas frações na atividade da enzima superóxido dismutase pelo método da xantina/xantina oxidase, que induz a produção do $O_2^{\cdot-}$, usando o NBT como indicador da produção de $O_2^{\cdot-}$. A quantidade de SOD presente no meio reacional é indicada pela inibição da redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$. Para este ensaio as células foram submetidas ao tratamento com os extratos e submetidas ou não à RUV (Figura 12).

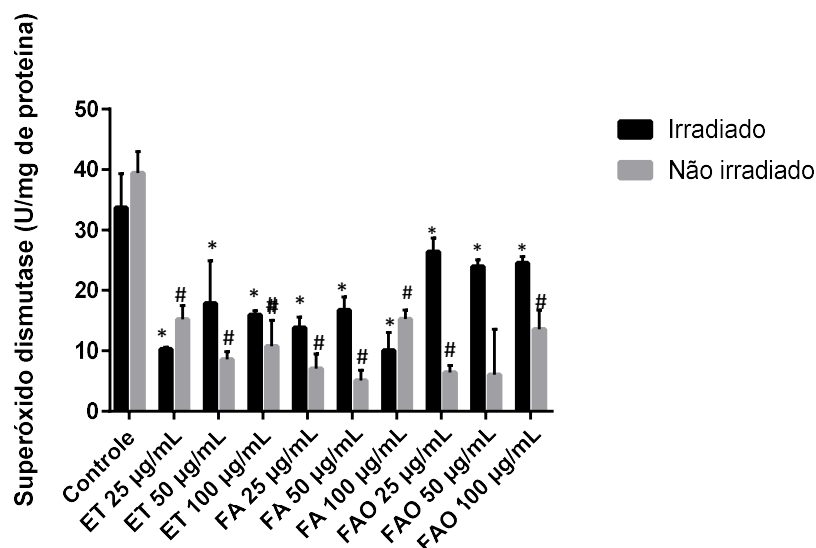


Figura 12. Atividade da enzima SOD em células submetidas ou não ao estresse oxidativo e tratadas com extratos de cranberry.

Fibroblastos dérmicos foram tratados conforme ao descrito no item 5.7 e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD. Os resultados apresentados representam média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, $p < 0,05$ em relação ao controle irradiado; #, $p < 0,05$ em relação ao controle não irradiado)

A avaliação da atividade da SOD (Figura 12) nas células tratadas e irradiadas ou não com UVA mostrou que tanto as células irradiadas como as que não o foram, quando tratadas com o extrato total, fração de acetato de etila e fração aquosa, mostraram um resultado inesperado, pois houve uma diminuição da atividade da SOD em relação ao controle. DENIS et al., 2015, mostraram que o tratamento de células de adenocarcinoma colorretal epitelial humano Caco-2/15 com frações de cranberry apresentaram um aumento na atividade enzimática da SOD. Os autores descrevem como um dos possíveis mecanismos da ação protetora das frações de cranberry a indução das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, GPx e CAT).

Além disso, o nível de ânion radical superóxido das células tratadas ou não com o extrato e suas frações e submetidas ou não à indução do estresse oxidativo pela exposição à radiação UVA foi estimado pela reação de redução do NBT pelo $O_2^{\cdot-}$. Os resultados estão apresentados na Figura 13.

As células não irradiadas e tratadas com extrato total na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mostraram um nível de $\text{O}_2^{\cdot-}$ significativamente diferente do controle, nesta concentração o extrato diminuiu os níveis do radical, o que indica que possui capacidade de captura do ânion radical superóxido. Por outro lado, as frações tanto acetato de etila como aquosa, apresentaram também diferença significativa com relação ao controle, no entanto mostraram um aumento nos níveis do radical superóxido.

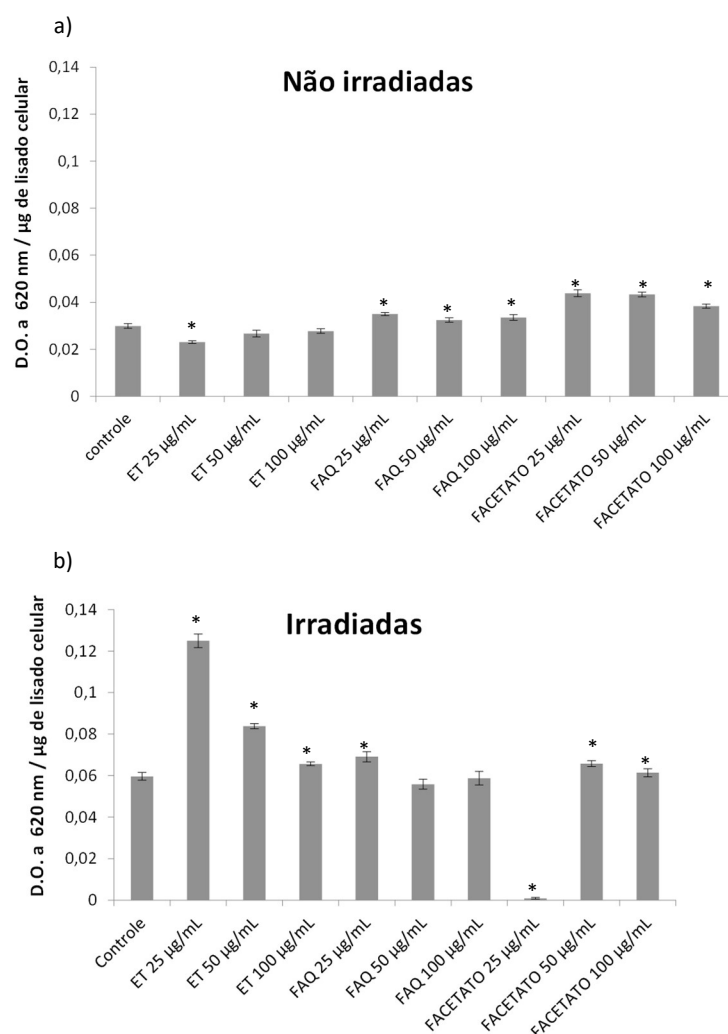


Figura 13. Avaliação dos níveis de superóxido nas células.

Fibroblastos dérmicos foram tratados conforme ao descrito no item 4.9 e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima SOD. Os resultados apresentados representam média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, $p < 0,05$ em relação ao controle; (a) células não irradiadas; (b) células expostas a radiação ultravioleta A.

As células que foram tratadas após a indução do estresse oxidativo pela irradiação com UVA mostraram um aumento nos níveis deste radical ao serem comparadas com o valor do controle para este ensaio, contudo a concentração 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondente a fração de acetato de etila, foi capaz de diminuir significativamente os níveis do radical quando comparada com o controle

5.6 Avaliação da atividade da enzima catalase.

A atividade da enzima catalase foi avaliada para avaliar o efeito que o extrato total e as frações de acetato de etila e aquosa tinham sobre essa enzima do sistema enzimático antioxidante das células. Os resultados foram expressos como atividade da catalase ($\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$).

O tratamento com o extrato total e as frações acetato de etila e aquosa reduziram a atividade da catalase de forma significativa quando comparados com o controle quando os fibroblastos foram tratados e não expostos a RUVA. Neste caso, a diminuição da atividade na enzima catalase para os três tratamentos do extrato total foi de $0,15 \pm 0,16$; $0,12 \pm 0,21$ e $0,04 \pm 0,01$ $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$ nas concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Um comportamento similar foi observado para as células tratadas com Fr acetato, para as quais a atividade também foi reduzida, sendo de $2,5 \pm 4,4$; 0,0 e $0,6 \pm 1,0$ $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$ para células tratadas com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração acetato de etila, o que indica um decaimento substancial na atividade de enzima catalase. Para células tratadas com a fração aquosa, o fenômeno foi similar, a diminuição da atividade enzimática foi drástica, observando, para o tratamento com as concentrações 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a atividade da catalase de $0,16 \pm 0,20$; $0,24 \pm 0,41$ e $0,01 \pm 0,02$ $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína. A (Figura 14) representa os resultados encontrados para células sem indução do estresse oxidativo e que foram tratadas com o extrato e suas frações.

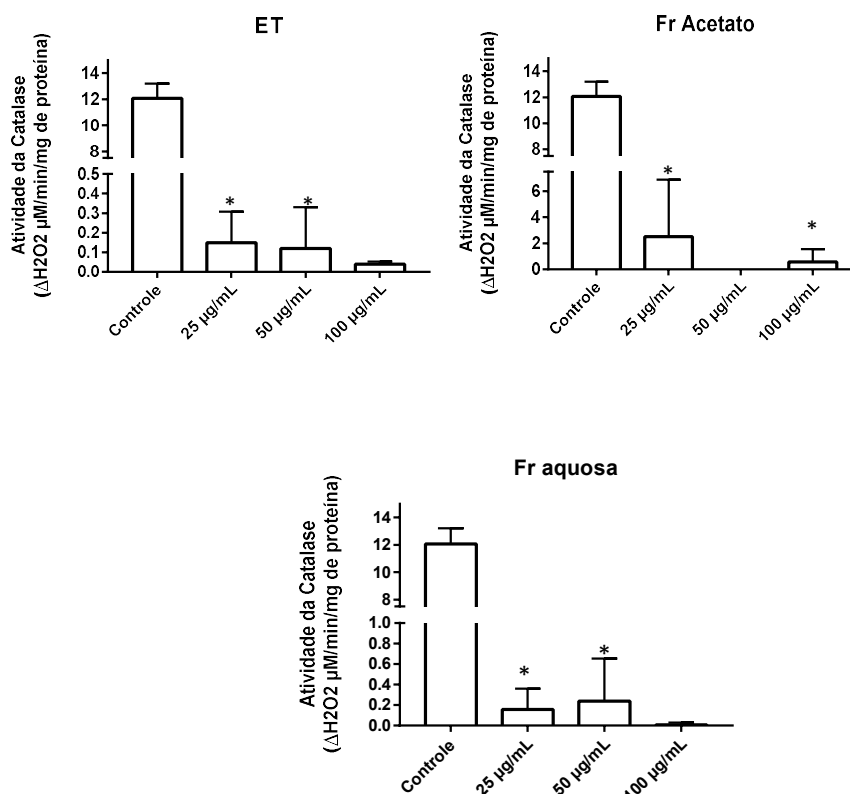


Figura 14. Atividade da enzima catalase sem indução do estresse.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 5.8, e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de H₂O₂ 30 mM em espectrofotômetro. Os resultados apresentados representam a média ± erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0,05 em relação ao controle).

Ao induzir o estresse com a radiação UVA e tratar as células posteriormente com as diferentes amostras, foi possível observar que o extrato total e a fração aquosa aumentaram a atividade enzimática, principalmente nas células tratadas com as menores concentrações de cada extrato (Figura 15). Um comportamento similar foi descrito na revisão CALDAS; COELHO; BRESSAN, 2018, que descreveu para o tratamento com cranberry um aumento da expressão, assim como o aumento da atividade enzimática da catalase.

As células tratadas com o extrato total mostram uma atividade de $440,6 \pm 1,83$; $380,66 \pm 4,22$ e $119,54 \pm 18,72$ ΔH₂O₂ μmol.L⁻¹.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ para as concentrações de 25 μg.mL⁻¹, 50 μg.mL⁻¹ e 100 μg.mL⁻¹, respectivamente. Para a fração aquosa o comportamento foi similar resultando em atividades de $279,26 \pm 0,49$; $244,5 \pm 1,349$ e $227,25 \pm 0,129$ ΔH₂O₂ μmol.L⁻¹.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ para as respectivas concentrações de 25 μg.mL⁻¹, 50

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os dois tratamentos apresentaram atividades significativamente maiores às observadas no controle (Figura 15).

O comportamento das células tratadas com a fração de acetato de etila (Fr acetato), mostrou que duas das concentrações, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, causaram um maior aumento na atividade enzimática nas células, $124,43 \pm 8,01$ e $93,48 \pm 2,17 \Delta\text{H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína (Figura 15). Já o tratamento de $50 \mu\text{g/mL}$ resultou em uma atividade de CAT nas células de $40,04 \pm 1,14$, e foi o que apresentou o menor aumento da atividade nas células, no entanto ao compará-la com o controle é significativamente maior.

Esse resultado indica uma ação bastante positiva dos extratos de cranberry sobre esta enzima do sistema enzimático antioxidante do organismo, uma vez que um dos efeitos da exposição à radiação UV é a diminuição na atividade da catalase, indicando que os tratamentos foram capazes de proteger as células dos danos do estresse oxidativo.

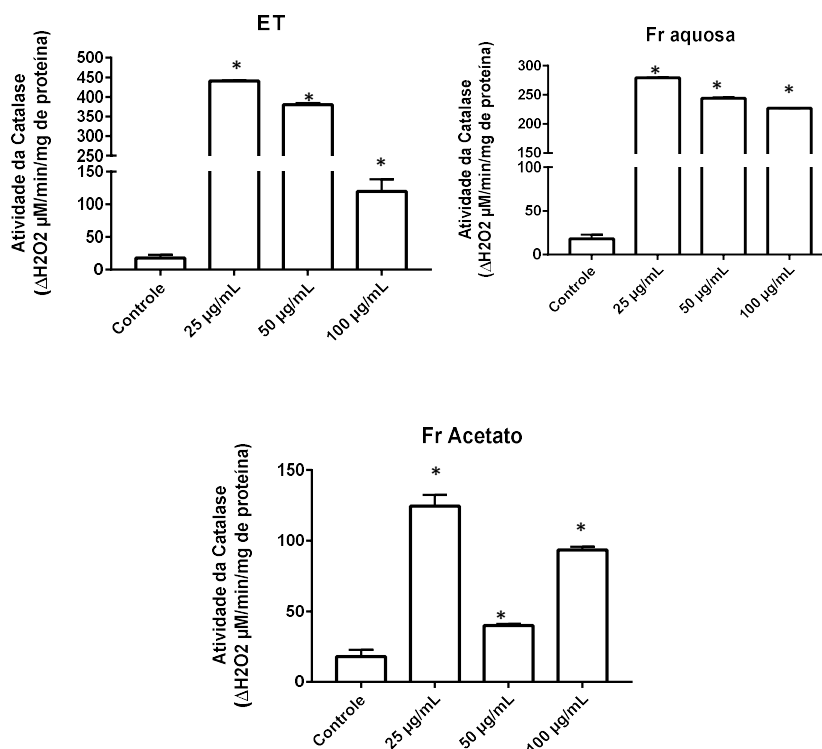


Figura 15. Atividade da enzima catalase com indução do estresse.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 5.8, e o lisado celular foi utilizado para avaliar a atividade da enzima catalase através do monitoramento do consumo de H_2O_2 30

mM em espectrofotômetro. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro médio, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ em relação ao controle).

