

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**Atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado de *Physalis
angulata* L. em cultura de queratinócitos humanos e seu
potencial como ativo dermocosmético**

JULIANA TIBÉRIO CHECON

PROF. DR. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, Campus
de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no
Programa de PG em Ciências
Biológicas - Farmacologia

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Checon, Juliana Tibério.

Atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato liofilizado de *Physalis angulata* L. em cultura de queratinócitos humanos e seu potencial como ativo dermocosmético / Juliana Tibério Checon. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21006008

1. Etnofarmacologia. 2. Agentes anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória; Cultura queratinócitos; Dermocosméticos; *Physalis angulata*.

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Dra. Maria Del Carmen Velazquez Pereda

Prof. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, pois ele é fruto de tudo o que vocês plantaram todos esses anos. Pai e mãe: é graças ao incentivo, apoio, insistência e dedicação de vocês que eu alcancei tudo isso. Vocês sempre me disseram que a educação seria a única herança que vocês deixariam, hoje sei que é também o bem mais valioso e poderoso que poderiam me dar. Sempre tentei aproveitar ao máximo as oportunidades que vocês me proporcionaram (sei que foram necessários muitos sacrifícios para isso) e espero que eu tenha correspondido a suas expectativas.

Por todo amor, carinho, compreensão, incentivo, dedicação, amizade, apoio, risadas, e por serem meu porto seguro eu agradeço minha mãe Paula, meu pai Wagner, minha irmã Cris, meus avós Noélia e Romeu, meus tios, tias, primos, padrinhos e amigos. A cada segundo ao lado de vocês eu aprendo mais sobre o que significa ser e ter família; é por toda força que temos juntos que estou aqui hoje.

Rodrigo, agradecer não é suficiente, você me apóia, incentiva, tem uma paciência enorme, me ensina e me socorre por opção, isso não tenho como agradecer! Você escolhe estar ao meu lado todos os dias encarando qualquer situação. A única coisa que eu posso dizer é que sou muito, muito sortuda de ter te encontrado. Te adoro. Grande parte dessa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho;
- ✓ Ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia;
- ✓ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro deste trabalho;
- ✓ À Chemyunion Química LTDA patrocinadora desse trabalho;
- ✓ Aos funcionários da Seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências;
- ✓ Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia – Instituto de Biociências;
- ✓ A todos os colegas do Laboratório de Fitomedicamentos LAFIT-Botucatu pelos ensinamentos e companheirismo, em especial, Leonardo por toda colaboração com a extração, Aline pela ajuda em ensaios *in vitro* e Ana por todas as trocas de experiências, conversas e ajuda em momentos importantes;
- ✓ A toda a equipe de Pesquisa e Desenvolvimento da Chemyunion, em especial, Cecília Nogueira, Marcos Rossan, Nilton Soares, Edson Katekawa, Samuel Highet, Gustavo Facchini, Camila Kappke e Divino Júnior pela contribuição técnica e científica neste trabalho, além de toda disposição e amizade;
- ✓ Ao Gustavo Dieamant e à Samara Eberlin que foram fundamentais para realização desse estudo e por todos os conhecimentos e experiências transmitidas, além de toda disposição, paciência e compreensão nessa fase tão confusa;

Gostaria agradecer de forma especial o **Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi** e a **Dra. Maria Del Carmen Velazquez Pereda** que acreditaram em meu potencial e abriram suas portas, oferecendo a oportunidade de realizar esse trabalho. Tenho muita sorte de poder trabalhar com vocês, pessoas ricas espiritualmente e profissionais completos, eficientes e éticos. Aprendi muito e amadureci intelectual, espiritual e profissionalmente com vocês, espero que nossa relação continue por muito mais estudos e projetos; ainda tenho muito a aprender com vocês. Tenham certeza que sempre estarei disposta a encarar novos desafios!

ÍNDICE

SIGLAS E ABREVIATURAS	01
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	02
RESUMO	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	08
1. A pele.....	08
1.1. Epiderme.....	09
1.2. Derme.....	11
1.3. Junção Dermo-Epidérmica.....	12
1.4. Hipoderme.....	13
2. A epiderme como parte do sistema imune.....	13
2.1. Inflamação.....	14
2.2. Queratinócitos e mediadores inflamatórios.....	17
3. Pesquisa e Desenvolvimento de produtos dermocosméticos.....	19
4. <i>Physalis angulata</i> L.....	21
5. Justificativa.....	23
OBJETIVOS	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Extrato de <i>Physalis angulata</i> L.....	27
2. Estudos <i>in vitro</i>	27
2.1. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular.....	28
2.1.1. Linhagem de fibroblastos humanos.....	28
2.1.2. Protocolo de incubação com a amostra.....	28

2.1.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método de XTT.....	29
2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	29
2.2.1. Linhagem de queratinócitos humanos.....	29
2.2.2. Protocolo de incubação com o extrato.....	30
2.2.3. Quantificação de prostaglandina (PGE2) e histamina.....	30
2.2.4. Quantificação das interleucinas IL-1 α , IL-6 e IL-10.....	31
3. Análise Estatística.....	32
RESULTADOS.....	34
1. Avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular do extrato hidrometanólico liofilizado de <i>Physalis angulata</i> (EHLPA).....	34
2. Avaliação do potencial anti-inflamatório <i>in vitro</i> do extrato hidrometanólico liofilizado de <i>Physalis angulata</i> (EHLPA).....	35
2.1. Efeitos do EHLPA na produção de histamina em cultura de queratinócitos humanos.....	35
2.2. Efeitos do EHLPA na produção de prostaglandina E2 (PGE2) em cultura de queratinócitos humanos.....	36
2.3. Efeitos do EHLPA na liberação das Interleucinas 1 alfa, 6 e 10 (IL-1 α , IL-6 e IL-10) em cultura de queratinócitos humanos.....	37
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	54

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

EHPLA: Extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata*

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-15: Interleucina 15

IL-1 α : Interleucina 1 alfa

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

JDE: Junção dermo-epidérmica

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MEC: Matrix extracelular

MMP: Metaloproteína

PUFA: Ácido graxo poliinsaturado

RUV: Radiação ultravioleta

TA: Temperatura ambiente

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

XTT: sodium 3' - α 1-(phenylaminocarbonyl) – 3,4-tetrazolium - bis (4-methoxy-6-nitro)
benzene sulfonic acid hydrate

ω -3: Ômega 3

ω -6: Ômega 6

ω -9: Ômega 9

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura básica da pele e seus apêndices. Adaptado de Costin & Hearing, 2007.....9

Figura 2. A epiderme organizada em camadas. Adaptado de Costin & Hearing, 2007.....11

Figura 3. Queratinócito como fonte e alvo de citocinas (adaptado de Gröne, 2002).....18

Figura 4. *Physalis angulata* L.....23

Figura 5. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata*, na viabilidade celular de fibroblastos humanos. Fibroblastos foram incubados com os extratos em diferentes concentrações (7,8 – 0,00006 mg/mL) durante 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de XTT. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtida de 3 experimentos independentes.....34

Figura 6. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHPLA) na produção de histamina em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).....36

Figura 7. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHPLA) na produção de Prostaglandina E₂ em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).....37

Figura 8. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de Interleucina 1 alfa (IL-1 α) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 μ g/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 μ g/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 μ g/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 μ g/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).....38

Figura 9. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de Interleucina 6 (IL-6) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 μ g/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 μ g/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 μ g/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 μ g/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001 em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).....39

Figura 10. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de Interleucina 10 (IL-10) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 μ g/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 μ g/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 μ g/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 μ g/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).....39

Tabela 1. Escala para classificação do potencial citotóxico estabelecido intra laboratorialmente para ativos e produtos cosméticos.....34

RESUMO

A pele é uma importante barreira biológica que interage com inúmeros estímulos ambientais. O desequilíbrio entre essas interações pode resultar em alterações metabólicas importantes, como processos inflamatórios freqüentes e agressivos ao tecido cutâneo. Assim, produtos com atividade anti-inflamatória tópica são de grande interesse farmacêutico e cosmético. *Physalis angulata* L. (camapú) da família Solanaceae ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde é usado na medicina popular como anti-inflamatório e no tratamento de problemas da pele. Com base nestas informações, a espécie foi escolhida para esse estudo, onde avaliamos a atividade anti-inflamatória do extrato de camapú em culturas de queratinócitos humanos. Culturas de queratinócitos foram sensibilizadas com LPS (200 µg/ml) e depois tratadas com o extrato hidrometanólico (70%) liofilizado de camapú nas concentrações 15,23; 7,62; 3,81 µL/mL. Avaliamos a atividade anti-inflamatória no sobrenadante das culturas pela quantificação dos mediadores: Interleucinas 1 alfa (IL-1α), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), prostaglandina E2 (PGE2) e histamina através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os dados foram submetidos à análise estatística (ANOVA e Dunnett). As duas menores concentrações do extrato foram capazes de reduzir a síntese de histamina em até 70% e, em média, 50% da síntese de PGE2, em comparação aos controles incubados apenas com LPS. A maior concentração avaliada do extrato reduziu em 60% a produção de IL-6 e houve diminuição de 30% para as outras duas concentrações quando comparadas ao controle inflamado, enquanto que as duas maiores concentrações do extrato reduziram em 45% a síntese de IL-1 α. Para o perfil da citocina anti-inflamatória IL-10 apenas a menor concentração do extrato foi capaz de aumentar em 40% a concentração dessa interleucina no sobrenadante. Esses resultados indicam uma atividade anti-inflamatória do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* L. e nos levam a sugerir que este composto tem potencial para ser utilizado como ativo em produtos para os cuidados da pele.

ABSTRACT

The skin, as the primary interface between the body and the environment can respond to a great range of environmental stimuli. Altered responses can lead to important alterations in the tissue physiology such as an excessive inflammation condition, which can produce effects ranging from mild discomfort to permanent impairment of tissue integrity. The pharmaceutical and cosmetic use of natural products is increasing; therefore, products with potential anti inflammatory activity are very significant for the research in this area. *Physalis angulata* L. belongs to the Solanaceae family and grows in the North and Northeast regions of Brazil where it is known as Camapu. It is used in popular medicine as anti inflammatory and for skin disorders. Based on this information the extract of this species was assayed in the search for anti inflammatory activity on human keratinocytes cultures. These cultures were incubated with LPS (200µg/ml) and then treated with hydromethanolic (70%) extract of lyophilized *P. angulata* at three concentrations (1.523×10^{-2} , 7.62×10^{-3} , e 3.81×10^{-3} mg/ml). We evaluated the anti inflammatory activity in cultures supernatants through quantification of inflammatory mediators: Interleukine-6 (IL-6) and 10 (IL-10), prostaglandin E2 (PGE2), Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and histamine. Statistical analysis was performed (ANOVA e Dunnett) and significant difference was taken as $p < 0.05$. At the lower concentrations the extract was able to reduce 70% the concentration of histamine and 50% of prostaglandin E2. IL-6 concentrations were reduced by the three concentrations of the extract compared to LPS controls, while the two higher concentrations of the extract reduced by 45% the synthesis of IL-1α. For the profile of anti-inflammatory cytokine IL-10 the lowest concentration of the extract was able to increase 40% its concentration in the culture supernatant. These results indicate an anti-inflammatory activity of the hydromethanolic *Physalis angulata* L extract and encourage us to suggest that this compound has potential to be used as an effective alternative in products for skin care.

