



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

**Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e
Cosméticos**

APOSTILA DO MINI-CURSO:

Estudo da atividade antioxidante e fotoprotetora de compostos naturais

**Celso Vataru Nakamamura
Fabianne Martins Ribeiro
Jéssica Carreira de Paula
Raíssa Benan Zara**

Maringá

2016

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	3
3.1 MEIO DMEM	3
3.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - DPPH	3
3.2.2 Pesagem e diluição das drogas	3
3.2.3 Ensaio	4
3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE FOTOPROTETORA	4
3.3.1 Obtenção da monocamada de células	5
3.3.2 Contagem de células	5
3.3.3 Preparo do pool e plaqueamento	5
3.3.4 Ensaio	6
3.3.5 Leitura (MTT).....	6
4 REFERÊNCIAS	6

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão do corpo humano mais constantemente exposto à radiação solar (GUARATINI et al., 2009). É um tecido de grande atividade metabólica e tem como funções a proteção física, microbiológica e bioquímica dos órgãos internos (KOHEN; GATI, 2000). O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico, que pode ser causado por diminuição da função metabólica (envelhecimento intrínseco) ou por fatores ambientais, principalmente pela radiação ultravioleta (envelhecimento extrínseco) (TANIGUCHI, 2012).

A radiação ultravioleta (RUV) solar é dividida em três categorias de acordo com seu comprimento de onda: UVC (200-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm) (PALM; O'DONOGHUE, 2007). Cerca de 99 % da RUV que atinge a superfície da Terra é do tipo UVA, considerando que a UVC é absorvida pela camada de ozônio (SVOBODOVA et al., 2006). UVB representa aproximadamente 1 %; tem menor capacidade de penetrar na pele do que a radiação UVA, porém é mais genotóxico (AFAQ, 2011). A RUV pode ser absorvida pela pele através pelos cromóforos. Os cromóforos e fotossensibilizadores são biomoléculas presentes na pele, como ácidos nucleicos; eumelanina, porfirinas; NADH (nicotinamida adenina dinucleótido); NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), entre outros. Em situações onde a exposição à RUV é excessiva os cromóforos podem transferi-la para o oxigênio molecular levando à produção de EROs (HECK et al., 2004).

A geração de EROs induzida por RUV é o principal mecanismo pelo qual inicia respostas moleculares na pele humana. Quando a produção de EROs excede a capacidade de defesa antioxidante celular instala-se uma situação de estresse oxidativo através da geração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e oxigênio singlete (1O_2) (POLJSAK; DAHMANE, 2012). Estas EROs são responsáveis por alterações no DNA nuclear e mitocondrial, modificação de proteínas e peroxidação lipídica causando a formação de fotoprodutos que comprometem a função das células da pele (ROVITO; OBLONG, 2013). Todo esse processo culmina em sinais visíveis do envelhecimento (SCOTTI, 2007), que se manifestam como rugas, aumento da espessura da pele, flacidez e pigmentação (KWON et al., 2013). Mais do que envelhecimento, a RUV pode induzir câncer de pele, o que causa grande preocupação aos responsáveis pela saúde pública. Segundo o INCA (2012), Instituto Nacional do Câncer, o câncer de pele compreende 25% dos tumores malignos incidentes no país, sendo assim o mais frequente.

O uso de filtros solares constitui uma das medidas preventivas ao câncer de pele e ao fotoenvelhecimento (GONZÁLEZ et al., 2008). Sua ação baseia-se na reflexão, dispersão ou

15 absorção da RUV em função da sua natureza química, que pode ser orgânica e/ou inorgânica (SERPONE et al., 2007). A incorporação de compostos naturais antioxidantes e ou/ anti-inflamatórios tem sido proposta para aumentar a eficácia dos protetores solares. Esta estratégia denominada de fotoquimioproteção, que consiste no emprego de fotoprotetores que poderiam também sequestrar as EROs gerados pela RUV, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos (FIGUEIREDO et al., 2014; F'GUYER et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar atividade antioxidante e fotoprotetora de substâncias naturais e sintéticas em fibroblastos da linhagem L929.

2.2 Específicos

- Verificar uma possível atividade antioxidante do composto pelo método do DPPH;
- Verificar a atividade fotoprotetora do composto em fibroblastos L929 irradiados com UVB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MEIO DMEM

O meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) foi desenvolvido por Harry Eagle. DMEM é adequado para o cultivo da maioria dos tipos de células humanas e animais. Possui uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular, sendo suplementado com 10% de soro fetal bovino.

3.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - DPPH

O ensaio DPPH é uma das etapas experimentais iniciais na busca de substâncias com atividade antioxidante. Como objetivo geral do experimento busca-se determinar o valor de EC₅₀ para dada substância, ou seja, a concentração na qual ocorra a inibição de 50% dos radicais DPPH[•] após 96 h de tratamento, quando comparado a um controle.

3.2.2 Pesagem e diluição das drogas

- Pesar a droga utilizando tubos Eppendorf[®] (**1 mg**);
- Adicionar 1000 µL de metanol ao eppendorf, agitar até completa dissolução do composto (solução estoque: **1000 µg/mL**);
- Identificar 6 outros tubos eppendorfs (Concentrações: **50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;
- Adicionar aos tubos identificados, respectivamente, 500 µL de metanol;
- Homogeneizar e transferir 500 µL da solução estoque para o tubo 1 (C: **50 µg/mL**);
- Homogeneizar o tubo 1 e transferir 500 µL deste para o tubo 2 (C: **25 µg/mL**);
- Assim sucessivamente até a concentração de **3,125 µg/mL**.