5.7 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um indicador do estresse oxidativo e está envolvida em diversos processos patológicos. Os lipídeos são responsáveis pela manutenção da integridade das membranas celulares, e o processo de peroxidação dos lipídeos altera a composição, estrutura e a dinâmica da membrana lipídica. Como compostos altamente reativos, os peróxidos de lipídeos são também capazes de promover maior propagação da geração de ROS além de causar danos a outras biomoléculas, como o DNA e as proteínas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

A resposta causada pela peroxidação lipídica em células HHF-1 lipídica após serem expostas ao tratamento com RUV, assim como em células não expostas, foi avaliada pela determinação dos níveis de MDA, expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹. Os resultados obtidos mostraram que, em células não irradiadas, os tratamentos não modificaram significativamente o nível de peroxidação lipídica das células. A irradiação com UVA aumentou significativamente os níveis de peroxidação lipídica das células. Por sua vez, nas células tratadas com os extratos de cranberry e submetidas à radiação UVA foi observado que os níveis de MDA diminuíram substancialmente, particularmente nas células tratadas com o extrato total (ET) e com a fração de acetato de etila (Fr Acetato), com uma diminuição menor observada para as células tratadas com a fração aquosa, o que indica que as três amostras foram capazes de reduzir os efeitos do estresse oxidativo que resultam da peroxidação lipídica.

Esse resultado era esperado dada a presença de compostos cujo caráter é antioxidante e dada a atividade antioxidante tanto do ET como da Fr Acetato (Figura 16), as quais foram as mais ativas frente ao sequestro do radical DPPH.

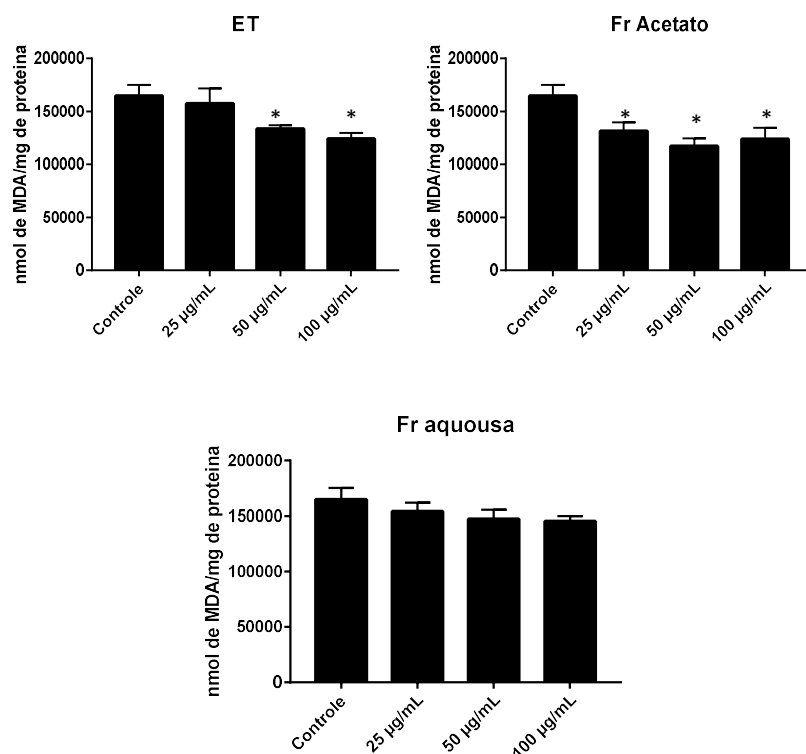


Figura 16. Avaliação da peroxidação lipídica em células não irradiadas e tratadas.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 5.9, e o lisado celular foi utilizado para avaliar os níveis de peroxidação lipídica através do monitoramento da produção de malondialdeído por método espectrofotométrico. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ em relação ao controle).

As células que foram irradiadas e posteriormente tratadas com as diferentes amostras ET, Fr acetato e Fr aquosa, mostram uma diminuição na formação dos produtos da peroxidação lipídica, quando comparados com o controle. Foi possível observar a diminuição de produtos da peroxidação lipídica em células tratadas com ET (Figura 17) nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, em 2,72; 2,97 e 3,14 vezes, respectivamente quando comparados ao controle. A Fr acetato (Figura 17) mostrou que foi capaz de diminuir a concentração do MDA nas correspondentes concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em 3,50; 3,83 e 5,02 vezes respectivamente, evidenciando a relação da concentração com a atividade, assim como ocorreu no trabalho de RUEL et al., 2008. Ruel e colaboradores mostraram que os antioxidantes do cranberry diminuem a oxidação de LDL induzida por íons metálicos *in vitro*.

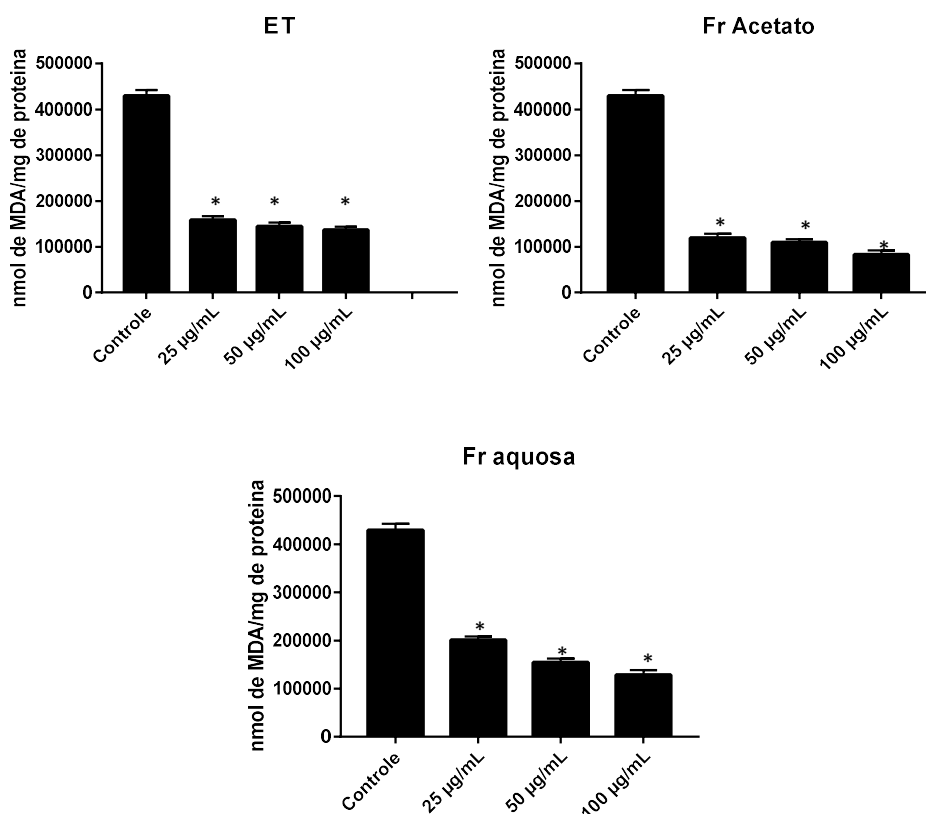


Figura 17. Avaliação da peroxidação lipídica em células irradiadas e tratadas.

Fibroblastos dérmicos foram tratados como descrito no item 5.9, e o lisado celular foi utilizado para avaliar os níveis de peroxidação lipídica através do monitoramento da produção de espécies de malondialdeído espectrofotômetro. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ em relação ao controle).

No estudo realizado por MANACH et al., 2005, foi descrito que o tecido do intestino ao ser tratado com extratos de cranberry mostraram uma diminuição na ação oxidativa e, como consequência direta, a quantidade de MDA também diminuiu, o que poderia estar associado à presença de outros polifenóis, além das proantocianidinas. NARDI et al., 2016, relataram que estudos em camundongos tratados com dieta especial e cranberry a 10% tiveram uma diminuição no grau de peroxidação lipídica, e relacionaram o teor de fenóis com a atividade.

O efeito da fração Fr aquosa na redução da peroxidação nas células irradiadas está mostrada na Figura 17. O efeito na diminuição da peroxidação lipídica, de 2,08; 2,71 e 3,25 vezes, compradas ao controle, para os tratamentos com as

concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente, mostra um efeito menor desta fração do que o efeito observado para as outras amostras. No entanto, a maior concentração deste tratamento apresentou um efeito similar ao tratamento com a menor concentração da Fr acetato. A possível presença de outros compostos com capacidade antioxidante pode estar relacionada com a ação observada, que quanto maior concentração utilizada mostrou um efeito maior.

5.8 Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS)

A determinação das ROS intracelulares foi realizada através da reação entre a fluoresceína e as ROS que pode ser quantificada por fluorescência a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os resultados foram expressos como intensidade de fluoresceína.mg de proteína⁻¹.

O tratamento das células não expostas (não irradiadas) ao estresse oxidativo com o extrato total e as frações de acetato de etila nas três concentrações não promoveu alterações nos níveis intracelulares de ROS, comparados com o controle não irradiado, a intensidade da fluorescência permaneceu constante. No entanto, a fração aquosa causou um leve aumento nos níveis de ROS intracelular, o que pode estar relacionado com a pouca presença de espécies químicas com capacidade antioxidante ou com o efeito pró-oxidativo de alguns compostos em determinadas condições (Figura 18).

Por outro lado, quando foi induzido o estresse oxidativo com radiação UVA, e as células foram tratadas, foi possível observar inicialmente que o extrato total na concentração de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ mostrou um comportamento capaz de diminuir a intensidade da fluoresceína comparado com o controle, sendo significativamente diferente do mesmo. Contudo, a concentração de 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ deste tratamento não apresentou efeito protetivo, se mostrou significativamente diferente do valor de referência mas com um aumento nos níveis de ROS intracelulares. Por outro lado a concentração de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ deste tratamento, foi

capaz de manter os níveis de ROS iguais aos do controle, somente o tratamento com a concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de diminuir o nível de ROS intracelular, demonstrado pela diminuição da intensidade da fluorescência em 0,79 vez quando comparada com a intensidade do controle.

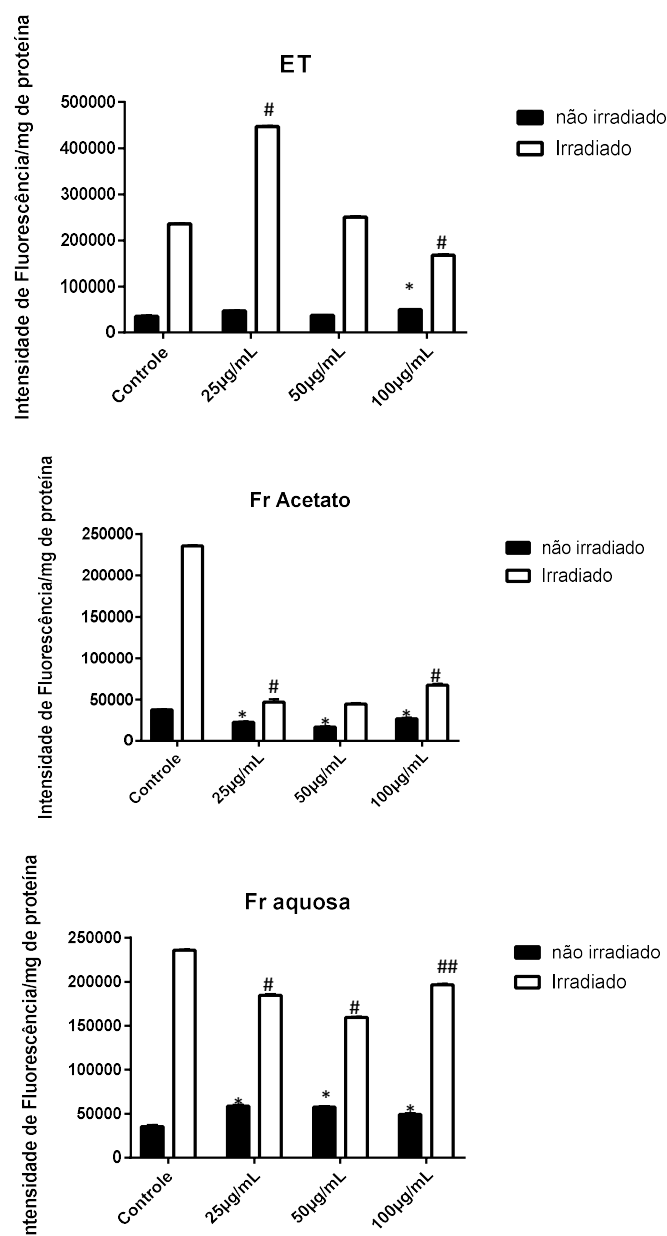


Figura 18. Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações do extrato bruto e das suas frações e, após 48 h foram tratadas com DCFH que é oxidada pelas espécies reativas de oxigênio a DCFoxi. A fluorescência deste composto foi detectada no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ em relação ao controle de células não tratadas; #, $p < 0,05$ em relação ao controle de células tratadas com radiação ultravioleta).

A fração acetato de etila (Figura 18), foi a que apresentou a melhor capacidade de diminuir os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio dentre os três extratos. Nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a diminuição de intensidade da fluoresceína em comparação ao controle foi de 5,05, 5,30 e 3,49 vezes respectivamente, sendo que as primeiras duas concentrações tiveram um comportamento similar, e a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que menos efeito teve na diminuição intracelular de ROS, reforçando assim a capacidade de proteção que esta fração tem apresentado até o momento, mostrando uma maior atividade do que o extrato total, o que provavelmente está relacionado com a variedade de fitocompostos presentes nesta, os quais se mostram mais ativos ou disponíveis para inibir a aparição de ROS celulares.

Finalmente para este ensaio, a fração aquosa (Figura 18) apresentou um efeito menor que a fração acetato de etila na inibição dos níveis de ROS intracelulares. O tratamento nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após a indução do estresse diminuiu em 0,78; 0,68 e 0,83 vezes, respectivamente, a intensidade de fluorescência observada quando comparadas com o controle; contudo as três concentrações diminuíram a intensidade da fluoresceína de forma significativa. Ao ser comparada com a fração acetato de etila e extrato total, que na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tiveram um efeito mais alto na inibição de ROS intracelular, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a fração aquosa teve um efeito melhor do que o extrato total, porém se manteve abaixo da capacidade da fração de acetato de etila, quanto à diminuição das espécies reativas de oxigênio.