INTRODUÇÃO

1. A pele

A pele pode ser definida como um conjunto de tecidos com organização estratificada que reveste o corpo e possui componentes estruturais e metabólicos que devem trabalhar em harmonia com o meio ambiente para manter a saúde do organismo que envolve (Holbrook, 1983). Representando de 10 a 12% do peso corpóreo é o maior órgão do organismo humano e atua como a interface biológica entre o ambiente interno e externo, possuindo como principais funções: proteção contra danos mecânicos, substâncias nocivas, invasão por microorganismos e radiação solar (Slominski & Wortsman, 2000; Boelsma et al., 2001). A pele atua também na termorregulação, na sensibilidade à dor e calor (Wysocki, 1999), além de possuir várias atividades neuroimunoendócrinas (Streilein, 1983; O'Sullivan et al., 1998; Slominski & Wortsman, 2000). Porém, a característica da pele que possibilitou a vida terrestre foi sua função de barreira permeável que é capaz de manter o balanço hídrico e eletrolítico necessário à vida (Feingold, 2007). Além dessas funções biológicas vitais, a pele tem um importante papel no bem estar e na atração física (Boelsma et al., 2001).

A pele está continuamente exposta a influências internas e externas que podem alterar sua condição e funcionamento, gerando alterações que levam ao fotoenvelhecimento, inflamação, disfunção imune, desequilíbrio da homeostase epidérmica ou outras desordens cutâneas (Boelsma et al., 2001).

Os tecidos da pele são formados por um conjunto heterogêneo de tipos celulares e componentes extracelulares, os quais produzem estruturas especializadas denominadas apêndices (folículo piloso, glândulas sudoríparas, sebáceas e apócrinas), e encontram-se organizados em 3 camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Freinkel, 2001; Kanitakis,

2002; Junqueira & Carneiro, 2005; Costin & Hearing, 2007) (Figura 1).

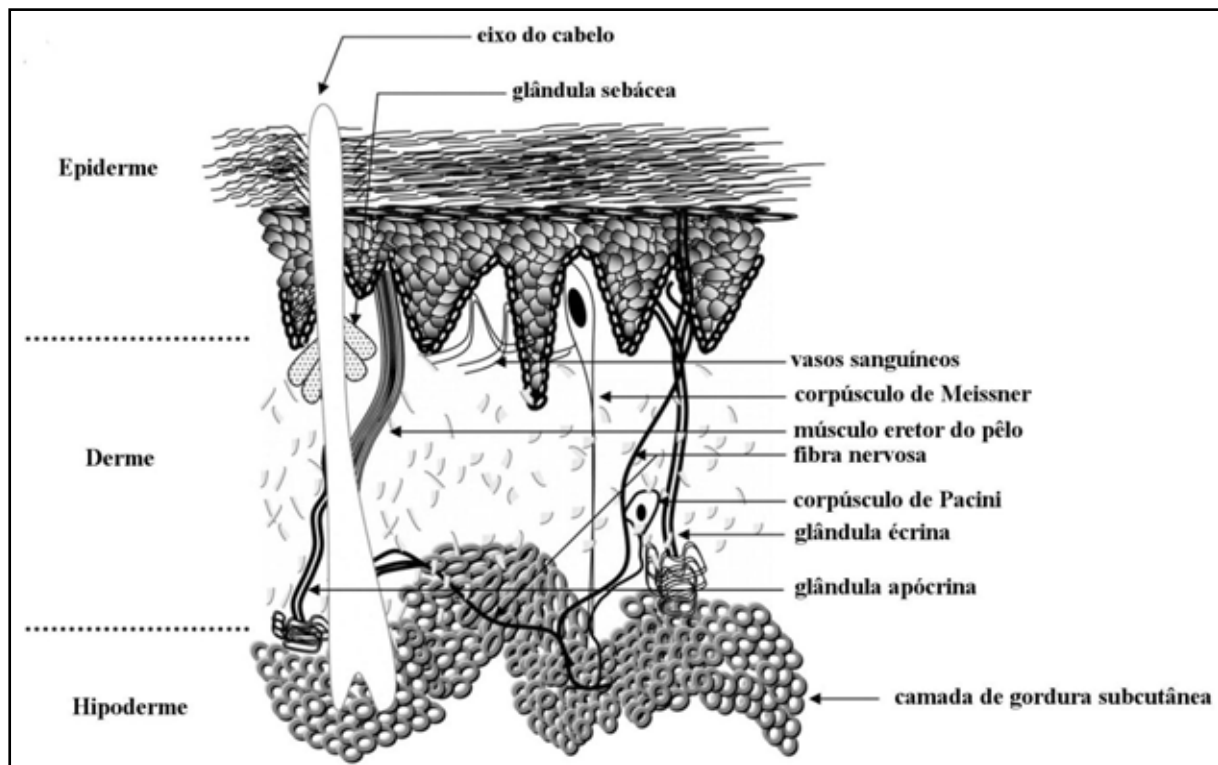


Figura 1. Estrutura básica da pele e seus apêndices. Adaptado de Costin & Hearing, 2007.

1.1. Epiderme

A epiderme é um epitélio estratificado em constante renovação, que exibe um processo de diferenciação progressiva de queratinização (cornificação) que ocorre no sentido basal (camada mais interna) para superfície. A epiderme é formada por múltiplos tipos celulares com diferentes origens embrionárias: queratinócitos, melanócitos, células de Lagerhans e células de Merkel, sendo que os queratinócitos correspondem a aproximadamente 90% da população celular da epiderme (Slominski & Wortsman, 2000; Freinkel, 2001; Kanitakis, 2002; Junqueira & Carneiro, 2005).

A estrutura e função da epiderme dependem de vários processos que se iniciam durante o desenvolvimento e continuam durante toda a vida do organismo. A manutenção do número de células depende de um frágil equilíbrio entre a proliferação e a perda (por

apoptose ou diferenciação) de queratinócitos. Outros fatores importantes para a manutenção da homeostase epidérmica são a adesão dos queratinócitos entre si e com a lâmina basal, a interação com as outras células da epiderme e com a camada subjacente, a derme (Slominski & Wortsman, 2000; Freinkel, 2001; Kanitakis, 2002; Costin & Hearing, 2007).

A epiderme está organizada em camada basal, espinhosa, granular e córnea (Figura 2). Os queratinócitos são formados por mitose na camada mais interna, e ascendem para camadas mais superficiais, sofrendo alterações na sua forma e composição. Este processo de diferenciação da epiderme é denominado de queratinização ou cornificação (Freinkel, 2001; Junqueira & Carneiro, 2005; Costin & Hearing, 2007). A camada basal, também conhecida como *stratum germinativum*, é a mais profunda e consiste de queratinócitos mitoticamente ativos e células do sistema imune. Os queratinócitos basais são colunares e possuem um citoesqueleto suficientemente flexível para divisão e migração celular, enquanto que a camada espinhosa recebeu esta denominação em virtude da aparência histológica de seus queratinócitos, que devido à abundância de junções focais (desmossomos) entre as células adjacentes lembram “espinhos”. Os queratinócitos dessa camada possuem grandes quantidades de queratina organizadas concentricamente ao redor de seu núcleo e inseridas perifericamente dentro dos desmossomos. As células da camada granulosa têm como característica a presença de grânulos no citoplasma, os quais são constituídos por proteínas, principalmente, filamentos intermediários de queratina, pró-filagrina e loricrina. A camada córnea forma a principal barreira do organismo contra a desidratação, perda de eletrólitos e a penetração de agentes ambientais, além de contribuir para a proteção mecânica. Esta barreira é formada por múltiplas camadas de queratinócitos terminalmente diferenciados,

chamados de corneócitos. O corneócito é o maior dos queratinócitos, possuem forma achatada e são formados por queratinas de alto peso molecular, encontram-se envoltos por um envelope córneo formado por proteínas intensamente interligadas entre si como a filagrina, loricrina e involucrina garantindo a resistência mecânica da epiderme. Ao mesmo tempo, esse envelope com os corneócitos estão embebidos em uma matriz extracelular rica em lipídios (hidrofóbica) que forma a barreira contra o movimento de água e eletrólitos (Freinkel, 2001; Junqueira & Carneiro, 2005; Feingold, 2007).

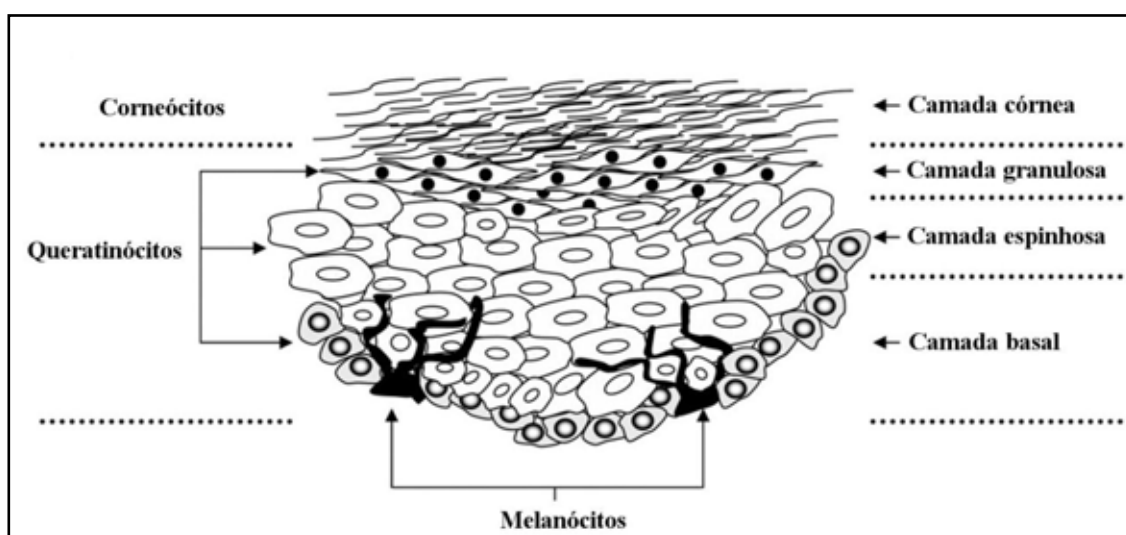


Figura 2. A epiderme organizada em camadas. Adaptado de Costin & Hearing, 2007.

1.2. Derme

A derme é um tecido conectivo que garante à pele flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Tem como função proteger o corpo contra agressões mecânicas, reter água e auxiliar na regulação térmica. Na derme ainda são encontrados folículos pilosos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, glândulas apócrinas, receptores de estímulo sensorial, vasos linfáticos e vasos sanguíneos. A derme é composta principalmente de matriz extracelular fibrosa (formada por colágeno e elastina) e não-fibrosa (formada por filamentos de glicoproteínas, proteoglicanos, e glicosaminoglicanos) e por vários tipos celulares como

fibroblastos, mastócitos, células dendríticas (Slominski & Wortsman, 2000; Kanitakis, 2002), macrófagos e linfócitos T (Slominski & Wortsman, 2000).

Os fibroblastos são o principal tipo celular da derme e se caracterizam por serem células migratórias responsáveis pela síntese e degradação do tecido conectivo (fibroso e não-fibroso) e de numerosos mediadores. Existe um grande interesse na regulação dos fibroblastos devido a sua alta taxa proliferativa e sintética durante o processo de cicatrização. Fibroblastos proliferativos e em repouso são capazes de responder a diversos mediadores imunes como IL-1 α , IL-1 β e IL-8 (Freinkel, 2001).

Duas regiões distintas podem ser observadas na derme: a camada papilar que está em contato com a epiderme e a camada reticular mais interna. Essa distinção é feita com base no tipo de tecido conjuntivo, na densidade celular e nos padrões de organização de nervos e vasos. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo caracterizado por pequenos feixes de colágeno de baixo diâmetro, de modo que as características desta matriz permitem que a pele suporte estresse mecânico. Além disso, possui uma alta densidade celular principalmente de fibroblastos com altas taxas metabólicas e de proliferação. A camada reticular é formada por tecido conjuntivo denso não modelado composto de fibras de colágeno de grande diâmetro organizadas em feixes entrelaçados, circundados por uma superestrutura formada por ramificações de fibras de elastina (Freinkel, 2001; Junqueira & Carneiro, 2005,).