Preparo dos reagentes:

- **DPPH**: 1 mg + 1000 µl metanol (Solução estoque 1000 µg/ml)

$$\mu\text{M} = \frac{\mu\text{g/ml} \cdot 1000}{\text{PM}}$$

$$\mu\text{M} = \frac{1000 \cdot 1000}{394,32}$$

$$\mu\text{M} = 2.536,01$$

3.2.3 Ensaio

- Adicionar 100 µl de DPPH (**65 µM**) em placa de 96 poços;
- **Controle positivo**: 100 µl de DPPH e 100 µl de ácido ascórbico;
- **Controle negativo**: 100 µl de DPPH e 100 µl de metanol;
- Incubar a placa em temperatura ambiente no escuro por 30 minutos;
- Realizar a leitura em espectrofotômetro a 517 nm.

3.3 ENSAIO DE ATIVIDADE FOTOPROTETORA

O Ensaio de atividade fotoprotetora é uma metodologia de que permite verificar o potencial protetor de uma substância para determinada célula irradiada com radiação ultravioleta. Em nosso caso usaremos uma linhagem de fibroblastos (L929) como modelo, pelo ensaio do MTT. O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico baseado na viabilidade de redução enzimática da molécula de MTT para formazan, quando ele é exposto a células viáveis. O resultado da redução é uma mudança de cor da molécula de MTT. As medições de absorbância em relação a um controle permite determinar a percentagem de células remanescentes viáveis após o seu tratamento com um composto de ensaio.

3.3.1 Obtenção da monocamada de células

- Garrafas de cultura média contendo um tapete de células já fechado devem ser usadas como fonte de inóculo;
- Retirar o meio de cultura (DMEM) das garrafas e lavar o tapete de células com PBS;
- Adicionar tripsina às garrafas e permitir que a enzima aja por aproximadamente **30 s**;
- Observar as células ao microscópio invertido e caso estejam arredondadas bater no fundo da garrafa para completo descolamento do tapete de células;
- Adicionar meio de cultura até formar uma suspensão de **5 mL**, reservar em gelo;
- Transferir **100 µL** desta suspensão para um eppendorf contendo **900 µL** de meio DMEM e proceder a contagem das células (item 3.3.2);

3.3.2 Contagem de células

- Homogeneizar o tubo de cultura, colocar **20 µL** na Câmara de Neubauer;
- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf e proceder a contagem em Câmara de Neubauer (**Fig 1**), contando apenas as células presentes nos quatro quadrantes laterais (**regiões B**) de cada campo, dividindo o número total contado por quatro obtendo uma média;
- Multiplicar a média pelo fator de correção da câmara (10^4) e pela diluição (10)

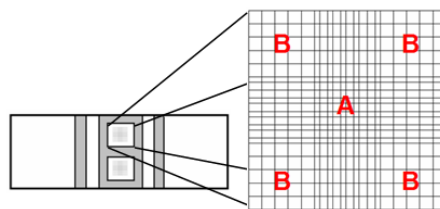


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

3.3.3 Preparo do pool e plaqueamento

- Preparar o pool contendo o volume de inóculo calculado, com célula e Meio de cultura com 10% de SFB em q.s.p. **15 mL** (inóculo de $2,5 \times 10^5$ células/mL);
- Distribuir **500 µL** da suspensão (pool) homogeneizada em cada poço;
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

3.3.4 Ensaio

- Lavar o poço duas vezes com tampão Hanks e irradiar com UVB, com 500 µL de Hanks;
- Retirar o Hanks e tratar com a amostra (EC_{50}) diluída em DMEM somente por 1 hora após a irradiação;
- Após o tratamento, incubar por 24 horas em meio DMEM livre de soro e sem amostra.

***Controle negativo (CN): não irradiado e não tratado**

***Controle positivo (UVB): irradiado e não tratado**

3.3.5 Leitura (MTT)

- Lavar o poço uma vez com PBS;
- Incubar com 500 µL de MTT (2mg/mL) por 4 horas;
- Ressuspender em 500 µL de DMSO;
- Transferir 100 µL para cada poço (triplicata) e realizar a leitura.

4 REFERÊNCIAS

AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p.144-151, 2011.

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

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M.; DA SILVA, C. A.; CUNHA, T. M.; DOS SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65-73, 2014.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-26, 2008.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32 (3), p. 717-721, 2009.

HECK, D. E.; GERECKE, D. R.; VETRANO, A. M.; LASKIN, J. D. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 288-297, 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de cancer no Brasil. 2012. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_57/v04/pdf/13_resenha_estimativa2012_incidencia_de_cancer_no_brasil.pdf. Acesso em: 04 dez 2013.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, n. 2-3, p. 149-157, 2000.

KWON, O. S.; JUNG, S. H.; YANG, B. S. Topical administration of manuka oil prevents UV-B irradiation-induced cutaneous photoaging in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 10, 2013.

PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 360-376, 2007.

ROVITO, H. A.; OBLONG, J. E. Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions. **British Journal of Dermatology**, v. 169, p. 15-24, 2013.

SCOTTI, L. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 153-166, 2007.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794-802, 2007.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 150, n. 1, p. 25-38, 2006.

TANIGUCHI, M; ARAI, N; KOHNO, K; USHIO, S; FUKUDA, S. Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. **European Journal of Pharmacology**, v.674, p. 126-131, 2012.