Nos resultados obtidos com os tratamentos após a exposição à radiação UVA foi possível observar a indução do estresse e, como consequência, a produção de ROS celular e o dano oxidativo determinado com o aumento da intensidade na fluoresceína. Os resultados sugerem que os compostos de natureza antioxidante presentes nas frações do extrato têm um efeito positivo, apresentando boa capacidade em diminuir as ROS. Este é um efeito desejável ao tentar reduzir o envelhecimento cutâneo induzido pela RUV.

Embora as células da pele possuam seu próprio sistema de defesa para conter as ROS, esta sofre as consequências do envelhecimento natural e da

exposição crônica à RUV, levando ao estresse oxidativo que promove modificações na estrutura química do DNA, proteínas e lipídios, bem como induzem a produção de MMPs e fatores inflamatórios, o que resulta na apoptose dos fibroblastos (POURANG et al., 2022). Estes efeitos, por serem consequência das ROS, poderiam ser atenuados pelos tratamentos com os extratos de cranberry, especialmente a fração de acetado de etila, que diminuiu significativamente a presença destas espécies no meio celular, assim como a concentração mais alta ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato total e o tratamento com a fração aquosa, cujo efeito não foi o mais intenso, mas foi capaz também de atenuar os níveis das ROS, principalmente se considerado que os três extratos não apresentaram efeitos citotóxicos.

5.9 Avaliação da atividade agonista do extrato total e frações obtidas do cranberry às isoformas alfa, beta/delta e gama do PPAR

A avaliação da atividade do extrato e frações frente às três isoformas de PPAR (PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ) foi realizada com o objetivo de verificar a atividade agonista dos extratos frente ao PPAR, e, assim, verificar a possível ativação de diversas vias de sinalização envolvidas no controle da homeostase da pele.

Para isso foi realizado o ensaio de transfecção utilizando a bezafibrato como controle positivo do PPAR α , L-165041 como controle positivo do PPAR β/δ e rosiglitazona como controle positivo do PPAR γ .

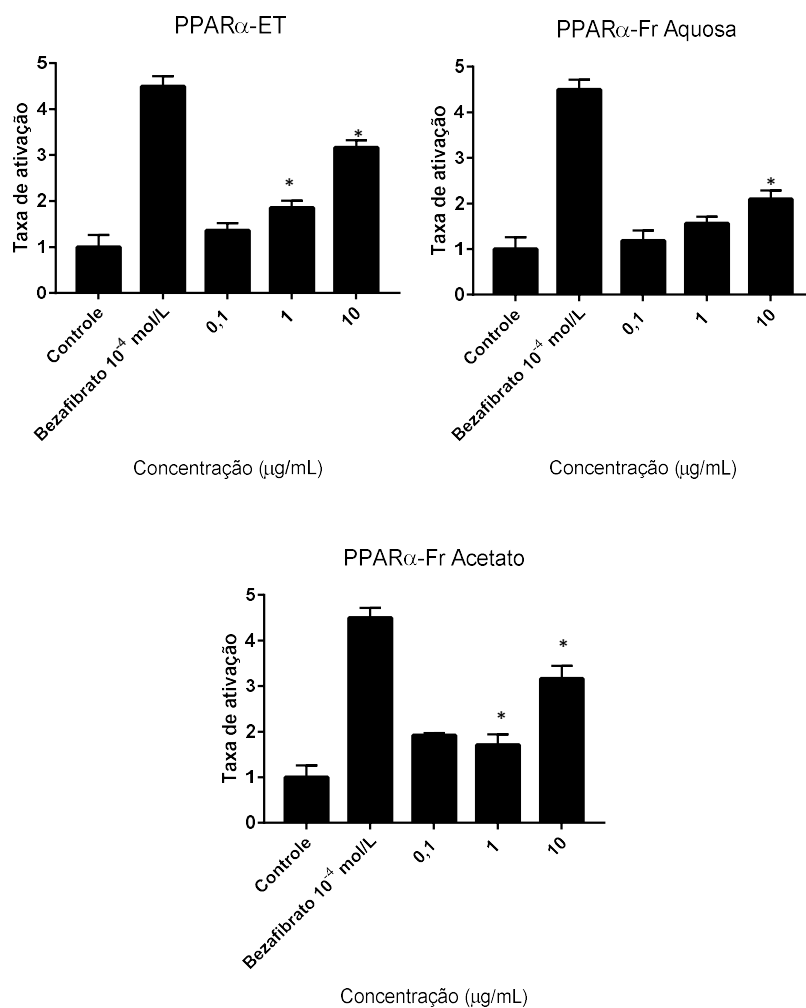


Figura 19. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPAR α . Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR α e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com o veículo DMSO Bezaafibrato 10^{-4} mol/L, e com as concentrações de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada tratamento: Extrato total; Fração acetato de etila; fração Aquosa. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro médio da atividade relativa da luciferase, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

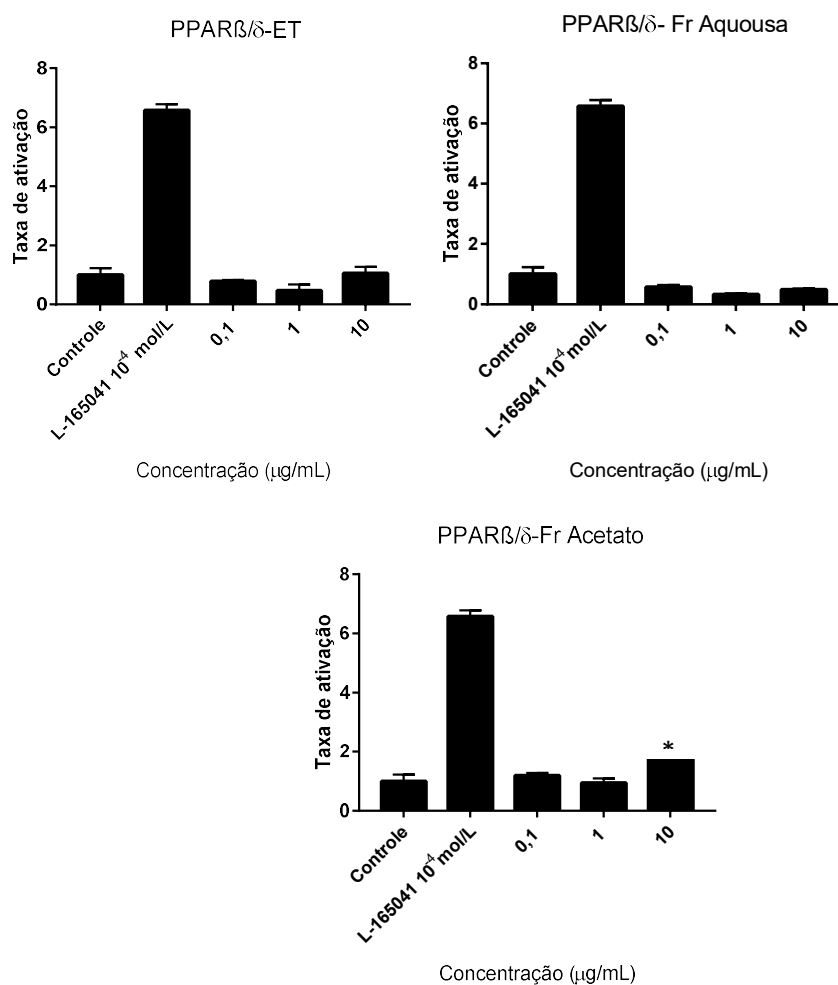


Figura 20. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPARβ/δ. L-165041 – agonista de PPAR β/δ.

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPARβ/δ e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com o veículo DMSO, L-165041 10⁻³ mol/L, e com as concentrações de 0,1 µg.mL⁻¹; 1 µg.mL⁻¹ e 10 µg.mL⁻¹ para cada tratamento: Extrato total: Fração acetato de etila; fração Aquosa. Os resultados apresentados representam a média ± erro médio da atividade relativa da luciferase, n = 3. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, p < 0,05 em relação ao controle).

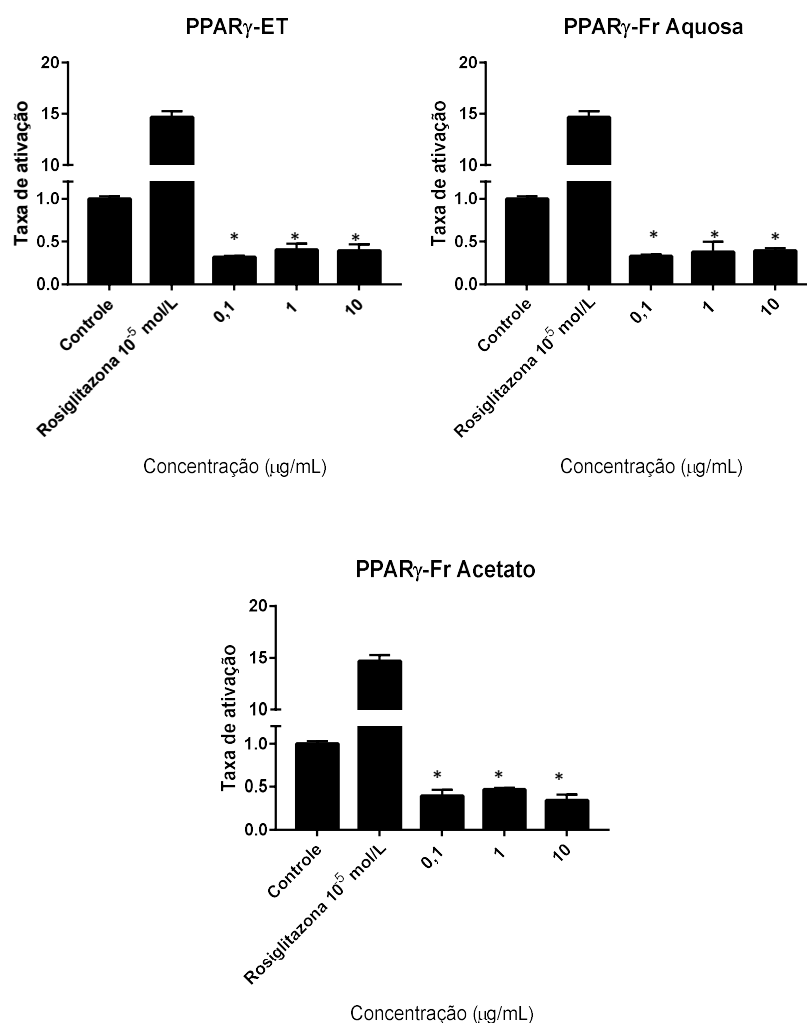


Figura 21. Avaliação da atividade agonista do extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e fração Acetato de etila (Fr AcOEt) frente ao receptor PPAR γ .

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR γ e com o plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase. O tratamento foi realizado com os veículos DMSO, Rosiglitazona 10^{-5} mol/L, e com as concentrações de 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada tratamento: Extrato total; Fração acetato de etila; fração Aquosa. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ erro médio da atividade relativa da luciferase, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (*, $p < 0,05$ em relação ao controle).

A importância dos receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma, PPARs, é crucial devido a desempenharem papel importante nas respostas inflamatórias relacionadas com a exposição à radiação UV, regulando as respostas anti-inflamatórias relacionadas com a idade, proliferação e

diferenciação celular, atividade antioxidante e função da barreira da pele. Existem em três isoformas, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , expressas na pele, cada um com funções definidas.

As isoformas, PPAR α e PPAR γ através do NF- κ B e da AP-1, controlam a expressão de MMP, além de regularem a expressão das enzimas catalase e SOD. O PPAR β/δ , presente nos queratinócitos e nos fibroblastos dérmicos, regula a expressão de proteínas da matriz extracelular, facilitando a cicatrização de feridas, controlando a expressão de MMP-1. Estas observações sugerem que a inibição mediada por PPAR β/δ da secreção de MMP-1 evita alguns efeitos do fotoenvelhecimento e mantém a integridade da pele, inibindo a degradação da matriz extracelular.

Nesse estudo foi avaliada a atividade agonista do extrato total e das frações de acetato de etila e aquosa do cranberry aos receptores PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Os resultados observados sugerem que o PPAR α foi ativado pelos extratos, quando as células foram tratadas com o extrato total, fração de acetato de etila e aquosa, e tiveram a resposta mais alta na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os três tratamentos (Figura 19); no entanto, a resposta foi menor do que o respectivo agonista específico mostrando que foram significativamente diferentes. O extrato total de cranberry nas concentrações testadas, assim como a fração aquosa deste extrato, não ativou o PPAR β/δ (Figura 20). Apenas a resposta da Fr acetato na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mostrou uma resposta significativamente diferente do controle negativo; não obstante, a resposta obtida foi muito menor que a do agonista específico. Finalmente, para o ensaio de transfecção do PPAR γ (Figura 21) os tratamentos não ativaram o receptor em nenhuma das três concentrações testadas.