1.3. Junção Dermo-Epidérmica

A epiderme e a derme são conectadas por uma junção dermo-epidérmica (JDE) que ancora o epitélio ao tecido conjuntivo frouxo da derme. A JDE é constituída por uma complexa membrana basal sintetizada por queratinócitos basais e por fibroblastos da derme.

Além de possuir um papel fundamental na adesão mecânica destes dois compartimentos, a junção dermo-epidérmica também atua como um facilitador na migração de vários tipos celulares durante processos tais como a cicatrização, reações imunológicas e/ou inflamatórias, entre outros (Kanitakis, 2002; Junqueira & Carneiro, 2005).

1.4. Hipoderme

A hipoderme consiste em um tecido conectivo frouxo que conecta a pele aos músculos e ossos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 2005). Tem como principais funções o isolamento térmico do organismo, e armazenamento de energia, além apresentarem importância cosmética já que é responsável por modelar as curvas do corpo. A transição entre a derme e a hipoderme ocorre de forma abrupta de um tecido conjuntivo fibroso para um tecido rico em gordura, mas as duas regiões são estrutural e funcionalmente muito bem integradas através das redes neurovasculares (Freinkel, 2001).

Os adipócitos são o principal tipo celular desse tecido (Slominski & Wortsman, 2000; Kanitakis, 2002; Junqueira & Carneiro, 2005), que é composto também por fibroblastos, dendrócitos e mastócitos (Kanitakis, 2002).

2. A epiderme como parte do sistema imune

A complexa e elaborada estrutura que a pele apresenta agregando tecidos de várias origens (epitelial, conectivo, vascular, muscular e nervoso) (Kanitakis, 2002), lhe confere a capacidade de reconhecer e responder a diferentes estímulos. Os estímulos, de origem endógena ou exógena (ambientais), desencadeiam no tecido cutâneo uma resposta imunológica inflamatória que é geralmente acompanhada de alterações fisiológicas, envolvendo inúmeros tipos celulares e até mesmo outros sistemas orgânicos. O dinâmico

processo de transmissão de sinais e processamento da informação ocorre de uma maneira complexa e, essa resposta multifacetada denominada inflamação, pode ocorrer de forma benéfica ou prejudicial para o hospedeiro. A ocorrência de um aumento da perfusão vascular local, o extravasamento de líquidos e a formação de coágulo podem agir de forma a facilitar o fluxo de leucócitos, diluir ou inativar o patógeno e favorecer a cicatrização. Por outro lado, a inflamação é prejudicial quando causa lesão temporária ou permanente dos tecidos e interfere nas funções normais (Stites et al., 2000).

A principal função do sistema imune é proteger o organismo, eliminando ou neutralizando moléculas estranhas e reconhecendo e tolerando partículas que interagem de forma benéfica com o organismo. A epiderme é parte integral desse sistema, visto que é o principal local de entrada e de destruição de antígenos, assim como é constituída por diferentes células, tais como as células de Langerhans, linfócitos T e os queratinócitos que participam ativamente na iniciação e regulação de respostas imunes (Slominski & Wortsman, 2000; Goodman & Gilman, 2006).

Os queratinócitos representam a maioria das células epidérmicas (>90%) e são capazes de secretar e responder a uma grande variedade de mediadores imunomoduladores que podem atuar estimulando ou inibindo respostas imunes; as células de Langerhans são derivadas da medula óssea, que apesar de representar uma pequena porção das células epidérmicas (2-5%) são as principais células apresentadoras de antígeno da pele e, os linfócitos T que são encontrados na epiderme em pequena proporção (<1%) e responsáveis por colaborarem na resposta imune. (Freinkel, 2001).

2.1. Inflamação

A resposta inflamatória é um evento no qual o sistema imune combate um agressor

com o objetivo de neutralizá-lo e não ocorre somente em resposta a um processo infeccioso, mas também diante de outros estímulos exógenos (radiação ultravioleta, substâncias tóxicas/alérgicas e danos mecânicos) e a estímulos endógenos como alterações imunológicas, hormonais e estresse (O'Sullivan et al., 1998; Kanitakis, 2002). Considerando que a pele está exposta constantemente a esses fatores, a inflamação tem papel fundamental na manutenção da homeostase da pele. Está claramente reconhecido que processos inflamatórios podem resultar em alterações na aparência e na atividade metabólica da pele como o fotoenvelhecimento, edema, atividade imunológica reduzida, entre outras desordens cutâneas (O'Sullivan et al., 1998; Boelsma et al., 2001), as quais não só significam uma perda da integridade biológica do órgão, mas também promovem efeitos substancialmente negativos na auto-estima e no bem-estar social do indivíduo (Cosgrove et al., 2007), visto que a pele também possui um papel central na sensação de bem-estar e na atração física (Slominski & Wortsman, 2000; Boelsma et al., 2001).

Na inflamação há uma resposta do tecido agredido que envolve vários eventos da resposta imunológica. Esses eventos são iniciados, amplificados e/ou coordenados pela ação de vários mediadores que possuem intensa atividade fisiológica e fisiopatológica, agindo de forma autócrina promovendo efeitos na própria célula, de forma parácrina, atuando em células epidérmicas vizinhas ou ainda ter um efeito endócrino em células distantes. Entre eles encontram-se o óxido nítrico, o fator ativador de plaquetas, as cininas, os eicosanóides, a histamina e as citocinas (Silva, 2002).

Em seres humanos, praticamente todos os tecidos contêm histamina pré-formada em quantidades variáveis sendo que níveis altos são encontrados na pele, nos pulmões, e na mucosa intestinal (Silva, 2002). A histamina foi um dos primeiros mediadores identificados

no processo inflamatório, exercendo um papel central na hipersensibilidade imediata, nas respostas alérgicas e na cicatrização. A histamina manifesta efeitos pró-inflamatórios como a indução da produção de IL-6, IL-8 em queratinócitos em uma ação conjunta ou não com outras interleucinas inflamatórias como TNF- α ou IL-1. Também atua acelerando o processo de cicatrização através da indução de angiogênese e recrutamento de macrófagos (Silva, 2002; Goodman & Gilman, 2006; Kanda & Watanabe, 2007).

Os eicosanóides são um grande número de compostos produzidos a partir do ácido araquidônico durante a resposta inflamatória, e incluem tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas e prostaglandinas. As prostaglandinas são divididas em dez grupos estruturalmente distintos nomeados de A-J e são importantes mediadores da inflamação aguda (Silva, 2002). A prostaglandina E₂, por ser um potente vasodilatador, intensifica as ações da histamina e leucotrienos, favorecendo assim a formação de edema e potencializando a atividade hiperálgica da bradicinina, em adição, aumenta a infiltração de leucócitos pela exarcebação do fluxo sanguíneo na região inflamada (Silva, 2002; Goodman & Gilman, 2006).

As citocinas são liberadas por células imunocompetentes e agem sobre linfócitos, macrófagos e outras células do sistema imune atuando como mensageiros protéicos que influenciam e interligam o sistema imune com os outros sistemas fisiológicos do organismo (Blok, et al., 1996; Silva, 2002; Goodman & Gilman, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 α (IL-1 α), 6 (IL-6), 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzem efeitos principais na resposta inflamatória de fase aguda, enquanto que outras interleucinas como IL-2, IL-3, IL-12, IL-15 exercem efeitos metabólicos e/ou sistêmicos. Por outro lado, as interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10) possuem ação anti-inflamatória, diminuindo a produção de várias citocinas inflamatórias e

induzindo a produção do antagonista do receptor de IL-1 α (Plotnikoff, 1998; Silva, 2002; Goodman & Gilman, 2006). São exemplos de interleucinas e suas ações:

- IL-1 α (co-fator estimulatório de células B e T, e também agente quimiotático para células de Langerhans, macrófagos e neutrófilos)
- IL-3 (fator de crescimento para células tronco hematopoiéticas e mastócitos)
- IL-6 (fator de crescimento para células B e aumenta o poder citotóxico de células natural killer frente a células tumorais)
- IL-8 (promove quimiotaxia de células T e monócitos)
- IL-10 (aumenta a diferenciação de células T para o perfil Th2)
- IL-12 (aumenta a diferenciação de células T para o perfil Th1)
- IL-15 (fator de crescimento para células T e natural killer)

2.2. Queratinócitos e mediadores inflamatórios

Queratinócitos possuem um papel central na indução da inflamação frente a estímulos como danos mecânicos, invasão por microorganismos e radiação ultravioleta (RUV). Essa característica deve-se ao fato de que os queratinócitos são responsáveis pela síntese de citocinas e mediadores lipídicos inflamatórios em resposta a um estímulo e também em resposta a outros mediadores inflamatórios, já que possuem numerosos receptores em sua membrana. Por esse motivo a compreensão do papel dos queratinócitos na inflamação cutânea mudou de espectador passivo para participante ativo (Gröne, 2002).

Agressões físicas e a exposição a RUV geram estímulos inflamatórios e podem provocar a perda da integridade cutânea se não houver um reparo adequado (Cardoso et al., 2011). O processo de reparação tecidual é fundamental para manutenção da função da barreira cutânea e se não ocorrer de forma eficiente pode interferir com a aparência da pele

através de sinais de envelhecimento precoce, como rugas e manchas. A reparação tecidual envolve a ativação da reposta imune local e sistêmica e complexas interações entre células e mediadores solúveis sendo regulada, portanto, por fatores de crescimento, citocinas e metaloproteinases (MMPs) (Cardoso et al., 2004; Cardoso et al., 2011).

Os queratinócitos são os primeiros a responder, liberando IL-1 pré-estocada. Essa interleucina, com ação autócrina e parácrina, estimula células e tecidos próximos, inclusive os próprios queratinócitos a produzirem e liberarem uma série de moléculas sinalizadoras que iram produzir efeitos pro-inflamatórios e quimiotáticos, tais como IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , Histamina e PGE₂ (Marcatili et al., 1997; Kupper & Fuhlbrigge, 2004) (Figura 3).

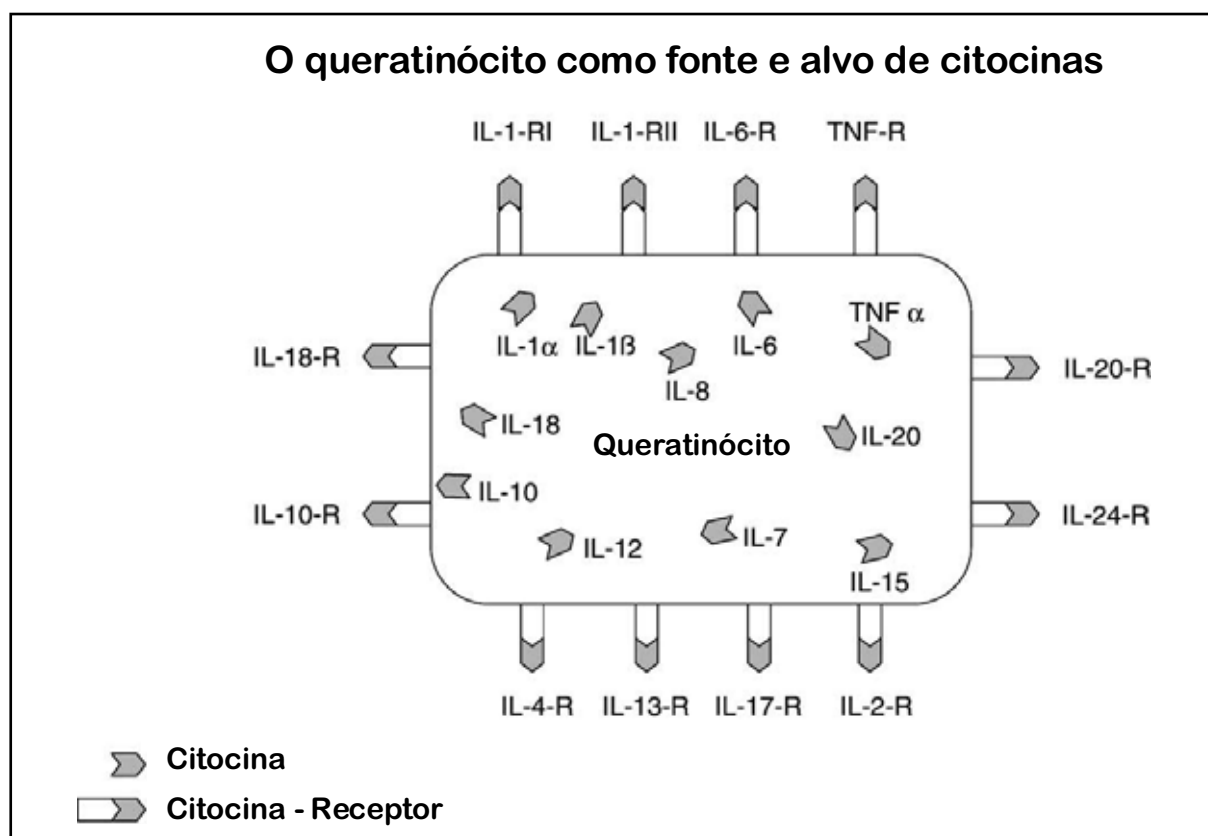


Figura 3. Queratinócito como fonte e alvo de citocinas (adaptado de Gröne, 2002).