A ação dos compostos polifenólicos foi discutida por CALDAS; COELHO; BRESSAN, 2018, que a descreve como claramente evidente ao efeito dos mesmos na sinalização celular, baseada principalmente pela ação que potencialmente se daria em algumas vias inflamatórias. Considerados em alguns casos como efeitos indiretos, estariam relacionados com a capacidade dos polifenóis de intervir no estado redox celular, enquanto outros seriam diretos, os

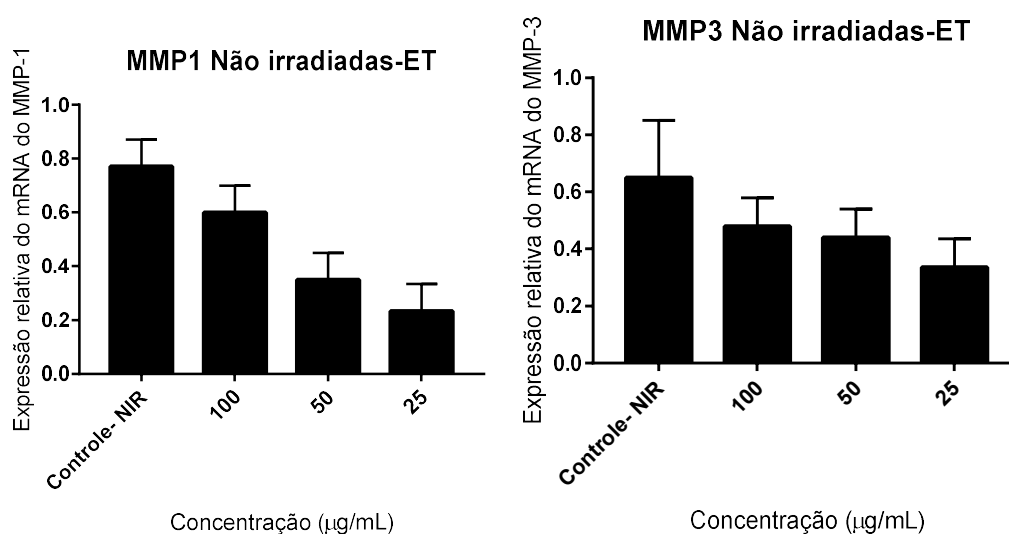
quais poderiam estar relacionados com a sinalização celular, sendo estes potenciais efeitos o bloqueio ou a regulação negativa dos receptores e fatores de transcrição, consequentemente provocando menor expressão de genes que promovem ação inflamatória, e, por sua vez, incluiria também as interleucinas e receptores *Toll-like* (TLR)-4, NF- κ B, assim como a proteína ativadora 1 (AP-1) e JNK. Uma outra ação seria a de ligante natural ao PPAR γ (Caldas et. Al, 2018).

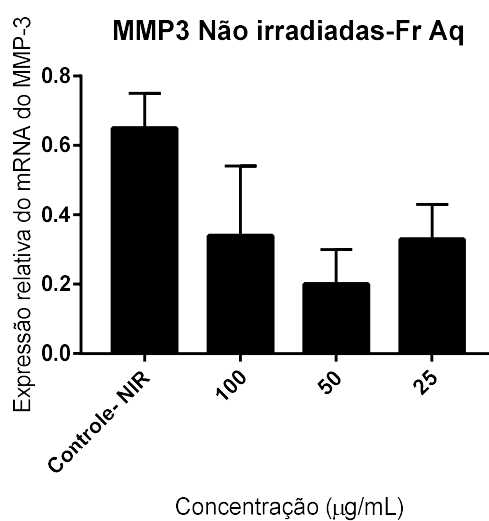
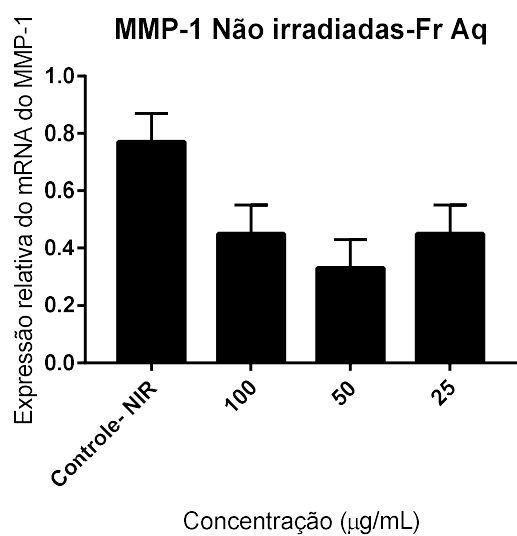
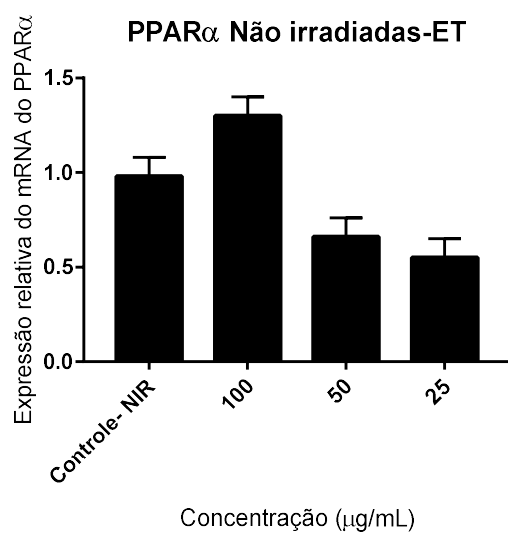
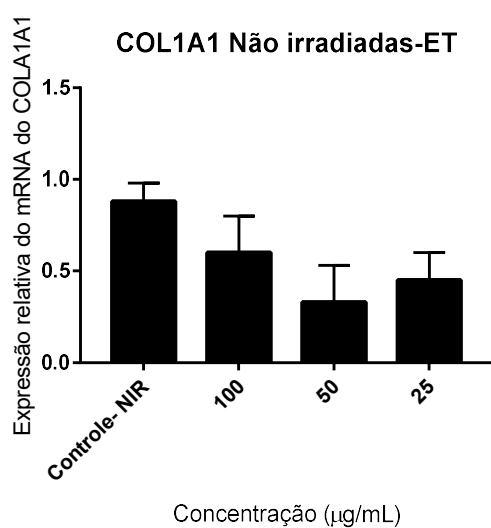
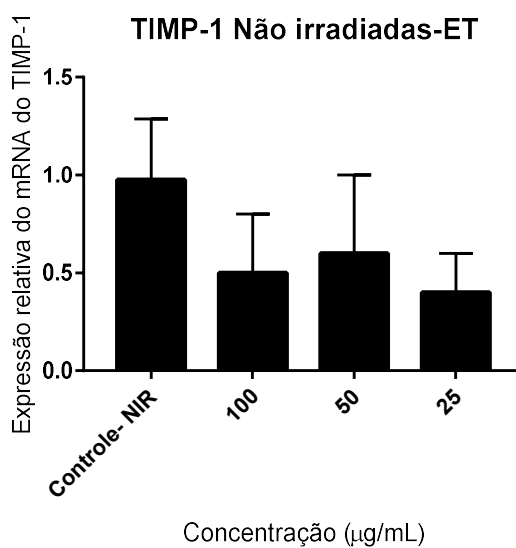
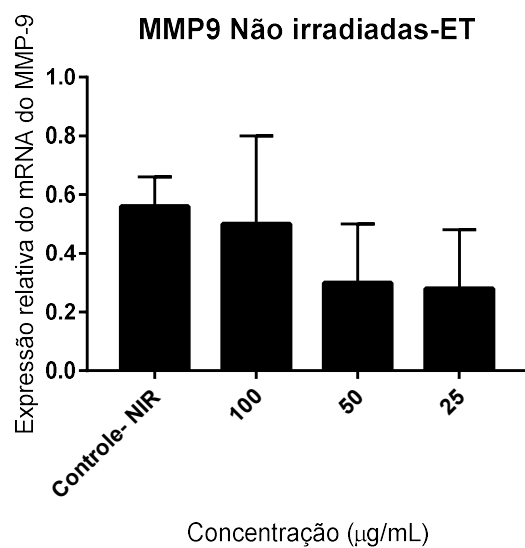
Os extratos de cranberry analisados não apresentaram efeito agonista ao PPAR γ , mas mostraram um efeito evidente como agonistas de PPAR α . Até o momento, existem poucos estudos que descrevem o tipo de resposta dos receptores PPAR α localizados na pele e tratados com o cranberry ou algum produto deste. SUN e colaboradores (2016) descreveram no seu estudo o efeito do cranberry nas vias que controla o aumento da β -oxidação de ácidos graxos e a diminuição do conteúdo de triglicerídeos no fígado o que resultou na diminuição dos níveis de lipídios plasmáticos de hamsters alimentados com cranberry, de igual forma ao reportado por FAYED et al., 2022, que descreveram o efeito metabólico em camundongos com obesidade induzida, após o tratamento com extrato de cranberry que incrementou a expressão do PPAR α .

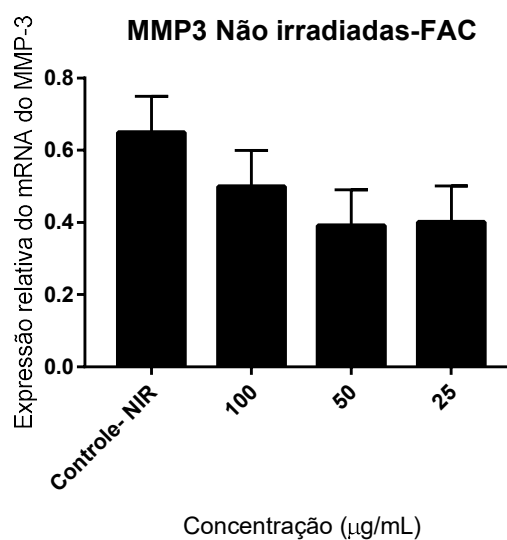
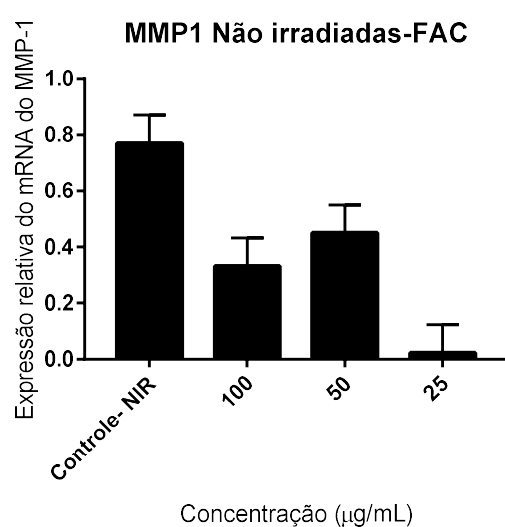
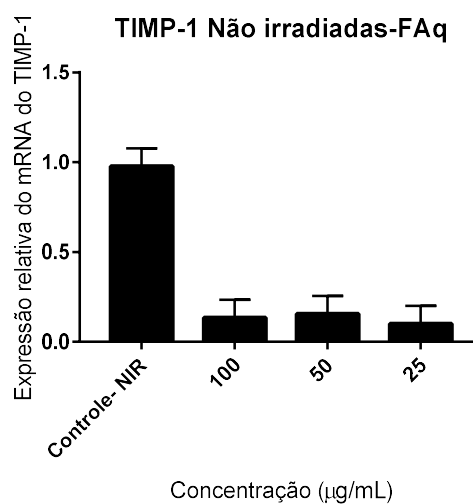
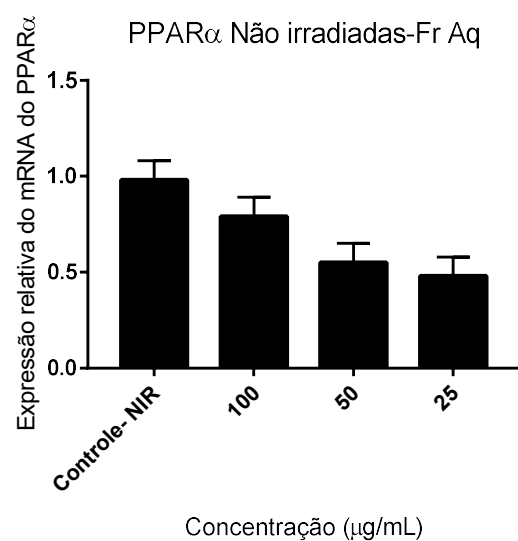
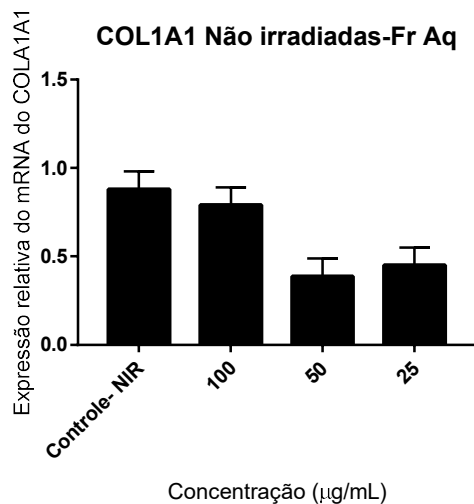
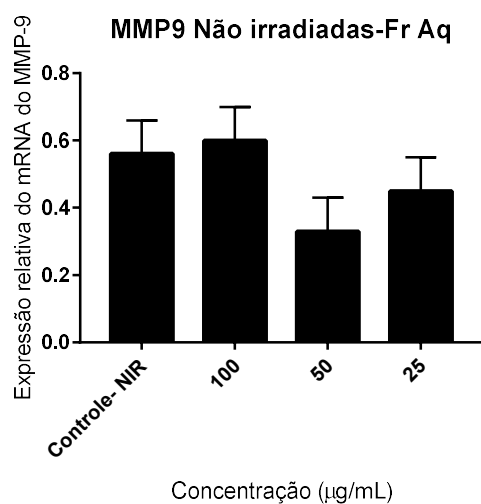
Na pele, o PPAR α regula genes responsáveis pela homeostase da barreira de permeabilidade, diferenciação epidérmica, biossíntese lipídica assim como o processo de inflamação. O PPAR- α regula a proliferação e diferenciação dos queratinócitos, predominantes na epiderme, o que é crucial na cicatrização de feridas e na recuperação da função de barreira da pele (MAJEWSKI; CRAW; FALLA, 2021). O efeito agonista de PPAR α apresentado pelos extratos pode ser considerado como um efeito importante no estímulo e promoção da síntese de colágeno, a fim de regenerar a pele danificada pela radiação UV (WONG et al., 2022).

5.10 Quantificação da expressão gênica relativa de alguns genes relacionados com a homeostase da pele

Inicialmente, sem a exposição das células HFF-1 à radiação ultravioleta foi observada a resposta na expressão do mRNA da *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *COL1A1* e *PPAR α* , e não houve aumento significativo na expressão do *PPAR α* , com o extrato total assim como a diminuição da expressão de *MMP-9* para o tratamento com a fração aquosa também não foi significativo. O extrato total promoveu a diminuição da expressão gênica de *MMP-1*, a fração aquosa promoveu a diminuição da expressão gênica de *MMP-1* e *MMP-3*, entretanto também diminuiu a expressão gênica de *TIMP-1* e *PPAR α* . A fração acetato promoveu a diminuição da expressão gênica de *MMP1* e *MMP9*, porém também diminuiu a expressão gênica de *TIMP-1*, *COL1A1*, e *PPAR α* . todos em comparação com o controle não irradiado (controle NIR células HFF-1 não-tratadas), conforme se observa na (Figura 22).







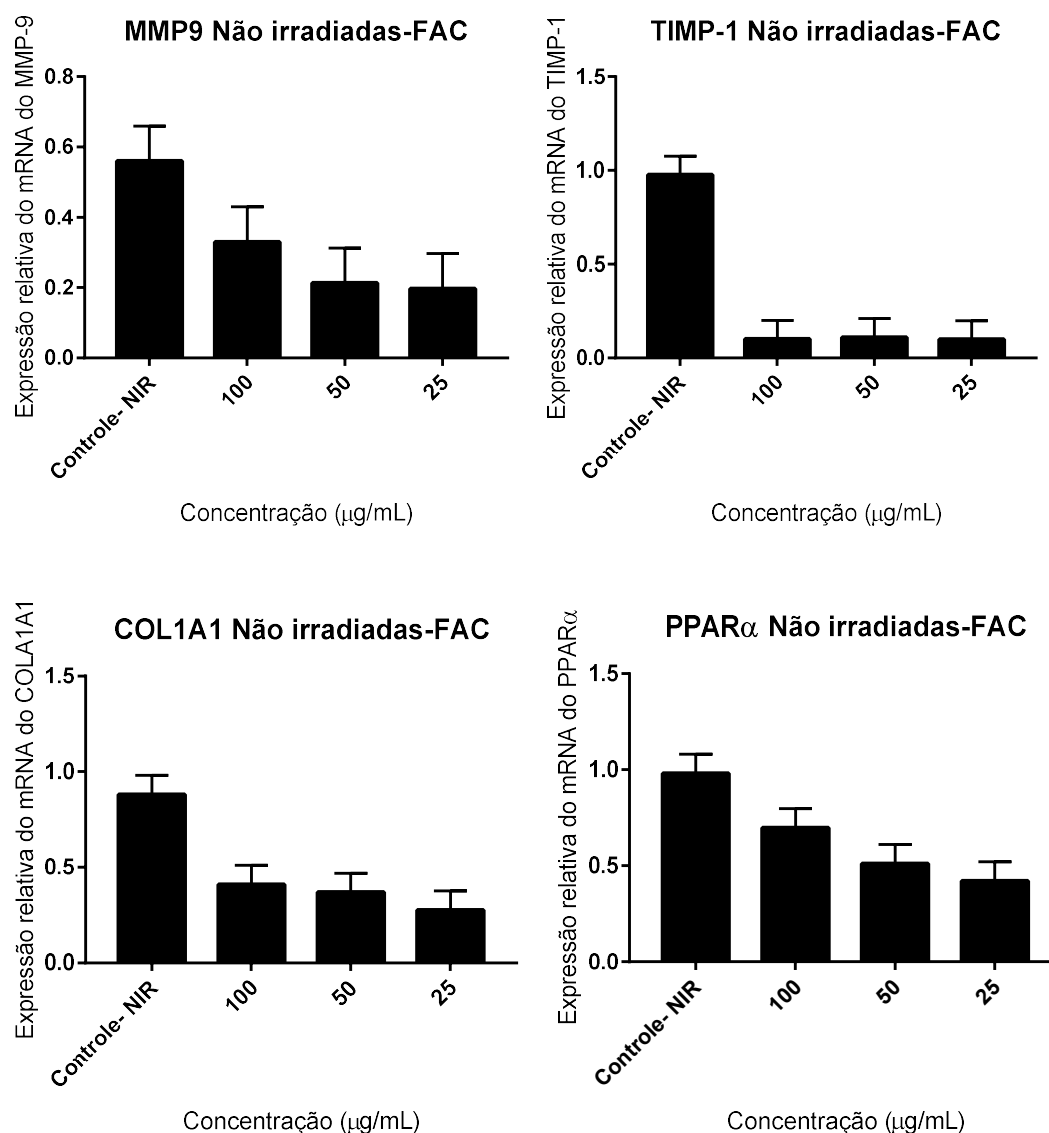
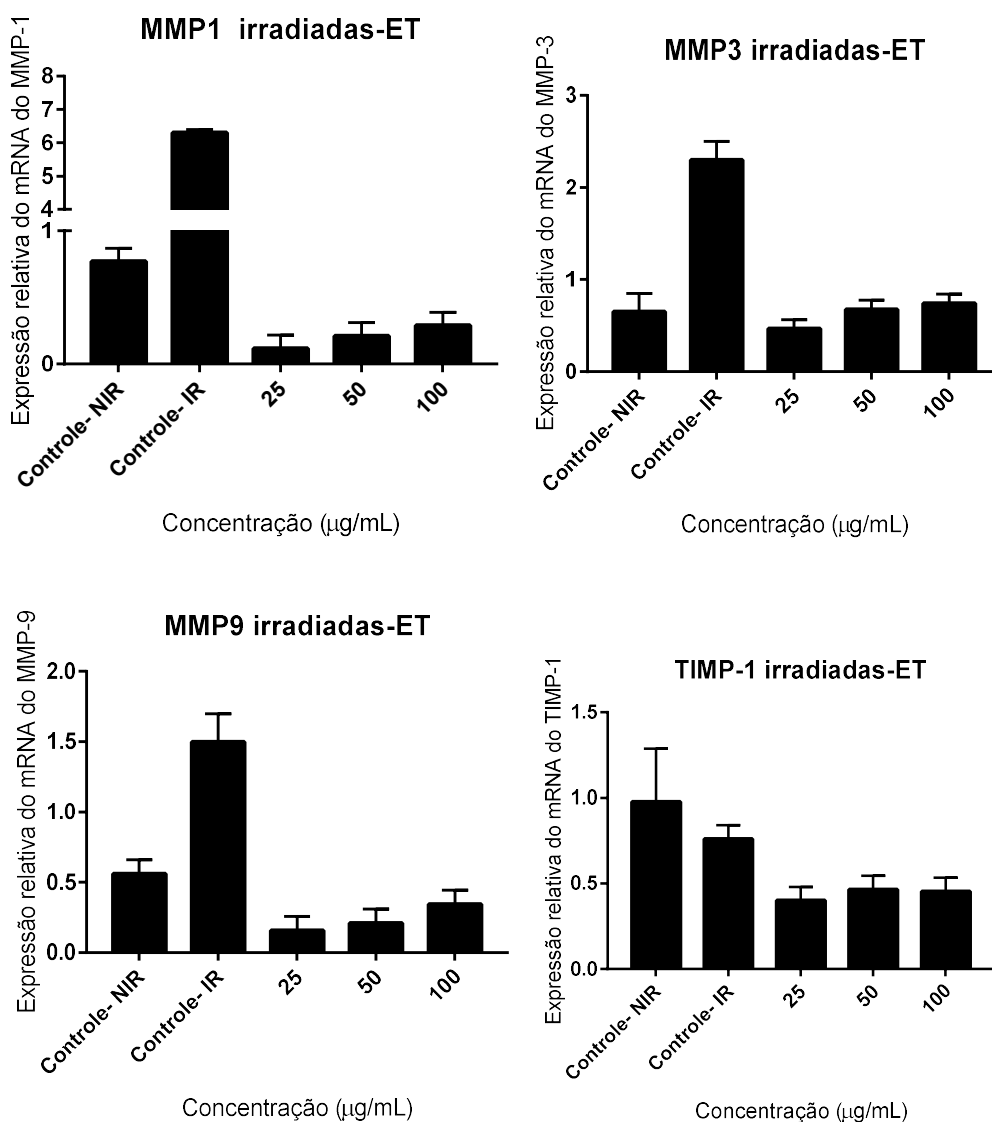
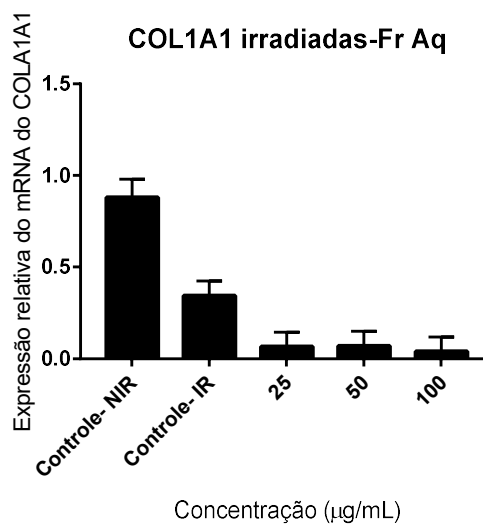
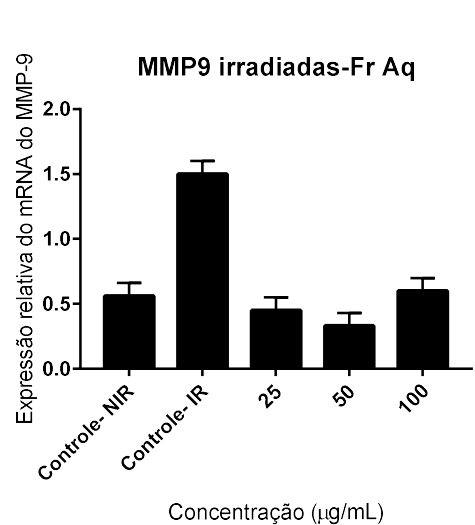
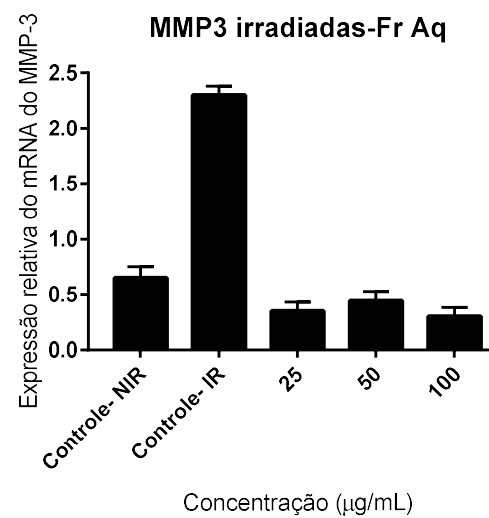
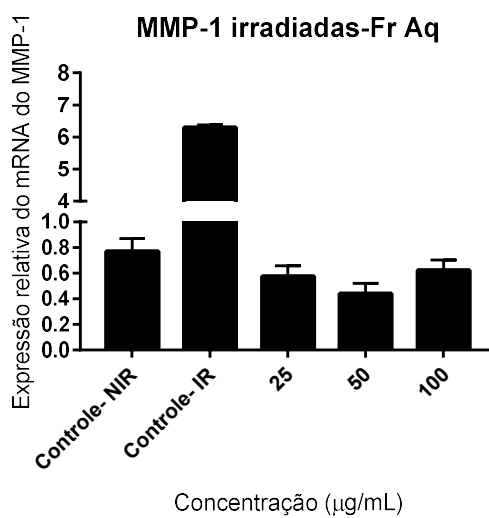
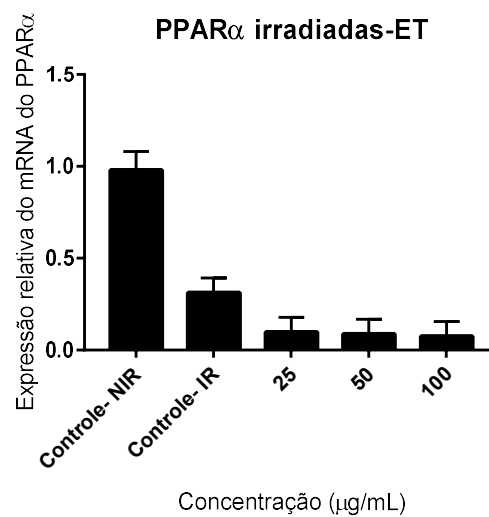
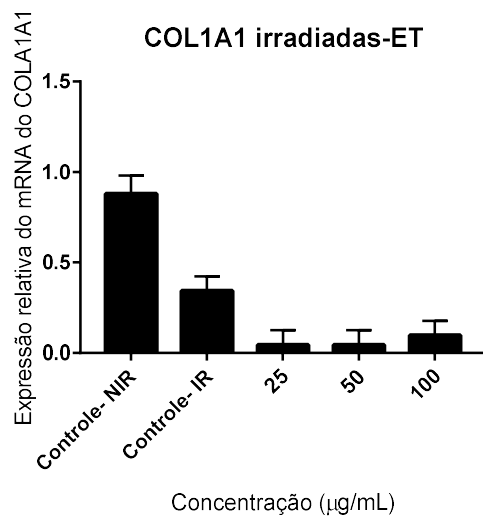