A IL-6 estimula a proliferação de queratinócitos, induz a infiltração de leucócitos

estando relacionados com vários estados inflamatórios patológicos como dermatoses e a psoríase (Sawamura et al., 1998). Em contraste a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com um papel chave na resposta inflamatória sistêmica, pois-atua atenuando ou bloqueando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, além de ser capaz de modificar a atividade de células do sistema imunitário sendo, por exemplo, um potente desativador de macrófagos (Berg et al., 2001; Gunnnett et al., 2000).

A histamina manifesta seus efeitos pro-inflamatórios estimulando a produção de IL-6 e IL-8 em queratinócitos (Kanda & Watanabe, 2007) enquanto que a PGE₂, representante dos eicosanóides, é responsável pela formação de eritemas na pele e por mediar a liberação de IL-6 e IL-8 (Storey et al., 2007). Além disso, promove a degradação do tecido conectivo da pele através do aumento da produção de enzimas proteolíticas denominadas matriz metaloproteinases (MMPs), as quais degradam colágeno, elastina e outras macromoléculas da matriz extracelular (MEC) (Shapiro, 1998; Scharffetter-Kochanek, 2000; Baumann, 2007). Essa degradação das proteínas da MEC pode comprometer o processo adequado de reparo tecidual e promover uma desorganização da estrutura derme-hipoderme que é refletida através do aparecimento de rugas.

3. Pesquisa e Desenvolvimento de produtos dermocosméticos

A descoberta de novos produtos capazes de manter a homeostasia da pele e amenizar ou mesmo inibir os efeitos indesejáveis induzidos pelo processo inflamatório é de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento na área da dermatologia cosmética. Estudos para a obtenção de novos produtos com atividade biológica podem ser realizados por meio de várias estratégias, principalmente a partir da modificação molecular de substâncias ativas já conhecidas, pela síntese total ou ainda por meio da bioprospecção de compostos de

origem natural, especialmente de espécies vegetais encontradas em biomas tropicais como a Amazônia, o Cerrado e a Mata Atlântica. Estudos mostram que as florestas tropicais compreendem mais da metade das espécies vegetais encontradas no mundo, das quais menos que 1% tem sido estudada quanto suas potencialidades terapêuticas (Conte, 1996). Poucos estudos sobre espécies vegetais destes biomas têm sido realizados com o enfoque de obtenção de novos ativos vegetais de interesse farmacêutico e fitocosmético, caracterizando a geração de um pequeno número de informações que também restringem o uso sustentável de nossa biodiversidade. Além disto, é importante constar que espécies vegetais de biomas tropicais, devido às características de alta competitividade para sobrevivência em seu ambiente, produzem 3 a 4 vezes mais constituintes químicos que espécies do mesmo gênero botânico encontradas em biomas temperados, nos quais a pressão ecológica para sobrevivência é menor e envolve a produção de um menor número e concentração de compostos secundários (Rodrigues & West, 1995). Assim sendo, a seleção de espécies medicinais nativas de biomas tropicais representa de forma incontestável uma fonte inesgotável de novos ativos vegetais que precisam ser amplamente estudados tendo-se em vista a seleção de espécies vegetais ativas e de matéria-prima vegetal fonte de produtos com atividade terapêutica. Neste contexto, extratos de espécies vegetais destes biomas são importantes fontes de compostos farmacologicamente ativos.

É importante constar ainda que a demanda destes produtos de origem vegetal no mercado é alta, mas o uso das espécies vegetais nativas é complexo visto a falta de informações técnico-científicas que permitem sua seleção como matéria-prima para a produção industrial. De fato, é incontestável que o setor produtivo, que atua na produção de insumos e produtos de interesse farmacêutico e cosmético, prioriza espécies medicinais

exóticas já amplamente conhecidas para inclusão em seus produtos. Desta forma, é claro que reconhecer as potencialidades de espécies nativas de formações tropicais brasileiras, permitirá o início de uma mudança de enfoque do setor produtivo, gerando divisas importantes que garantiriam a sustentabilidade das espécies e consequentemente à conservação ambiental. Neste sentido, deve-se salientar ainda que além da enorme diversidade de espécies vegetais brasileiras, praticamente inexploradas pela ciência, existe uma diversidade química incomensurável nestas espécies vegetais. Tais compostos químicos, oriundos do metabolismo secundário e que garantem a sobrevivência da espécie em condições tão inóspitas e de intensa competição como a que ocorre nos biomas tropicais, podem obviamente representar uma série de importantes princípios ativos úteis para o tratamento e cura de inúmeras doenças que atingem a espécie humana.

4. *Physalis angulata* L.

A planta utilizada no presente estudo foi selecionada a partir de estudos preliminares já realizados com a mesma, mas envolvendo outros parâmetros e modelos experimentais, conforme apresentamos abaixo.

O Camapú (*Physalis angulata*) (Figura 4) é uma espécie que pertence à família Solanaceae, com ampla ocorrência e distribuição (Soares et al., 2003). Segundo Lorenzi & Matos, 2002, é uma espécie nativa brasileira que cresce principalmente como erva daninha nas regiões norte e nordeste do país. Extratos e infusões desta planta são utilizados na medicina popular para uma grande variedade de doenças, incluindo hepatite, malária, reumatismo, asma, dermatite, otite, febre, entre outras (Silva et al., 2005; Soares et al., 2006), além de possuir uma série de estudos que corroboram sua importância como fonte

de ativos de interesse para o presente projeto, especialmente aqueles que descrevem sua atividade imunomoduladora e anti-inflamatória.

A espécie *Physalis angulata* apresenta uma variável e extensa composição química, e grande parte desses componentes já foram isolados e caracterizados quimicamente, incluindo alcalóides (Basey et al., 1992); flavonóides simples e glicolizados; ácidos graxos; carotenóides (Ismail & Alam, 2001); terpenóides (Barbi et al., 1999; Shim et al., 2002); e esteróis (Chiang et al., 1992; Januário et al., 2002; Shingu et al., 1991; Shingu et al., 1992; Shingu et al., 1992-2). O principal grupo de esteróis presente nessa espécie são as fisalinas, moléculas derivadas do ergostano do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carboxilados em C-15, dentro do gênero *Physalis* já foram identificadas dezenove fisalinas (Makino et al., 1995), sendo que a espécie *P. angulata* possui em sua constituição as fisalinas B, D, E, F, G, H, I, J, K (Chiang et al., 1992; Chiang et al., 1992-2; Januário et al., 2002; Makino et al., 1995; Purushothaman & Vasanth, 1988; Row et al., 1978; Row et al., 1978-2; Soares et al., 2003).

As atividades biológicas descritas na literatura dos compostos presentes no extrato de plantas do gênero *Physalis* compreendem: atividade antimicrobiana (Januário et al., 2002; Silva et al., 2005), antitumoral (Chiang et al., 1992; Chiang et al., 1992-2; Hsieh et al., 2006; Wu et al., 2004), imunomoduladora (Lin et al., 1992; Soares et al., 2006), anti-inflamatória (Choi & Hwang, 2003; Soares et al., 2003; Soares et al., 2006; Vieira et al., 2005), tripanossomicida (Nagafuji et al., 2004), antileishmanial (Choudhary, 2005), dentre outras.



Figura 4. *Physalis angulata* L.

Foto: Wakana (Chemyunion set/09)

5. Justificativa

O projeto proposto envolve uma pesquisa integrada entre a universidade e pesquisadores do setor produtivo, especificamente da empresa Chemyunion Química Ltda. Esta parceria já está bem estabelecida por projetos anteriores e estudo é uma etapa, de caráter científico, de um projeto mais amplo cujo objetivo principal é a obtenção, padronização, produção e comercialização de novos produtos úteis na indústria cosmética, na forma de extratos padronizados utilizando uma inovadora abordagem.

Esse estudo visa caracterizar a habilidade do extrato de *Physalis angulata* L em modificar a aparência geral da pele mantendo seu equilíbrio fisiológico, sendo capaz de diminuir e até prevenir os efeitos indesejáveis de alterações fisiológicas como, por exemplo, de processos inflamatórios. Com a união de resultados será possível demonstrar o potencial desse extrato como novo ativo dermocosmético.

Inserido nesse contexto, a nossa hipótese de trabalho é: o extrato de *Physalis angulata* é capaz de modular a produção de mediadores da resposta inflamatória da pele *in vitro*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos *in vitro* do extrato de *Physalis angulata* L. sobre a resposta inflamatória em culturas de queratinócitos humanos, verificando assim, seu potencial como ativo dermocosmético.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Extrato de *Physalis angulata* L.

O material vegetal da espécie *Physalis angulata* foram obtidos de culturas orgânicas estabelecidas pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba-SP), devidamente certificado pela ECOCERT (Anexo 1). As plantas foram coletadas no período de 06/2009 (lote CC008-1108), desidratadas e pulverizadas em moinho de facas, resultando em 285g de amostra. A extração foi feita com 2,85L de solução de metanol a 70% durante 72 horas com filtrações a cada 24h. A solução obtida foi desidratada em um rotoevaporador e depois foi colocada em um liofilizador (Liotop, L101), onde foram obtidos 33,4g do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) utilizado nos testes. O rendimento do extrato a partir do material seco e pulverizado foi de 11,71%.

A análise quantitativa da composição graxa do extrato (Cromatografia gasosa, equipamento Agilent, 6890N) revelou a presença dos ácidos palmítico (42,62% p/p), esteárico (8,16% p/p), oléico (7,54% p/p), linoléico (31,30% p/p), linolênico (8,58% p/p) e araquídico (1,80% p/p) (Anexo 2).

Além da certificação, o material vegetal florido foi coletado e submetido à identificação taxonômica pelos Prof. Dr. Roberto Rodella e Profa. Dra. Rita de Cássia Sindrônia Maimoni-Rodella, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, onde exsicata da mesma foi depositada.

2. Estudos *in vitro*

A utilização de linhagem de células humanas para realização destes estudos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, sob parecer nº 3287-2009 (Anexo 3).

2.1. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular

2.1.1. Linhagem de fibroblastos humanos

Fibroblastos humanos criopreservados de origem dérmica (Clonetics™ NHDF - Normal Human Dermal Fibroblasts, CC-2511) foram cultivados e expandidos em garrafas de 75 cm² (Corning Inc, New York, NY) até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂ (Nuare, NU-5100), utilizando meio de cultura específico, contendo 500 ml de meio de cultura basal para fibroblastos (RPMI + GlutaMAX medium, 1640, Invitrogen) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS – Fetal Bovine Serum, CC-4101J, Vitrocell), 5 µg/mL de fator de crescimento epidérmico humano recombinante (Hu EGF – Recombinant Human Epidermal Growth Factor, PHG0311, Invitrogen) e uma associação de antibióticos contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Penicillin-Streptomycin, 15070063, Invitrogen).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingirem aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Tryple Express, Gibco/Invitrogen, Cat. 12604), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas 220 g por 15 minutos e semeadas em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1×10^4 células/poço.