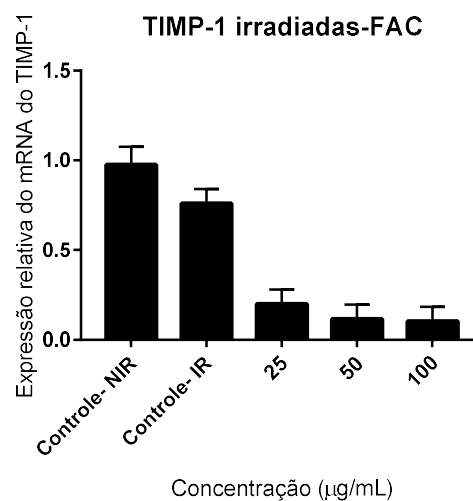
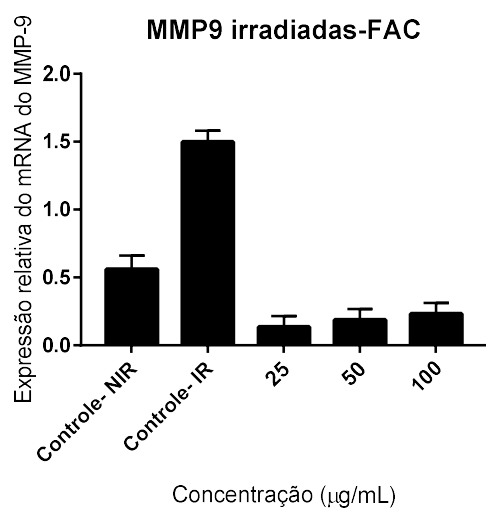
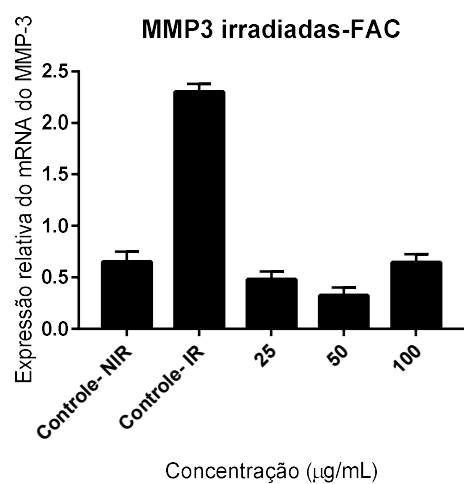
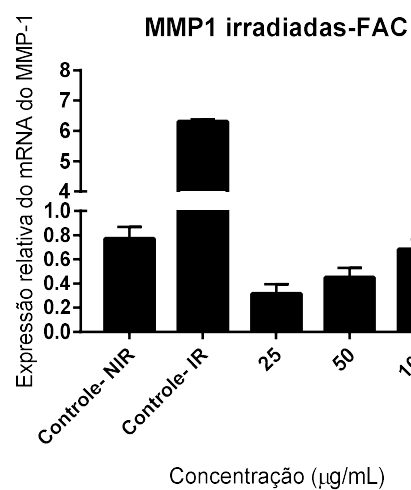
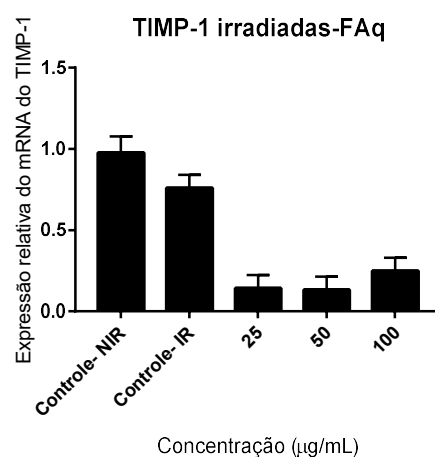
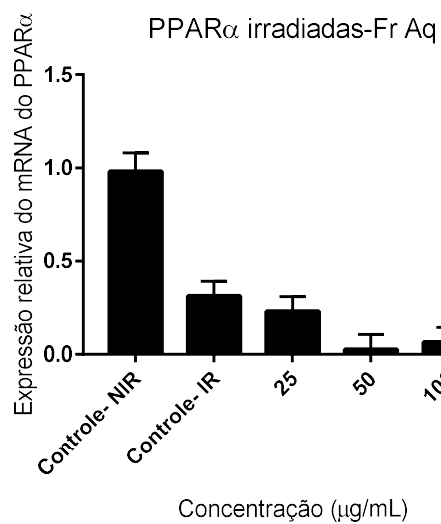
Figura 22. Influência dos tratamentos do cranberry em fibroblastos dérmicos humanos sem exposição à radiação UV, na expressão gênica relativa do mRNA de alguns genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica.

Fibroblastos dérmicos humanos tratados, RNA total extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *COL1A1* e *PPARα*, foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β -actina. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras tratadas com o extrato total, fração Acetato de etila e fração aquosa em comparação com as células não expostas ao estresse oxidativo por radiação UV e não-tratadas (controle-NIR). Os dados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 2$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

O efeito da exposição das células HFF-1 à radiação ultravioleta e posterior tratamento, foi observado de acordo com a resposta na expressão do mRNA da *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *COL1A1* e *PPAR α* , e foi observada a capacidade de diminuição da expressão pelo extrato total, frações acetato e aquosa de todas as MMPs avaliadas, entretanto todos os tratamentos também diminuíram a expressão gênica de *TIMP-1*, *COL1A1*, e *PPAR α* em comparação com o controle irradiado (controle-IR), conforme se observa na (Figura 23).







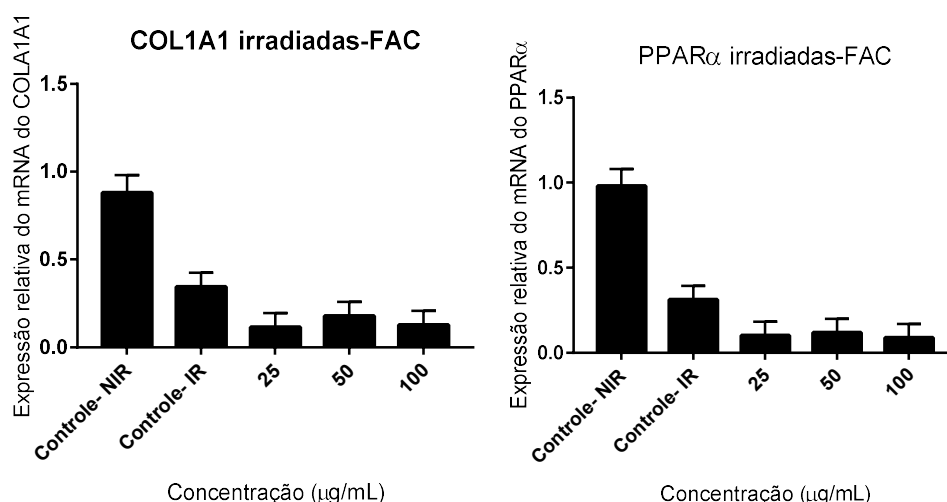


Figura 23. Influência dos tratamentos do cranberry em fibroblastos dérmicos humanos após exposição a radiação UV, na expressão gênica relativa do mRNA de alguns genes relacionados com a manutenção da homeostase da matriz extracelular dérmica.

Fibroblastos dérmicos humanos tratados, RNA total extraído das amostras foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. A expressão do mRNA dos genes *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *TIMP-1*, *COL1A1* e *PPARα*, foi normalizada pela expressão do mRNA do gene da β -actina. A expressão gênica relativa destes genes foi analisada nas amostras tratadas com o extrato total, fração Acetato de etila e fração aquosa em comparação com as células expostas ao estresse oxidativo por radiação (Controle-IR) UV e não-tratadas (controle-NIR). Os dados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 2$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.11 Ensaio de quantificação de colágeno no meio de cultivo das células.

Os resultados obtidos para a quantificação de colágeno no meio de cultivo das células HFF-1 mostraram que a exposição das células à RUVA causou um efeito de diminuição na quantidade de colágeno produzido, o que pode ser observado na comparação dos controles das células irradiadas e não irradiadas. As células não irradiadas que foram seguidamente expostas aos três tratamentos descritos, ET, FrAq e FrAcOEt em três concentrações diferentes, não mostraram aumento da produção de colágeno comparado com o controle tanto para células tratadas com ET como com a FrAq nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, assim como o tratamento com 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ da fração acetato. As maiores concentrações, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, das frações Faq e FrAcOEt aumentaram a produção de colágeno significativamente, quando comparadas com o controle. De forma geral, os

tratamentos foram capazes de ajudar na manutenção dos níveis de colágeno extracelular, o que poderia estar relacionado com o conteúdo e perfil fitoquímico desta espécie de plantas, possivelmente ligado ao teor de flavonoides e proantocianidinas (C NETO; A VINSON, 2011).

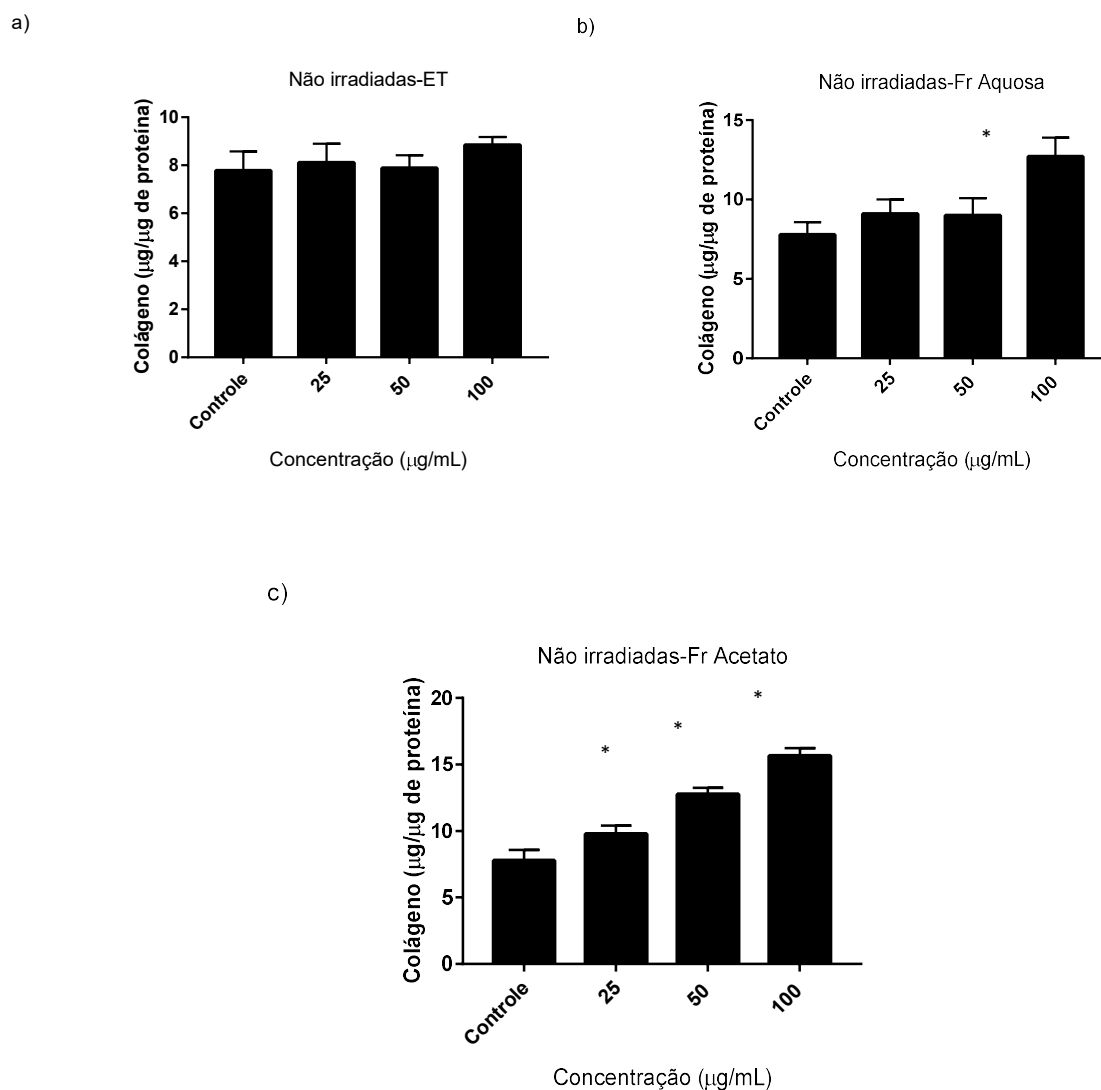


Figura 24. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF-1 tratadas com: a) o extrato total (ET), b) fração aquosa (FrAq) e c) fração acetato de etila (FrAcOEt).

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 3.15 e o meio de cultivo foi submetido a ensaio colorimétrico para quantificação de colágeno. Os dados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. (*, $p < 0,05$ em relação ao controle)

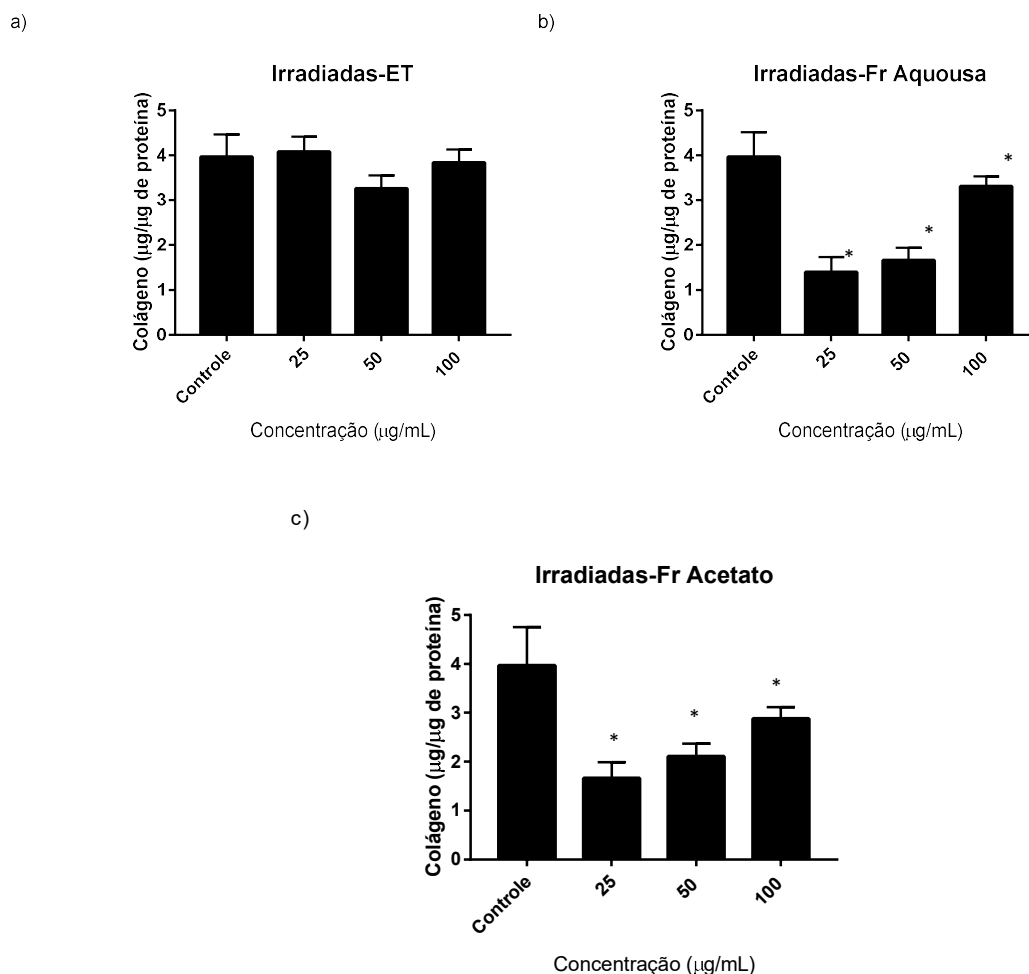
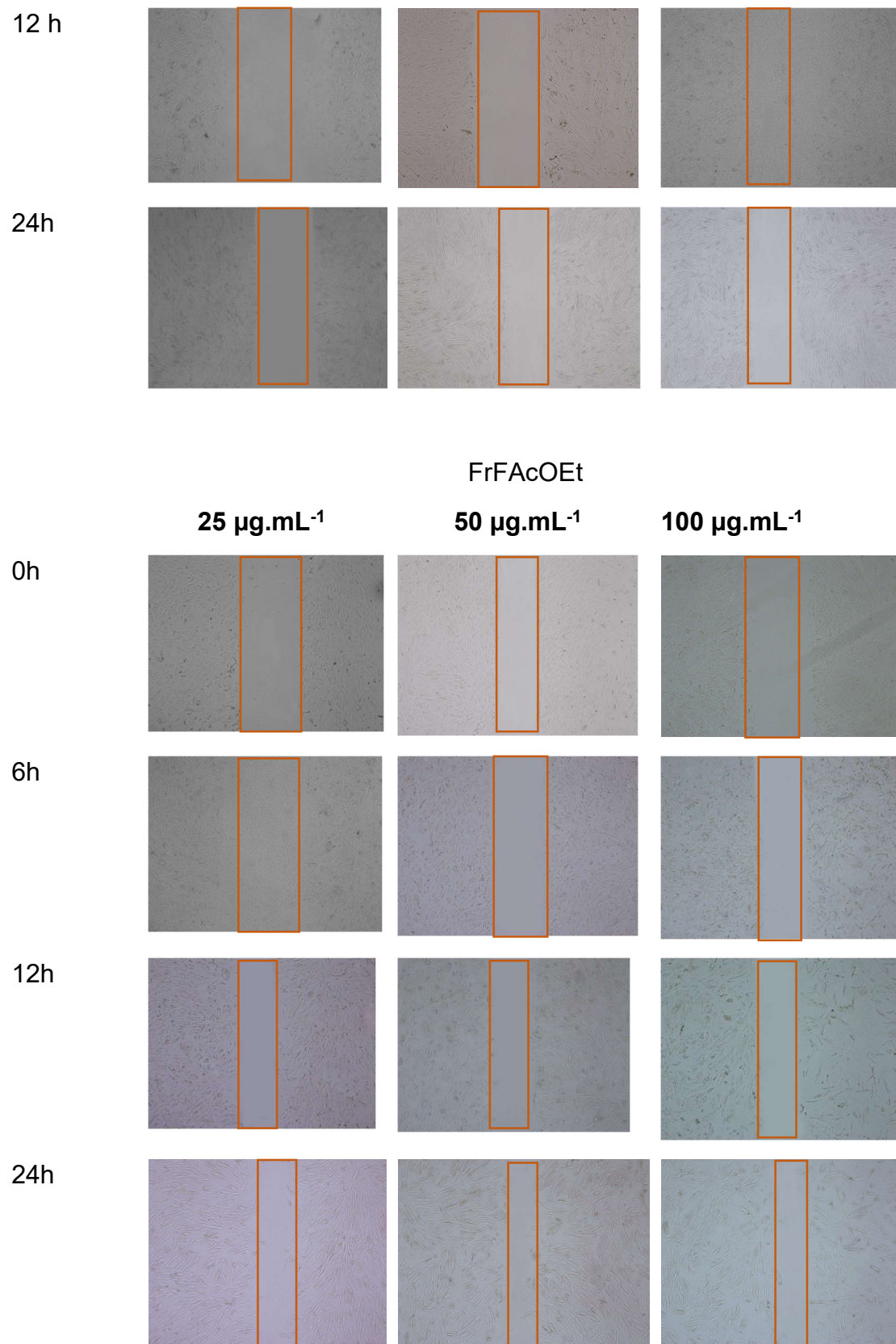


Figura 25. Quantificação de colágeno no meio de cultivo de células HFF-1 expostas ao estresse oxidativo induzido por UVA e, tratadas com o extrato total (ET), fração aquosa (FrAq) e com a fração acetato de etila (FrAcOEt).

Fibroblastos dérmicos humanos foram tratados como descrito no item 3.15 e o meio de cultivo foi submetido a ensaio colorimétrico para quantificação de colágeno. Os dados representam a média $\pm$ erro médio, $n = 3$. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

O efeito dos tratamentos, após a indução do estresse oxidativo através da radiação UV pode ser observado na Figura 25. Neste caso tanto o extrato total (ET) nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ se mostraram mais efetivas dentre todos os tratamentos, e quando comparadas com o controle as células tratadas com este extrato mantiveram os níveis de colágeno. No entanto, não houve aumento na produção de colágeno quando comparado com as células submetidas ao estresse oxidativo e não tratadas. Por outro lado, as frações Fr



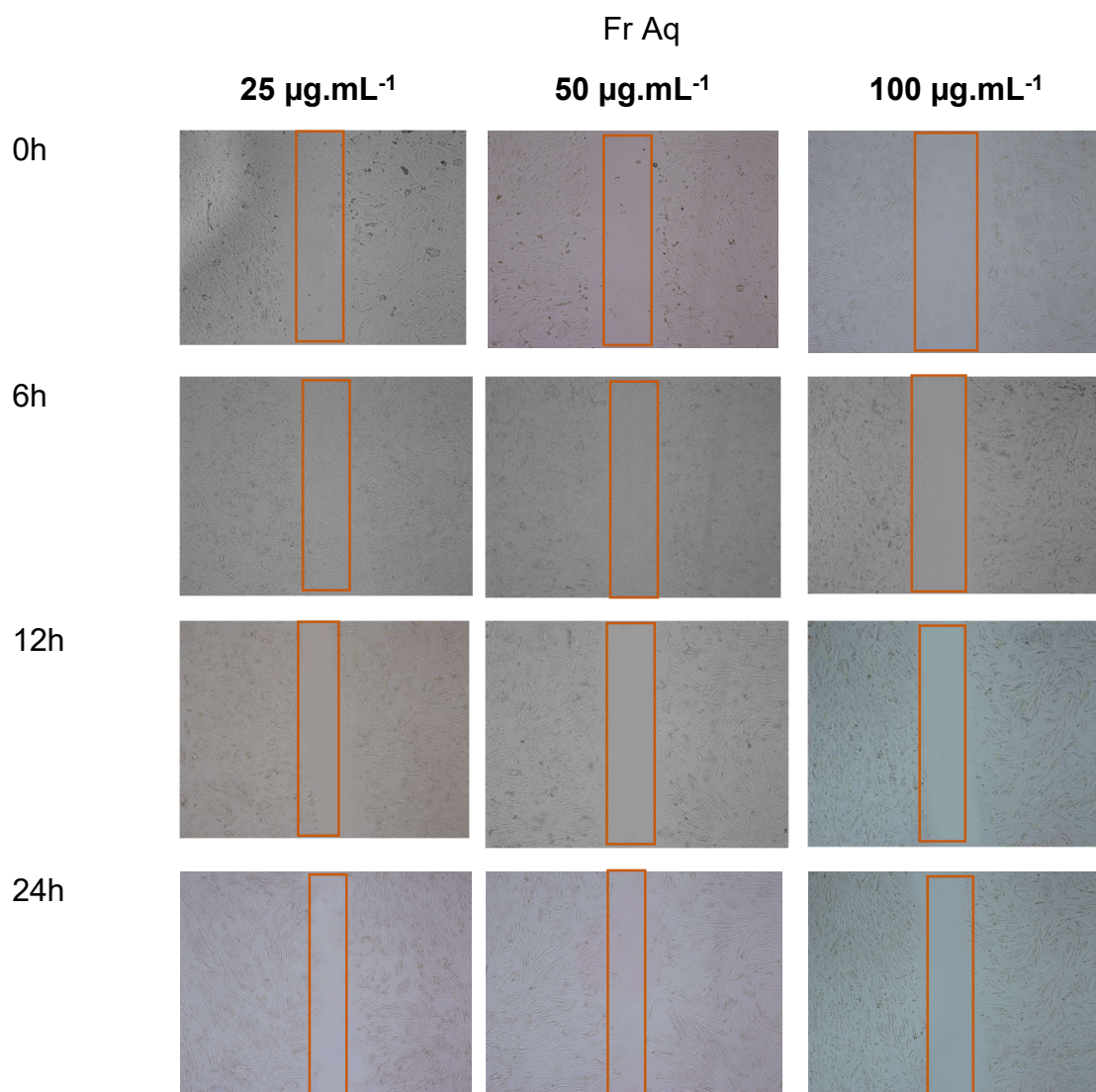


Figura 26. Fotomicrografia das culturas celulares para avaliação da migração celular *in vitro*.

Ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada de fibroblastos humanos (HHF-1) confluenta, após a indução artificial de uma lesão na monocamada celular. A resposta da lesão induzida seguida dos tratamentos extrato total ET, Fração aquosa (FrAq), Fracao Acetato de etila (FrAcOEt) foi acompanhada por 24 h. Os registros foram realizados no tempo 0 e 6, 12 e 24 h após o início do tratamento.

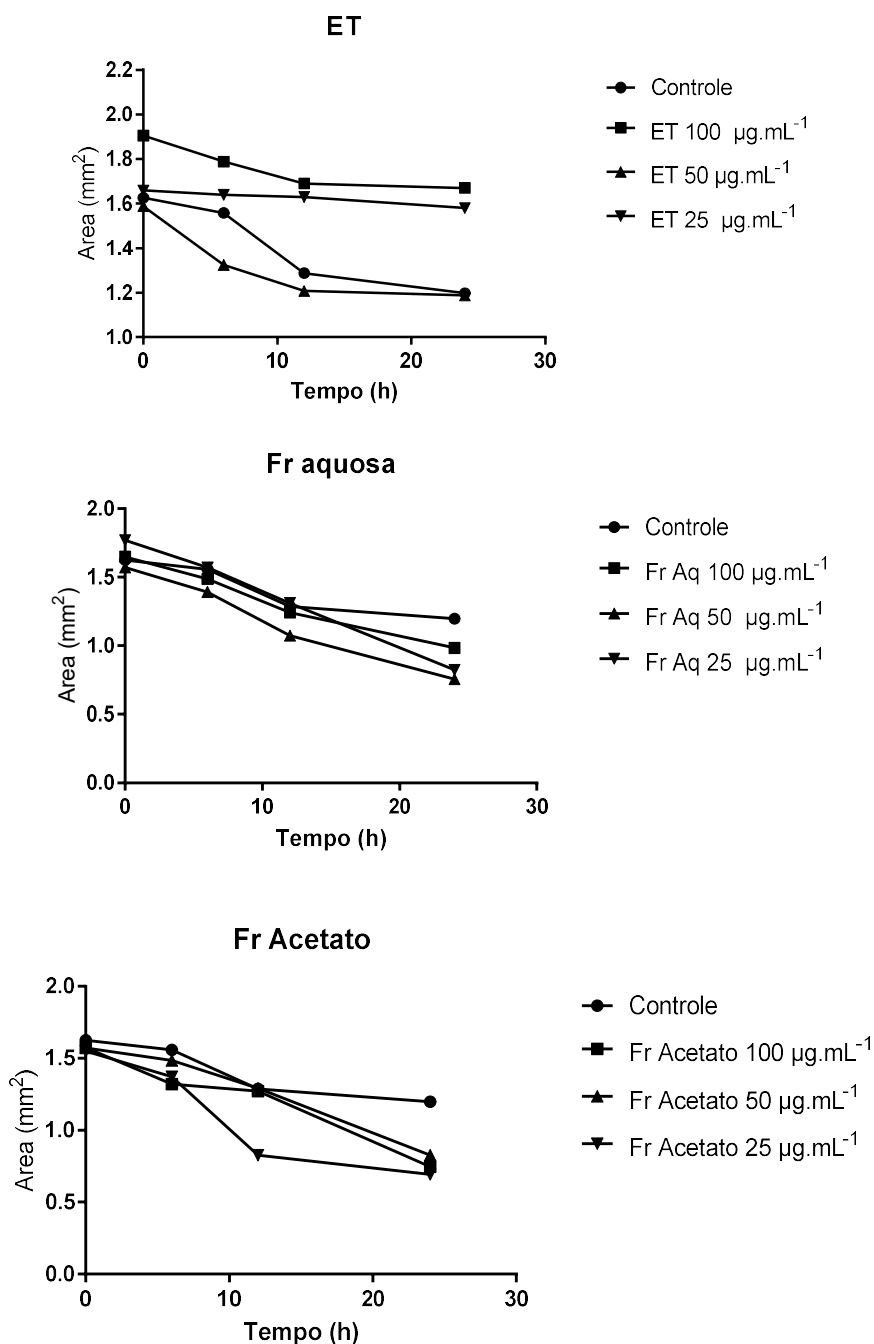


Figura 27. Efeito dos tratamentos com extrato total ET, Fração aquosa (FrAq), Fração Acetato de etila (FrAcOEt) na migração celular no *scratch* teste acompanhada por 24 h. Os dados são expressos em área (mm^2) da ferida sem tratamento e com tratamento nas concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$,

Este método se baseia na observação, após a criação de uma fenda em uma monocamada de células confluentes, da migração celular, e ocupação do

local da ferida, o espaço vazio. Neste processo, a interação de célula-célula estabelecida é muito importante para que aconteça esta migração celular, e está diretamente ligada a fatores de crescimento que poderiam ou não ser ativados durante os tratamentos e que, de igual forma, podem interferir no processo natural de cicatrização da pele.

A fração acetato de etila, apresentou a melhor resposta quanto à capacidade de fechamento do espaço criado artificialmente, quando comparada ao controle, sendo que as três concentrações do tratamento utilizadas no ensaio mostraram um comportamento similar. Contudo, a menor concentração, de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi a que se mostrou mais eficaz no fechamento da ferida. O tratamento das células com a fração aquosa também mostrou um bom resultado na migração celular, principalmente na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato total foi o menos efetivo na resposta de migração celular (Figura 27).

Os resultados sugerem que os tratamentos com a fração aquosa e acetato de etila promoveram a migração celular no corte mecanicamente realizado em cultura de células (fibroblastos HFF-1) em comparação com o controle. Esta capacidade poderia estar relacionada com a presença das proantocianidinas e compostos como epicatequina nos extratos, metabolitos comumente presentes nas espécies de *berries*. Esses compostos promoveriam tanto respostas celulares como moleculares que poderiam facilitar a cicatrização de feridas e o reparo de tecidos. Dentre os vários efeitos destes metabólitos na reparação e regeneração da pele, se considera que poderiam atenuar a resposta pro-inflamatória e, desta forma, estimular a reposta de cicatrização, assim como influenciar a dinâmica de interação célula-ECM, o que poderia estar ligado à sinalização via integrina, que promoveria particularmente a adesão e a migração celular, propriedades que determinam a capacidade regenerativa. Também tem sido relacionado a estes compostos o possível efeito na regulação de fatores teciduais proteolíticos, os quais contribuem para a remodelação da MEC e, de igual forma, promovem a fragmentação do colágeno em feridas, que é um fenômeno comum na pele envelhecida (ESPOSITO et al., 2019).