2.1.2. Protocolo de incubação com a amostra

Cada placa 96 poços permite a avaliação de 18 concentrações do EHLPA em triplicata, com controle negativo e positivo. O EHLPA foi dissolvido em meio de cultura específico para fibroblastos e foi adicionado à placa em uma diluição seriada partindo da concentração de 7,8 a 0,00006 %(p/v) (7,8 a 0,00006 mg/ml). A cultura foi incubada por um período de 48 horas.

2.1.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método de XTT

A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico para a quantificação do metabolismo mitocondrial de da atividade de cadeia respiratória celular. Esse ensaio é baseado na conversão do hidróxido de tetrazolium amarelo XTT (sodium 3' - α 1-(phenylaminocarbonyl) – 3,4-tetrazolium - bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) para formatazam laranja (solúvel em água) pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis metabolicamente ativas.

Após 48h de incubação com o EHLPA o conteúdo dos poços foi removido e os poços foram lavados com meio de cultura até a total retirada de resíduos do EHLPA, posteriormente todos os poços foram preenchidos com 200 μ L de meio de cultura novo. A solução de XTT (In citotox XTT Kit, Xenometrix AG) foi então adicionada à cultura (50 μ L/poço) e incubado por 4 horas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ (Nuare, NU-5100). A absorbância de todos os poços foi determinada a 450nm em um espectrofotômetro (LGC, LMLGC). A taxa de morte celular foi expressa em porcentagem, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ células mortas} = 100 - \left(\frac{\text{absorbância da amostra (poço tratado)}}{\text{absorbância do controle}} \times 100 \right)$$

2.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

2.2.1. Linhagem de queratinócitos humanos

Queratinócitos humanos criopreservados de origem dérmica (Cascade Biologics, USA) foram cultivados e expandidos em garrafas de 75 cm² (Corning Inc, New York, NY) até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂ (Nuare, NU-

5100). Foi utilizado meio de cultura específico, contendo 500 ml de meio de cultura basal para queratinócitos (Epilife, MEPI500CA, Invitrogen) suplementado com Supplement S7 (S-017-5, Invitrogen) e uma associação de antibióticos contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Penicillin-Streptomycin, 15070063, Invitrogen);

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingiram aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Tryple Express, Gibco/Invitrogen, Cat. 12604), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas 220 g por 10 minutos e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1×10^5 células/poço.

2.2.2. Protocolo de incubação com o extrato

O EHLPA foi dissolvido em meio de cultura específico para queratinócitos e aplicado nas culturas nas concentrações de 15,23; 7,62; 3,81 µL/mL. A seleção destas concentrações foi baseada em ensaios prévios de viabilidade celular através do método XTT (item 2.1.3). Os queratinócitos foram incubados com o extrato e estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Sigma) a concentração de 200 µg/mL. Após 48 horas de incubação o sobrenadante e o lisado celular foram coletados para quantificação dos mediadores inflamatórios: Prostaglandina E2 (PGE₂), Histamina, Interleucina 1 alfa (IL-1α), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10).

2.2.3. Quantificação de prostaglandina (PGE₂) e histamina

As concentrações de PGE₂ e histamina foram medidas no sobrenadante das culturas por meio de ensaio de ligação competitiva, adquirido da Cayman Chemical (USA) e SPIbio (France), 100 µL das amostras e dos respectivos padrões foram pipetados na placa de ELISA revestida com o anticorpo policlonal. Em seguida, 50 µL do anticorpo monoclonal e 50 µL do

conjugado de PGE2 e histamina foram adicionados e incubados por duas horas à temperatura ambiente sob agitação. A placa de ensaio foi lavada com detergente não-iônico diluído em salina tamponada e invertida sobre material absorvente até a secagem completa. O cromógeno p-nitrofenil fosfato (p-NPP) (200 µl) foi adicionado e incubado (Temperatura ambiente - TA) durante 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de fosfato tri-sódio (50 µl). A placa foi submetida à leitura de absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro (LGC, LMLGC). O cálculo dos resultados foi feito com base na curva de referência de concentrações conhecidas do mediador em questão.

2.2.4. Quantificação das interleucinas IL-1 α , IL-6 e IL-10

IL-1 α , IL-6 e IL-10, foram quantificadas utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA sanduíche) disponíveis comercialmente (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). 100µL do anticorpo monoclonal anti-citocina de captura foram adicionados na placa de 96 poços (Nunc) que foi incubada por 12 horas a temperatura ambiente (TA). Após este período os poços foram lavados com uma solução de tampão de lavagem (PBS/Tween) e incubados com uma solução de bloqueio (300µL), contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA) durante 1 hora (TA). As amostras (sobrenadantes provenientes da cultura de queratinócitos) e os padrões (citocinas recombinantes) foram adicionados e a placa foi incubada por 2 horas (TA). O anticorpo monoclonal de detecção anti-citocina foi então preparado e incubado por mais 2 horas (TA). Adicionou-se uma solução de estreptavidina-peroxidase e incubou-se por 1 hora (TA). Finalmente, a solução de substrato (H₂O₂ e TMB – tetrametilbenzidina) foi adicionada à placa e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm em um espectrofotômetro (LGC, LMLGC). Os

níveis de citocinas foram expressos em pg/mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes.

3. Análise estatística

Método paramétrico de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para a realização da análise estatística seguido do teste de Dunnett para comparação múltipla. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram menores ou iguais a 0,05.

RESULTADOS

1. Avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA)

A biossegurança do EHLPA foi determinada utilizando o método de XTT em fibroblastos humanos incubados com um grande espectro de concentrações do extrato (7,8 – 0,00006 mg/mL) (Figura 5). A classificação do produto quanto ao potencial citotóxico *in vitro* seguiu a escala mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Escala para classificação do potencial citotóxico estabelecido intra laboratorialmente para ativos e produtos cosméticos.

% de Células Mortas	Classificação
>50%	Citotoxicidade importante
>25% à ≤50%	Citotoxicidade moderada
<25%	Citotoxicidade negligível ou pouco importante

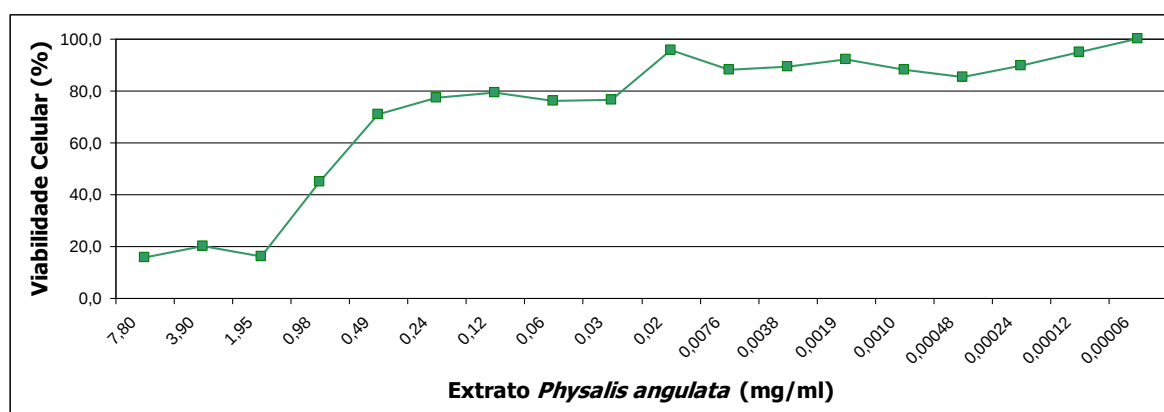


Figura 5. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata*, na viabilidade celular de fibroblastos humanos. Fibroblastos foram incubados com os extratos em diferentes concentrações (7,8 – 0,00006 mg/mL) durante 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de XTT. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtida de 3 experimentos independentes.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, e seguindo a classificação da Tabela 1, o EHLPA apresentou citotoxicidade importante na faixa de concentração de 7,8 a 0,98 mg/ml, as quais foram responsáveis por uma redução de até 85% da viabilidade celular. As concentrações de 0,049 a 0,00006 mg/ml apresentaram citotoxicidade negligível ou pouco importante, mantendo a taxa de viabilidade celular entre 80 e 100%. Com base nesses resultados, utilizamos as concentrações de 0,02; 0,0076 e 0,0038mg/ml (20; 7,6 e 3,8 µg/ml) para os estudos de eficácia *in vitro*.

2. Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA)

O EHLPA foi aplicado nas culturas de queratinócitos humanos e incubado durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais:

- Branco - sem nenhum tratamento
- Controle LPS - células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS
- *Physalis* 1 - LPS + 20 µg/ml de EHPLA
- *Physalis* 2 - LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA
- *Physalis* 3 - LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA

O sobrenadante das culturas foi coletado e os mediadores inflamatórios foram quantificados por método imunoenzimático (ELISA) através de kits disponíveis comercialmente.

2.1. Efeitos do EHLPA na produção de histamina em cultura de queratinócitos humanos

A incubação dos queratinócitos com o LPS foi eficiente em promover uma resposta

inflamatória e pode ser observada pelo aumento da liberação de histamina do controle LPS em relação ao branco. A Figura 6 mostra que o EHLPA foi capaz de reduzir essa liberação nas duas menores concentrações testadas, sendo que o tratamento com a concentração de 7,6 µg/ml reduziu em 70% e com o tratamento com 3,8 µg/ml do extrato a redução foi de 55% em relação ao controle LPS.

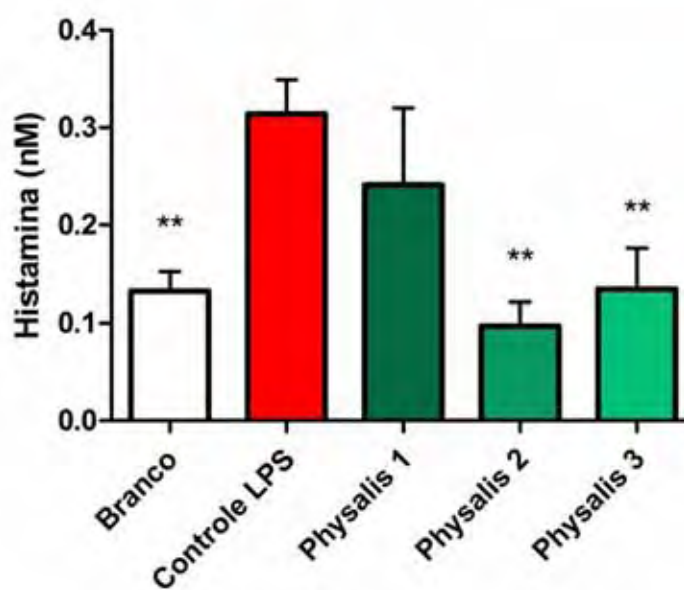


Figura 6. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de histamina em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=3). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).

2.2. Efeitos do EHLPA na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em cultura de

queratinócitos humanos

A resposta do mediador PGE₂ ao tratamento com o extrato foi correspondente ao da histamina, o LPS induziu resposta inflamatória com aumento nos níveis de PGE₂ e o extrato reduziu esses níveis nas duas menores concentrações avaliadas (Figura 7). As incubações das

culturas com 7,6 e com 3,8 $\mu\text{g/ml}$ do extrato reduziram os níveis de PGE_2 , em relação ao controle sensibilizado com LPS, em 61 e 57% respectivamente.