Vários estudos observaram a existência de certa capacidade antiangiogênica associada à presença das antocianinas. Na família dos *berries*, por outro lado, para os ácidos fenólicos encontram-se vários resultados que não

mostraram consenso sobre o seu efeito na migração celular e na angiogênese, assim como quais vias de sinalização eles são capazes de modular. Portanto, considera-se que podem ser atribuídos tanto ao perfil fitoquímico dos compostos fenólicos, presente neste tipo de frutos, à sua concentração e ao caráter complexo da composição dos extratos (TSAKIROGLOU et al., 2019). Assim, o efeito observado para os três tratamentos utilizados neste estudo pode ser considerado como positivo, principalmente nas frações aquosa e de acetato de etila, em que as três concentrações testadas no ensaio diminuíram a área ferida induzida substancialmente ao serem comparadas com a área do controle, podendo então estar relacionado com a presença das proantocianidinas e dos ácidos fenólicos, e, por outro lado, o efeito observado pelo extrato total, poderia estar relacionado com a complexidade fitoquímica do mesmo.

6. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram observar que tanto o extrato total do cranberry assim como a fração aquosa, com atividade antioxidante moderada, e a fração de acetato de etila, com alta atividade antioxidante, agem de forma positiva atenuando os danos causados pelo estresse oxidativo relacionados à peroxidação lipídica e geração das espécies reativas de oxigênio intracelular. Além disso, os extratos aumentam a atividade da catalase em células submetidas ao estresse oxidativo, o que poderia ter um efeito positivo no controle das ROS que modulam o equilíbrio entre a degradação e a produção de colágeno.

O tratamento das células com as frações do extrato promoveu o aumento dos níveis do colágeno extracelulares em células não irradiadas. Os mesmos tratamentos também mostraram um efeito positivo no fechamento dos cortes provocados nas culturas celulares. O extrato total foi capaz de ativar o PPAR α com a maior taxa de ativação, no entanto o receptor também foi ativado parcialmente pelas frações acetato de etila e aquosa, em células Hela.

O extrato total e suas frações diminuíram a expressão gênica de MMP-1, MMP-3 e MMP9 nas células irradiadas. Não houve aumento na expressão gênica de colágeno ou TIMP-1.

Mais estudos devem ser conduzidos para elucidar as vias de sinalização molecular que levaram à atividade sobre a expressão gênica encontradas nesse trabalho.

7. REFERENCIAS.

A COLE, M. et al. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. **Journal of cell communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 35–43, 2018.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

ALGE-PRIGLINGER, C. S. et al. Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 11, p. 5495–5503, 2009.

BELEBECHA, V. et al. Effect of the platelet-rich plasma covering of polypropylene mesh on oxidative stress, inflammation, and adhesions. **International Urogynecology Journal**, v. 31, n. 1, p. 139–147, 2020.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, abr. 1958.

BOOTH, N. L. et al. An innovative approach to the safety evaluation of natural products: Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaf aqueous extract as a case study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3150–3165, 2012.

BRENNEISEN, P. et al. Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 3, p. 515–524, 1997.

BROWN, P. N.; SHIPLEY, P. R. Determination of Anthocyanins in Cranberry Fruit and Cranberry Fruit Products by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Single-Laboratory Validation. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 94, n. 2, p. 459–466, 1 mar. 2011.

C NETO, C.; A VINSON, J. Chapter 6 Cranberry Catherine. In: F. F BENZIE, I.; WACHTEL-GALOR, S. (Eds.). **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2nd editio ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011. p. 1–35.

CALDAS, A. P. S.; COELHO, O. G. L.; BRESSAN, J. Cranberry antioxidant power on oxidative stress, inflammation and mitochondrial damage. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 582–592, 2018a.

CALDAS, A. P. S.; COELHO, O. G. L.; BRESSAN, J. Cranberry antioxidant power on oxidative stress, inflammation and mitochondrial damage. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 582–592, 1 jan. 2018b.

CAMPANINI, M. Z. et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153–160, 2013.

CÁSEDAS, G. et al. Anthocyanin profile, antioxidant activity and enzyme inhibiting properties of blueberry and cranberry juices: A comparative study. **Food and Function**, v. 8, n. 11, p. 4187–4193, 2017.

CHEN, P. X. et al. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 185, p. 298–308, 2015.

CHIANG, H. M. et al. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4260–4269, 2012.

DAO, C. A.; PATEL, K. D.; NETO, C. C. Phytochemicals from the Fruit and Foliage of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) - Potential Benefits for Human Health. In: PATIL, B. S. et al. (Eds.). **ACS Symposium Series**. 1. ed. Washington, DC: American Chemical Society, 2012. v. 1093p. 79–94.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, M. **In vitro evaluation of photochemography & phototoxicity of the standardized extract of Brosimum gaudichaudii in melanocytes**. [s.l.] University of Brasilia, 2018.

DENIS, M.-C. et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. **Clinical Science**, v. 128, n. 3, p. 197–212, 1 fev. 2015.

ESPOSITO, D. et al. Alaskan Berry extracts promote dermal wound repair through modulation of bioenergetics and integrin signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. SEP, p. 1–15, 2019.

FAYED, A. et al. Cranberry Extract; as a Promising Functional Food to Regulate SREBP1/PPAR- α /CPT-1/ACO Signaling Pathways in HFD-Induced Obesity in Rats. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 9, p. 527–534, 2022.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, 2017.

GRANATO, D.; KARNOPP, A. R.; VAN RUTH, S. M. Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 10, p. 1997–2006, 15 ago. 2015.

GU, Y. et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 59, p. 101036, maio 2020.

GUDŽINSKAITĖ, I. et al. Variability in the qualitative and quantitative composition and content of phenolic compounds in the fruit of introduced american cranberry (*Vaccinium macrocarpon aiton*). **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1–17, 2020.

HAZZIT, M. et al. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6314–6321, 2006.

HE, X.; RUI, H. L. Cranberry phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7069–7074, 2006.

HUANG, S. et al. The role of Smad2 and Smad3 in regulating homeostatic functions of fibroblasts in vitro and in adult mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 7, p. 118703, jul. 2020.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, jan. 2012.

KRISHNAESWARI, V. et al. Bioactive components of vaccinium macrocarpon and its antioxidant activity: an in-vitro study. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 1, p. 438–444, 2019.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIN, C. J.; BARBOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 330–340, ago. 2002.

LOPES DA FONSECA, L.; BRÁS DE OLIVEIRA, P. A planta de mirtilo. **Folhas de Divulgação AGRO 556, N.º2**, v. 556, n. 2, p. 23, 2007.

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.

MA, H. et al. Evaluation of Polyphenol Anthocyanin-Enriched Extracts of Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry for Free Radical Scavenging, Reactive Carbonyl Species Trapping, Anti-Glycation, Anti- β -Amyloid Aggregation, and Mic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 461, 3 fev. 2018.

MAJEWSKI, G.; CRAW, J.; FALLA, T. Accelerated barrier repair in human skin explants induced with a plant-derived ppar- α activating complex via cooperative interactions. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 14, p. 1271–1293, 2021.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230–242, 2005.

MORAES, D. C. **Desenvolvimento de um novo método in vitro para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do cranberry (Vaccinium macrocarpon A.)**. Ribeirão Preto: Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, 26 jun. 2018.

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.

NARDI, G. M. et al. Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. **PHARMACOGNOSY RESEARCH**, v. 8, p. 42–49, 2016.

NEMZER, B. V. et al. Cranberry: Chemical Composition, Antioxidant Activity and Impact on Human Health. Overview. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1–19, 2022.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OSZMIANŃSKI, J. et al. Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity in Different Cultivars of Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon* L). **Journal of Food Science**, v. 82, n. 11, p. 2569–2575, 2017.

P. LAWRENCE, K. et al. The UV/Visible Radiation Boundary Region (385–405 nm) Damages Skin Cells and Induces “dark” Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Human Skin in vivo. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

PAPPAS, E.; SCHAICH, K. M. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: Characterization, potential health effects, and processing stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 9, p. 741–781, 2009.

PARRY, J. et al. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3773–3778, 2006.

POURANG, A. et al. Effects of visible light on mechanisms of skin photoaging. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 38, n. 3, p. 191–196, 2022.

RUEL, G. et al. Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. **BRITISH JOURNAL OF NUTRITION**, v. 99, n. 2, p. 352–359, 2008.

SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; KAUPPINEN, A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. **Inflammation Research**, v. 71, n. 7–8, p. 817–831, 24 ago. 2022.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SUN, Q. et al. Cranberry Product Decreases Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 4, p. 427–433, 2016.

TSAKIROGLOU, P. et al. Role of berry anthocyanins and phenolic acids on cell migration and angiogenesis: An updated overview. **Nutrients**, v. 11, n. 5, 2019.

TURNER, A. et al. Coumaroyl Iridoids and a Depside from Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 253–258, fev. 2007.

VVEDENSKAYA, I. O. et al. Characterization of Flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 188–195, 2004.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51–66, 17 jan. 2010.

WONG, W. et al. Pgc-1 α controls epidermal stem cell fate and skin repair by sustaining NAD⁺ homeostasis during aging. **Molecular Metabolism**, v. 65, n. August, p. 101575, 2022.

XIAO, T. et al. Identification of Anthocyanins from Four Kinds of Berries and Their Inhibition Activity to α -Glycosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B by HPLC-FT-ICR MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6211–6221, 2017.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. Figure 1, p. 1–18, 2016.

Apêndice 1

COL1A1

COL1A1 (Forward) – 5' – CCCCAGAGGCTCTGAAGGTC – 3'

COL1A1 (Reverse) – 5' – GGAGCACCATTTGGCACCTTT – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 131 pares de bases

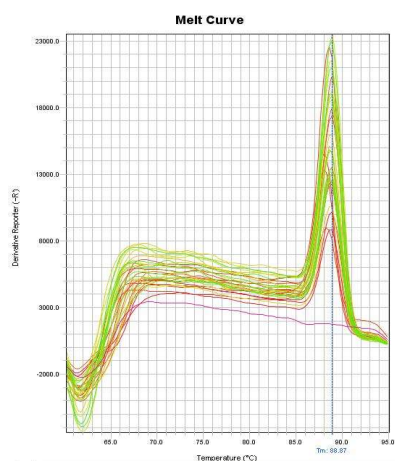


Figura 1. Curva de dissociação do *COL1A1*.

MMP-1

MMP-1 (Forward) – 5' – GGGGTATCCGTGTAGCACAT – 3'

MMP-1 (Reverse) – 5' – CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 76 pares de bases

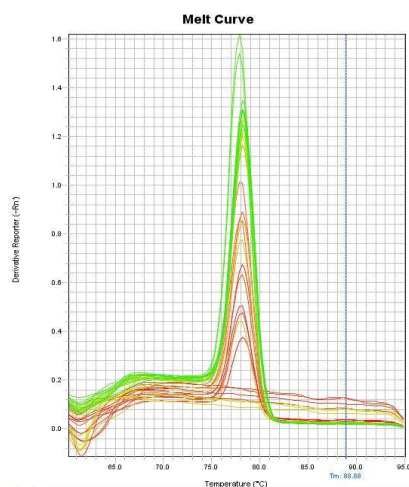


Figura 5. Curva de dissociação do *MMP-1*.

MMP-3

MMP-3 (Forward) – 5' – TTCAGCTATTTGCTTGGGAA – 3'

MMP-3 (Reverse) – 5' – CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 91 pares de bases

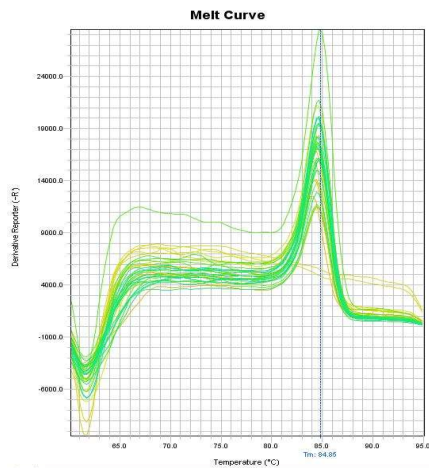


Figura 6. Curva de dissociação do *MMP-3*.

TIMP-1

TIMP-1 (Forward) – 5' – GAATGCACAGTGTTTCCCTGTTT – 3'

TIMP-1 (Reverse) – 5' – GTCCGTCCACAAGCAATGAG – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 72 pares de base

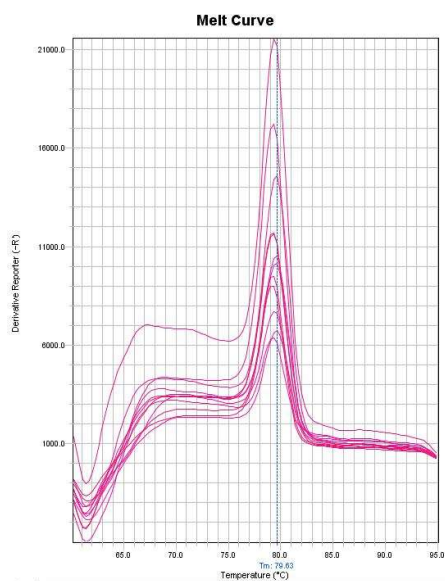


Figura 9. Curva de dissociação do *TIMP-1*.

PPAR α

PPAR γ (Forward) – 5' – TTCGCAATCCATCGGCGAG – 3'

PPAR γ (Reverse) – 5' – CCACAGGATAAGTCACCGAGG – 3'

Tamanho do produto de amplificação: 146 pares de base

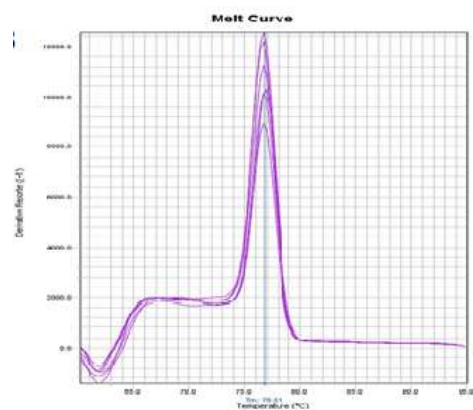


Figura 10. Curva de dissociação do *PPAR α* .