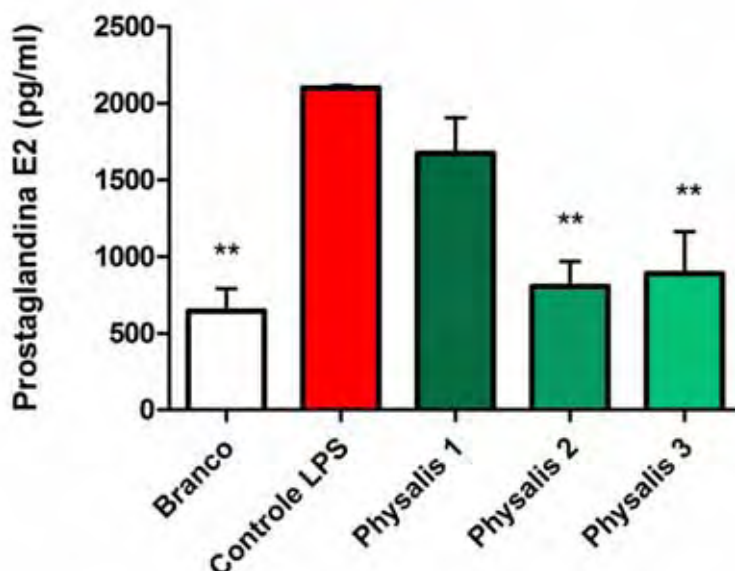


Figura 7. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de Prostaglandina E_2 em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 $\mu\text{g/ml}$ de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 $\mu\text{g/ml}$ de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 $\mu\text{g/ml}$ de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 $\mu\text{g/ml}$ de EHPLA). Os níveis de histamnia foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes ($n=3$). ** $P<0,01$, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).

2.3. Efeitos do EHLPA na liberação das Interleucinas 1 alfa, 6 e 10 (IL-1 α , IL-6 e IL-10) em cultura de queratinócitos humanos

Como eram esperadas, as interleucinas também responderam de forma positiva ao estímulo do LPS mostrando a presença de um estado inflamatório nas culturas de queratinócitos humanos. Para as interleucinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 o extrato demonstrou sua ação anti-inflamatória ao reduzir a produção dessas interleucinas nas culturas tratadas em relação ao controle inflamado. As duas maiores concentrações estudadas (20 e 7,6 $\mu\text{g/ml}$) foram efetivas em reduzir 45% dos níveis de IL-1 α em média,

respectivamente (Figura 8). Efeitos ótimos e similares foram obtidos na produção de IL-6 onde as três concentrações avaliadas apresentaram efeito sobre os níveis de dessa interleucina diminuindo sua produção em até 59% (Figura 9).

Em contraste, a IL-10 não apresentou alteração no seu padrão entre os grupos controle branco e tratado, porém o tratamento com o EHLPA na concentração de 3,8 µg/ml foi capaz de estimular a produção dessa importante interleucina anti-inflamatória aumentando em 40% sua concentração em relação ao grupo inflamado, como podemos observar na Figura 10.

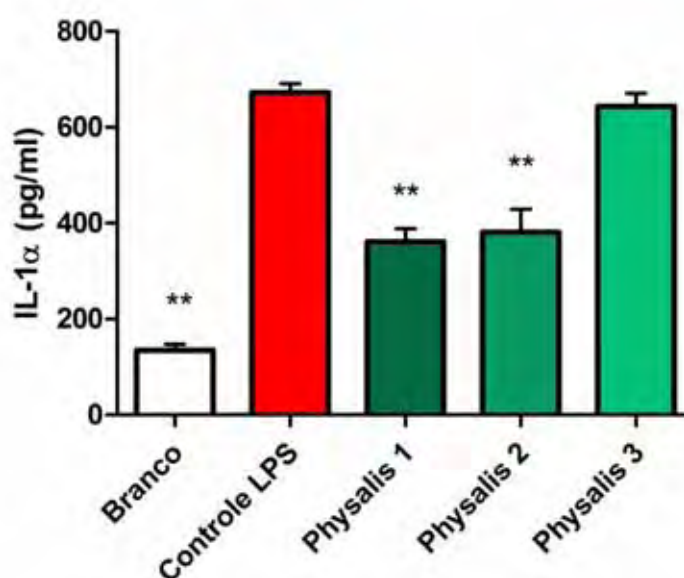


Figura 8. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHLPA) na produção de Interleucina 1 alfa (IL-1α) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamnia foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=3). **P<0,01, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).

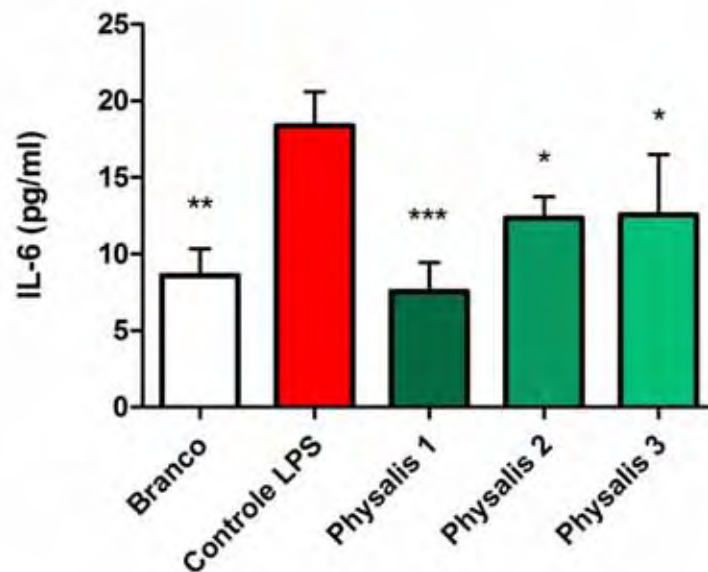


Figura 9. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHPLA) na produção de Interleucina 6 (IL-6) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).

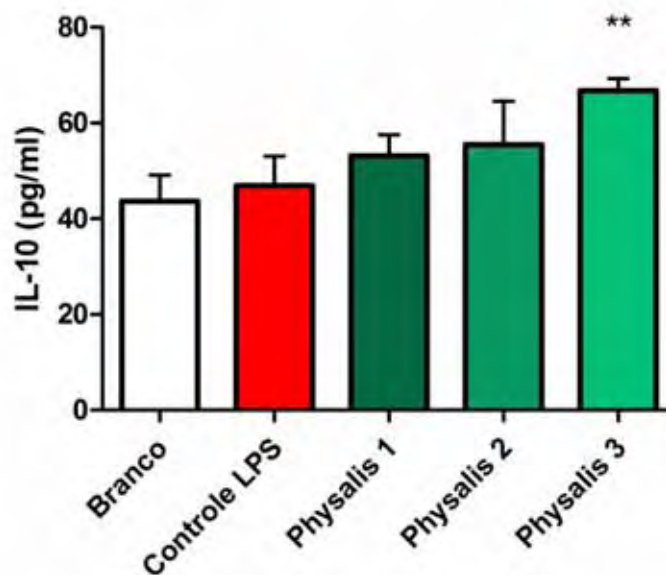


Figura 10. Efeitos do extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* (EHPLA) na produção de Interleucina 10 (IL-10) em cultura de queratinócitos humanos. As culturas celulares foram incubadas com o extrato durante 48 horas nos seguintes grupos experimentais: Branco (sem nenhum tratamento), Controle LPS (células sensibilizadas com 200 µg/ml de LPS), Physalis 1 (LPS + 20 µg/ml de EHPLA), Physalis 2 (LPS + 7,6 µg/ml de EHPLA) e Physalis 3 (LPS + 3,8 µg/ml de EHPLA). Os níveis de histamina foram quantificados no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes (n=6). ** $P < 0,01$, em relação ao controle LPS (ANOVA, Dunnett).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A constante exposição da pele a uma variedade de xenobióticos pode resultar no aparecimento de reações alérgicas, irritantes, ou inflamatórias gerando lesão tecidual que pode variar de alterações estéticas até o desenvolvimento de neoplasias (Kohen, 1999; Goldsmith, 1996). Estas reações envolvem a participação de células epidérmicas, dérmicas, endoteliais e leucócitos infiltrados, que interagem entre si estimulados por uma série de mediadores. Além de destruir o tecido cutâneo diretamente, esses agentes alteram o metabolismo celular e induzem a liberação, formação ou ativação de mediadores, como histamina, metabólitos do ácido araquidônico, quininas, proteínas do complemento, espécies reativas de oxigênio e citocinas (Corsini e Galli, 2000). Na pele, esses eventos provocam sintomas, como prurido e ardência em áreas agredidas, ressecamento associado à aparência desvitalizada, assim como aumento de rugas e hiperpigmentação (Briganti e Picardo, 2003).

Assim, o estudo de novos compostos com atividade biológica que atuem no sentido de manter o equilíbrio fisiológico da pele resultando em ações preventivas dos efeitos indesejáveis produzidos pelo processo inflamatório é uma importante área em crescimento na pesquisa e desenvolvimento de ativos dermocosméticos.

Embora existam no mercado produtos com atividade anti-inflamatória, existem poucos estudos com esse enfoque utilizando produtos de origem vegetal, e mais raros são os estudos com plantas nativas de biomas tropicais como a Amazônia, o Cerrado e a Mata Atlântica. Dessa forma investigações das potencialidades desses produtos na área farmacêutica e fitocosmética são de grande valor, não só porque a demanda destes produtos no mercado é alta, mas principalmente, porque o conhecimento gerado poderia garantir a

sustentabilidade das espécies com uma conseqüente conservação ambiental. Com base nestas informações, a espécie *Physalis angulata*, dada suas atividades biológicas, composição química e usos tradicionais foi selecionada para o presente estudo.

A epiderme é responsável por nossa comunicação com o meio externo e, portanto, é alvo constante de agentes agressores que podem desencadear processos inflamatórios (O'Sullivan et al., 1998; Kanitakis, 2002), que afetam a homeostasia do órgão e podem resultar em importantes alterações metabólicas e na aparência da pele (O'Sullivan et al., 1998; Boelsma et al., 2001). Considerando que a epiderme é composta em quase sua totalidade por queratinócitos, essas células possuem uma atuação fundamental na indução e regulação dos eventos inflamatórios. Isso ocorre através da síntese, liberação e reconhecimento de um grande número de mediadores inflamatórios responsáveis por iniciar, amplificar e coordenar esses eventos (Slominski & Wortsman, 2000; Gröne, 2002; Kanitakis, 2002; Silva, 2002).

Levando em consideração a atuação dos queratinócitos no processo inflamatório, podemos observar um expressivo potencial do extrato de *Physalis angulata* como ativo anti-inflamatório, observando os resultados obtidos para mediadores anti e pró-inflamatórios em culturas de queratinócitos inflamados com LPS e tratados com o extrato, em comparação com os respectivos controles apenas inflamados.

A histamina teve sua produção diminuída significativamente pelo extrato, demonstrando que o extrato pode ter ação em processos de hipersensibilidade, com os quais esse mediador está intimamente relacionado (Kanda & Watanabe, 2007), além disso, essa diminuição pode significar em um menor aumento da permeabilidade vascular refletindo em diminuição de edemas (Silva, 2002; Kanda & Watanabe, 2007).

O extrato também teve sua atividade anti-inflamatória avaliada em um importante representante da classe dos eicosanóides (substâncias derivadas do ácido araquidônico resultantes da cascata de reações induzidas pela inflamação) a prostaglandina E_2 (PGE_2). Esse representativo mediador também teve sua liberação reduzida pelo tratamento com o extrato em comparação ao controle, o que indica que o extrato é capaz de alterar não só mediadores de resposta imediata a agressores, mas, também influencia a resposta inflamatória já estabelecida.

Uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias tem demonstrado que atuam de forma central na manutenção da integridade física do tecido conectivo da pele, agindo em mecanismos como regulação da proliferação, diferenciação e migração celular, síntese dos componentes da matriz extracelular (MEC), síntese de proteases e inibidores de proteases (Werner & Grose, 2003). Em adição as citocinas pró-inflamatórias, a citocina anti-inflamatória IL-10 também é considerada como importante mediador da reparação tecidual sendo considerado fundamental para os processos de limitação e finalização do processo inflamatório, além disso, também regula o crescimento e diferenciação e queratinócitos e células endoteliais (Werner & Grose, 2003).

Nossa avaliação da atividade do extrato para o perfil das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 mostrou uma resposta coerente com os outros parâmetros avaliados e foi eficiente em reduzir a produção dessas citocinas. Quanto a citocina anti-inflamatória IL-10 o extrato evidenciou ser capaz de aumentar sua síntese frente ao controle inflamado.

A análise da composição graxa do EHLPA evidenciou a presença significativa de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) do tipo ômega 3 (ω -3) ácido linolênico, 6 (ω -6) ácido linoléico e ácido graxo monoinsaturado do tipo ômega 9 (ω -9) ácido oléico. A presença desses ácidos

insaturados pode explicar a ação biológica observada do EHLPA, uma vez que muitos estudos apontam a expressiva capacidade desses ácidos em modular importantes vias da inflamação aguda e crônica.

Os ácidos graxos insaturados do tipo ω -3, 6 e 9 são relacionados por muitos estudos com a capacidade de modificar a produção e atividade de vários componentes do sistema imune influenciando, assim, a resposta inflamatória (Cardoso, et al., 2004). Vários mecanismos foram propostos incluindo a alteração da fluidez da membrana celular, peroxidação lipídica, metabolismo do ácido araquidônico e regulação de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (Benatti et al., 2004; Cardoso, et al., 2004; Surette, 2008; Yashodhara et al., 2009; Cardodo et al., 2011).

A habilidade dos ácidos graxos ω -3 em interferir com o metabolismo do ácido araquidônico é o principal mecanismo sugerido para caracterizar seus efeitos anti-inflamatórios. Tem sido evidenciado que estes ácidos graxos atuam através da competição pelas enzimas ciclooxygenase e lipooxygenase que possuem como principal substrato o ácido araquidônico, um importante precursor de mediadores inflamatórios, responsável pela síntese de prostaglandinas e leucotrienos, com conseqüente redução da produção desses mediadores inflamatórios (Simopoulos, 2002; Surette, 2008; Yashodhara et al., 2009).

Porém, enriquecer tecidos ou células com ω -3, 6 e 9 também é capaz de interferir com a atividade de células que atuam na resposta inflamatória, visto que esses ácidos podem atuar como componentes estruturais da célula participando da síntese dos fosfolipídios de membrana, e assim alteram a fluidez e a fisiologia da membrana celular interferindo em mecanismos como a transdução de sinais intra e intercelulares, proliferação celular (Boelsma et al., 2001; Cardoso, et al., 2004; Surette, 2008; Cardoso, et al., 2011) e a

composição e função de “rafts” da membrana celular (microdomínios que contém proteínas sinalizadoras), modulando assim a expressão de proteínas de adesão (Surette, 2008). Os ácidos graxos do tipo ω -3, em particular, são capazes também de alterar vias da comunicação intracelular associadas com o controle de fatores de transcrição (por exemplo, o Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$, NF- $\kappa\beta$) e de expressão gênica. Esses ácidos também podem se ligar diretamente a receptores nucleares, como o receptor de retinóides X, que operam como fatores transcrpcionais (Surette, 2008).

Ácidos graxos insaturados são hábeis em influenciar a resposta imune mediada por células gerando mediadores lipóides como hidroperóxidos intermediários, que possuem atividade anti-inflamatória, ou lipoxinas que favorecem o perfil Th2 (Linfócito T helper 2) da resposta imune e assim influenciam a reparação tecidual que é favorecida por esse perfil de resposta. (Benatti et al., 2004; Cardoso, et al., 2004).

Dessa forma, os ácidos graxos insaturados do tipo ω -3, 6 e 9 são capazes de modular direta ou indiretamente um grande número de mecanismos celulares relacionados à inflamação constituindo assim componentes importantes para atividade anti-inflamatória do extrato de *Physalis angulata* observada nesse estudo.

A associação desses resultados demonstra a habilidade do extrato de regular a resposta inflamatória através de diferentes classes de mediadores reduzindo a intensidade do processo inflamatório no tecido agredido. Essa característica tem grande importância na avaliação do potencial do extrato de *Physalis angulata* como dermocosmético, especialmente quando relacionamos a capacidade de modulação da resposta inflamatória com um processo de reparação tecidual adequado que resulta na manutenção da integridade física da pele prevenindo o envelhecimento cutâneo precoce.

Assim sendo, podemos concluir que o extrato hidrometanólico liofilizado de *Physalis angulata* L., quando avaliado *in vitro* em culturas de queratinócitos humanos, possui significativa atividade anti-inflamatória sendo capaz de modular a síntese de diversas classes de mediadores. Os dados permitem ainda sugerir que a atividade biológica detectada no extrato pode estar relacionada à presença dos diferentes ácidos graxos identificados e padronizados no extrato.

Portanto, o extrato é um potencial ativo dermocosmético uma vez que interage com mecanismos de regulação da manutenção e reparação tecidual, podendo assim interferir com a aparência da pele prevenindo mecanismos que levam ao envelhecimento precoce.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbi, NS.; Xavier, DCD.; Tomassini, TCB.** *Volatile's composition of Physalis angulata L.* Bolletino Farmaceutico, v138, n2, pCVIII (1999).
- Basey, K.; Mc Graw, BA.; Woolley, JG.** *Phygrine, an alkaloid from Physalis especies.* Phytochemistry v31, n12, p4173-4176 (1992).
- Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani, M.** *Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties.* Journal of the American College of Nutrition, Vol. 23, No. 4, 281–302 (2004).
- Blok, WL.; Katan, MB.; Vandermeer, JWM.** *Modulation of Inflammation and Cytokine Production by Dietary (n-3) Fatty Acids.* J. Nutr. 126: 1515-1533 (1996).
- Boelsma, E.; Hendriks, H. F.J.; Roza, L.** *Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids.* Am J Clin Nutr; 73:853–64 (2001).
- Cardoso, CR.; Souza, MA.; Ferro, EAV.; Favoreto Jr, S.; Pena, JDO.** *Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds.* Wound Rep Reg; 12:235–243 (2004).
- Cardoso, CR.; Favoreto Jr, S.; Oliveira, LL.; Vancim, JO.; Barba, GB.; Ferraz, DB.; Silva, JS.** *Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair.* Immunobiology 216 409–415 (2011).
- Chiang, HC.; Jaw, SM.; Chen, CF.; Kan, WS.** *Antitumor agent, physalin F from Physalis angulata L.* Anticancer Res, May 1; 12(3): 837-43 (1992).
- Chiang, HC.; Jaw, SM.; Chen, PM.** *Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro.* Anticancer Res; Jul-Aug;12(4):1155-62 (1992).
- Choi, EM.; Hwang, JK.** *Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, Physalis angulata and Rosa hybrida.* Journal of Ethnopharmacology; 89 171–175 (2003).
- Choudhary, MI.; Yousaf, S.; Ahmed, S.; Samreen S.; Yasmeen, K.; Atta-ur-Rahman.** *Antileishmanial Physalins from Physalis minima.* Chemistry & Biodiversity: Vol. 2 (2005).
- Cosgrove, MC.; Franco, OH.; Granger, SP.; Murray, PG.; and Mayes AE.** *Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women.* Am J Clin Nutr; 86:1225–31 (2007).

- Costin, GE.; Hearing, VJ.** *Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress.* The FASEB Journal; 21: 976-994 (2007).
- Conte, L.A.** *Shaman pharmaceuticals' approach to drug Discovery.* In: Balick, M.J.; Elisabetsky, E., Laird, L.A. (eds.) *Medicinal resources of the tropical forest – biodiversity and its importance to human health.* New York, Columbia University Press, 94-100 (1996).
- Feingold, KR.** *The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis.* Journal of Lipid Research; vol 48 (2007).
- Freinkel, RK.; Woodley, DT.** *The Biology of the Skin.* The Parthenon Publishing Group (2001).
- Goodman; Gilman.** *As bases farmacológicas da terapêutica 11ª ed.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil (2006).
- Holbrook, KA.** *The biology of human fetal skin at ages related to prenatal diagnosis.* Pediatr Dermatol; 1:97-111 (1983)
- Hsieh, W-T.; Huang, K-Y.; Lin, H-Y.; Chung, J-G.** *Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells.* Food and Chemical Toxicology 44 974–983 (2006).
- Ismail, N.; Alam, M.** *A novel cytotoxic flavonoid glycoside from Physalis angulata.* Fitoterapia; 72 676-679 (2001).
- Januário, AH.; Rodrigues Filho, E.; Pietro, RCLR.; Kashima, S.; Sato DN.; França, SC.** *Antimycobacterial Physalins from Physalis angulata L. (Solanaceae).* Phytother. Res. 16, 445–448 (2002).
- Junqueira, L.; Carneiro, J.** *Basic Histology: Text & Atlas (ed. 11).* McGraw-Hill Professional, (2005).
- Kanda, N.; Watanabe, S.** *Histamine enhances the production of human -defensin-2 in human keratinocytes.* Am J Physiol Cell Physiol 293: C1916–C1923 (2007).
- Kanitakis, J.** *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.* Eur. Journal of Dermatology; v12, n4, 390-401 Aug (2002).
- Kupper TS, Fuhlbrigge RC.** *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.* Nature Rev Immunol 04:211-20 (2004).
- Lin, YS.; Chiang, HC.; Kan WS.; Hone, E.; Shih, SJ.; Won, MH.** *Immunomodulatory activity of various fractions derived from Physalis angulata L extract.* Am J Chin Med;20(3-4):233-43 (1992).

Lorenzi H., Matos F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo; 455-456 (2002).

Makino, B.; Kawai, M.; Ogura, T.; Nakanishi, M.; Yamamura, H.; Butsugan, Y. *Structural Revision of Physalin H isolated from Physalis angulata*. Journal of Natural Products Vol58, N11, p1668-1674, November (1995).

Marcatili, A.; Cipollaro de l'Ero, G.; Galdiero, M.; Folgore, A.; Petrillo, G. *TNF- α , IL-1 α , IL-6 and ICAM-1 expression in human keratinocytes stimulated in vitro with Escherichia coli heat-shock proteins*. Microbiology, 143,45-53 (1997).

Nagafuji, S.; Okabe, H.; Akahane, H.; Abe, F. *Trypanocidal Constituents in Plants. Withanolides from the Aerial Parts of Physalis angulata*. Biol. Pharm. Bull. 27(2) 193-197 (2004).

O'Sullivan, R. L.; Lipper, G.; Lerner, E. A. *The Neuro-Immuno-Cutaneous-Endocrine Network: Relationship of Mind and Skin*. Arch Dermatol; 134:1431-1435 (1998).

Plotnikoff NP, Faith RE, Murgo AJ, Good RA. *Cytokines: stress and immunity*. Library of congress cataloging-in-publication data (1998)

Purushothaman, KK.; Vasanth, S. *Chemistry and pharmacology of steroids derivatives from Physalis*. J. Scient. Ind. Res. 47, 326-334 (1988).

Rodrigues, E.; West, J.E. *International research on biomedicines from tropical rain Forest*. Interciencia 20(3): 140-143 (1995).

Row, LR.; Sarma, NS.; Matsuura, T.; Nakashima, R. *Physalins E and H, new physalins from Physalis angulata and P. lancifolia*. Phytochemistry, v17, p1641-1645 (1978).

Row, LR.; Sarma, NS.; Reddy, KS.; Matsuura, T.; Nakashima, R. *The structure of physalins F and J from Physalis angulata and P. lancifolia*. Phytochemistry, v17, p1647-1650 (1978).

Shim, JS.; Park, KM.; Chung, JY.; Hwang, JK. *Antibacterial activity of oleanolic acid from Physalis angulata against oral pathogens*. Nutraceuticals and Food; v6, n2, 215-218 (2002).

Shingu, K.; Marubayashi, N.; Ueda, I.; Yahara S.; Nohara, T. *Physagulin C, a New Withanolide from Physalis angulata L.* Chemical & pharmaceutical bulletin, v39, n6 p1591-1593 (1991).

Shingu, K.; Yahara S.; Nohara, T.; Okabe, H. *Three new withanolides, physagulins A, B and D from Physalis angulata L.* Chem. Pharm. Bull; 40(8): 2088-2091 (1992).

- Shingu, K.; Yahara S.; Okabe, H.; Nohara, T.** *Three new withanolides, physagulins E, F and G from Physalis angulata L.* Chem. Pharm. Bull; 40(9): 2448-2451 (1992).
- Silva, MTG.; Simas, SM; Batista TGFM; Cardarelli P.; Tomassini TCB.** *Studies on antimicrobial activity, in vitro, of Physalis angulata L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; v100(7): 779-782, November (2005).
- Silva, P.** *Farmacologia 6ª ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 566-569 (2002).
- Simopoulos, AP.** *Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases.* Journal of the American College of Nutrition, Vol. 21, No. 6, 495–505 (2002).
- Slominski, A.; Wortsman, J.** *Neuroendocrinology of the Skin.* Endocrine Reviews; 21(5): 457-487 (2000).
- Soares, MB., Bellintani, MC., Rlibeiro, IM., Tomassini, TC.; Ribeiro dos Santos, R.** *Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from Physalis angulata L.* Eur. J. Pharmacol; 459, 107–112 (2003).
- Soares, MB.; Brustolim, D.; Santos, LA.; Bellintani, MC.; Paiva, FP.; Ribeiro, YM.; Tomassini, TC.; Ribeiro dos Santos, R.** *Physalins B, F and G, seco-steroids purified from Physalis angulataL., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection.* International Immunopharmacology 6 408– 414 (2006).
- Stites, DP.; Terr, AI.; Parslow, TG.** *Imunologia Médica 9ª ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.141-51 (2000).
- Streilein, JW.** *The skin-associated lymphoid tissue (SALT): origins and functions.* J Invest Dermatol; 80:12S–6S (1983).
- Surette, ME.** *The science behind dietary omega-3 fatty acids.* CMAJ; 178(2) (2008).
- Vieira, AT.; Pinho, V.; Lepsch, LB.; Scavone, C.; Ribeiro IM.; Tomassini T.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Soares, MBP.; Teixeira, MM.; Souza, DG.** *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury.* British Journal of Pharmacology (2005) 146, 244–251.
- Wysocki, AB.** *Skin anatomy, physiology, and pathophysiology.* Nurs. Clin. North. Am. Dec v34(4):777-797 (1999).

Wu, S-J.; Ng, L-T.; Lin, D-L.; Huang, S-N.; Wang, S-S.; Lin, C-C. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Letters* (2004).

Yashodhara, BM.; Umakanth, S.; Pappachan, JM.; Bhat, SK.; Kamath, R.; Choo, BH. *Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease.* *Postgrad Med J*; 85:84–90 (2009).

ANEXOS

Anexo 1: Certificação orgânica *Physalis angulata* L. plantio Chmeyunion Química LTDA

5361BR1000Z1p(BR)



CERTIFICADO DE CONFORMIDADE

PARA PRODUTOS DA AGRICULTURA ORGÂNICA DESTINADOS AO MERCADO INTERNO BRASILEIRO

ECOCERT BRASIL

atesta após inspeção, que os produtos listados abaixo e comercializados sob responsabilidade do operador:

CHEMYUNION QUÍMICA LTDA
 Rua José de Oliveira Cassú, 447
 Bairro Éden
 18103-065 - Sorocaba/SP

são produzidos, processados e/ou comercializados conforme as regras determinadas pela Lei 10.831/03, Decretos 6323/07 e 7048/09, IN 19/09, IN 50/09 e demais instruções Normativas correspondentes a cada escopo.

O operador concordou com essas regras e submeteu as unidades pertinentes às normas de inspeção previstas na Lei 10.831/03, Decreto 6323/07, Decreto 7048/09 e IN 19/09.

Data da última inspeção:

Toda referência ao modo de produção orgânica deve respeitar as regras determinadas pela Lei 10.831/03, Decretos 6323/07 e 7048/09, IN 19/09 e IN 50/09, bem como as demais normas nacionais brasileiras de rotulagem.

O produto rotulado deve referir-se a certificação da ECOCERT BRASIL conforme as regras de rotulagem da mesma.

Local de produção	Comercializador	Ano da colheita
CHEMYUNION QUÍMICA LTDA 18103-065 - Sorocaba/SP - Brasil	CHEMYUNION QUÍMICA LTDA 18103-065 - Sorocaba/SP - Brasil	2011

Produtos comerciais	Categoria de certificação	Quantidade estimada (toneladas)
Camapu (<i>Physalis angulata</i>) in natura	Produto orgânico - IN 64/08	0,595
Picão preto (<i>Bidens pilosa</i> L.) in natura	Produto orgânico - IN 64/08	0,06
Melscreen Coffee ORG	Produto orgânico - IN 18/09	Conforme matéria prima certificada
Melscreen Coffee DEO ORG	Produto orgânico - IN 18/09	Conforme matéria prima certificada

Este certificado não acoberta a transação de mercadorias. Sendo o caso, as mercadorias devem ser acompanhadas do certificado de transação correspondente. O operador tem o direito de utilizar este certificado e os certificados de transação conforme as regras fixadas pelo contrato de certificação e orientações que lhe tenham sido fornecidas.

Certificado n°
5361BR1000Z1p(BR)

Valido até:
2/2/2012
(ou na data de rescisão do contrato de certificação)

Santa Rosa de Lima/SC,
3/2/2011



ECOCERT BRASIL
 RUA GERMÃO HERMESMEYER, S/N°
 88.783-000 - SANTA ROSA DE LIMA/SC



Pela ECOCERT BRASIL
Responsável de certificação

Este documento é propriedade da ECOCERT BRASIL e deve ser devolvido mediante solicitação. Somente o original é válido.

ECOCERT BRASIL
 Rua Germano Hermesmeier, s/n 88.783-000 - Santa Rosa de Lima/SC
 Tel/Fax: 48-3232.8033 e-mail: ecocert@ecocert.com.br CNPJ: 07.404.814 / 0001-30

Anexo 2: Relatórios de análise através de Cromatografia gasosa da composição graxa do extrato liofilizado hidrometanólico de *Physalis angulata*

 RELATÓRIO DE ANÁLISE - LABORATÓRIO INSTRUMENTAL	
RELATÓRIO Nº: 0078/11	
PRODUTO: Extrato Hidrometanólico Liofilizado de Physalis Angulata	LOTE: N.C.
ANÁLISE: Composição Graxa	
SOLICITANTE: Juliana	DEPARTAMENTO: Eficácia e Segurança
OBSERVAÇÕES:	
Técnica utilizada:	C_GRAXA1.M (GC-FID)
Concentração:	289,5 mg
Arquivos:	C:\HPCHEM\1\DATA\20110131\PHYS0001.D e PHYS0002.D Processamento: C_GRAX61.M Referência: Log Book (EQ03) - Análise Nº 019/11
Especificação/Resultado esperado:	N.C.
RESULTADOS:	
Ácidos Graxos	Resultado (%p/p)
Ác. Palmítico (C16:0)	42,62
Ác. Esteárico (C18:0)	8,16
Ác. Oléico (C18:1)	7,54
Ác. Linoléico (C18:2)	31,30
Ác. Linolênico (C18:3)	8,58
Ác. Araquídico (C20:0)	1,80
*Análise Informativa.	
Responsável: Samuel Highet	DATA: 01/02/2011
Revisado por:	

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\20110131\PHYS0001.D

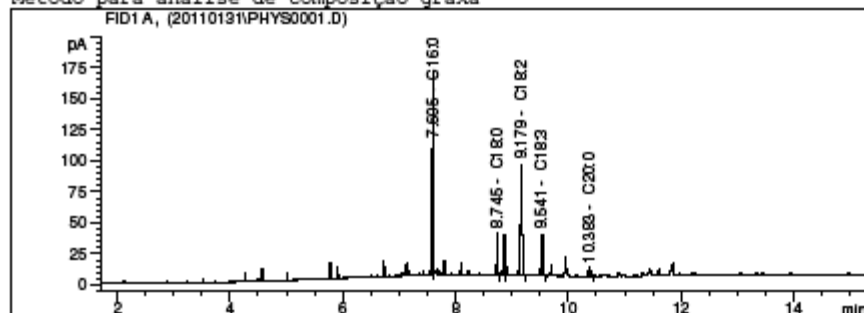
Sample Name: PHYSALIS

EXTRATO HIDROMETANÓLICO LIOFILIZADO DE PHYSALIS ANGULAT
A

```

=====
Injection Date   : 31/1/2011 16:30:50
Sample Name     : PHYSALIS                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : SAMUEL HIGHET                 Inj       : 1
                                                Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\C_GRAXA1.M
Last changed    : 31/1/2011 16:18:50 by SAMUEL HIGHET
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\C_GRAX61.M
Last changed    : 31/1/2011 17:14:45 by Elisangela Scorsato
Método para análise de composição graxa
=====

```



```

=====
                        Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 31/1/2011 16:52:59
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	4.076		0.0000	0.00000	0.00000	C8:0
2	5.102		0.0000	0.00000	0.00000	C10:0
3	6.050		0.0000	0.00000	0.00000	C12:0
4	6.750		0.0000	0.00000	0.00000	C14:0
5	7.605	VV	0.0205	258.00470	42.41915	C16:0
6	7.800		0.0000	0.00000	0.00000	C16:1
7	8.200		0.0000	0.00000	0.00000	C17:0
8	8.745	VV	0.0207	49.88205	8.20122	C18:0
9	8.865	VV	0.0210	45.99874	7.56276	C18:1
10	9.179	BB	0.0291	190.87172	31.38166	C18:2
11	9.541	VB	0.0242	52.35886	8.60844	C18:3
12	10.383	BP	0.0261	11.11090	1.82677	C20:0
13	11.600		0.0000	0.00000	0.00000	C20:1
14	12.300		0.0000	0.00000	0.00000	C22:0
15	12.700		0.0000	0.00000	0.00000	C22:1
16	14.355		0.0000	0.00000	0.00000	C24:0

Totals : 608.22698

Results obtained with enhanced integrator!

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

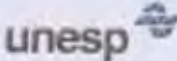
Warning : Calibrated compound(s) not found

```

=====
                        *** End of Report ***

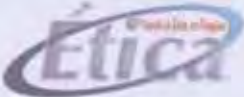
```

Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética – Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br




Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de agosto de 2.009

OF. 304/2009-CEP

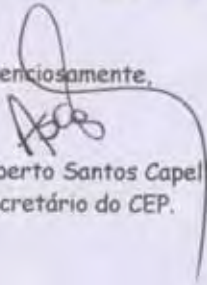
Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi
Departamento de Farmacologia do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Prof. Luiz Cláudio,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3287-2009) "Avaliação dos efeitos de extratos vegetais sobre a produção de mediadores imunológicos, inflamatórios, endócrinos e neurais em células de tecido cutâneo humano e suas possíveis aplicações na área dermatológica e estética", que será conduzido por Juliana Tibério Checon, com a participação de Maria Del Carmen Velásquez Pereda, Gustavo de Campos Dieamant, Samara Eberlin e Jéssica Eleonora Pedroso Sanches Silveira com orientação de Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 03/08/2009.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.