

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados à avaliação de toxicidade e
eficácia de fitocosmético

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados à avaliação de toxicidade e
eficácia de fitocosmético

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara – SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A559m Andréo, Bruna Galdorfini Chiari
Modelos *in vitro* e *in vivo* aplicados à avaliação de toxicidade e eficácia de fitocosmético
/ Bruna Galdorfini Chiari Andréo. — Araraquara, 2014
187 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Vera Lucia Borges Isaac

1. Psidium guajava L. 2. Cosmético. 3. Antioxidante. 4. Fotoquimioprotetor. 5. Eficácia. 6. Segurança. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que, se não existissem na minha vida, a tornariam sem sentido: Meus pais, José Maria e Solange, meu irmão, Caio e meu marido, Rogério!

Como é importante tê-los sempre ao meu lado!

Agradeço a Deus por ter me escolhido para viver perto de vocês!

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac** pela orientação, ensinamentos, amizade e por acreditar que, mesmo com as dificuldades, alcançaríamos nossos objetivos.

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa** pelos ensinamentos e amizade.

Agradeço aos professores **Dra. Vera Lucia Borges Isaac** e **Dr. Marcos Antonio Corrêa** por terem me apresentado a Cosmetologia, que me despertou tanto interesse e gosto em aprender cada vez mais!

À **Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci** pela sua importante colaboração para permitir que esse trabalho fosse concluído.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

À **Indústria de Alimentos Predilecta** de São Lourenço do Turvo - SP pela doação das goiabas da variedade Paluma.

À **FINEP, FUNDUNESP, PADC-FCF-UNESP** pelo apoio concedido.

À **Helena e Dani** por terem contribuído com a realização deste trabalho durante o desenvolvimento de seus projetos de Iniciação Científica.

À veterinária **Jaqueline Ferreira Santos** por ter auxiliado nos ensaios realizados com animais.

Aos professores: **Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório, Profa. Dra. Eliana Varanda, Profa. Dra. Adriana Marcatônio, Prof. Dr. Elcio Marcantônio e Profa. Dra. Teresa M. Garrigues** por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos **Professores Dr. Pedro Alves da Rocha Filho, Dr. Marcos Antonio Corrêa, Dra. Gislaine Ricci Leonardi, Dra. Vania Rodrigues Leite e Silva** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando das bancas de qualificação e defesa.

A todos meus **amigos do Laboratório de Cosmetologia**, principalmente, Gabi, Dani, Helena, Carol, Ana e Ilza pelas ajudas e bons momentos que passamos juntas.

À **Eliane Trovatti; Ana Carolina Nazaré; Claudia Tavares dos Santos; Rone, Flavia e Ana Paula** do Laboratório de Mutagenicidade; pelas importantes contribuições oferecidas neste trabalho.

Às **amigas da República 433**: Gabi, Tathi, Bruninha, Danila, Carol e Ana Paula, obrigada pelos ótimos momentos que sempre serão recordados!

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1. A importância do uso de plantas para a promoção de benefícios à saúde humana	24
2.2. Alguns efeitos benéficos do uso de plantas	25
2.3. Os efeitos benéficos do uso de plantas para a Cosmetologia	26
2.4. A biodiversidade brasileira	28
2.5. A goiaba.....	28
2.6. O estudo de efeitos quimioprotetores na Cosmetologia	29
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo geral	34
4.2. Objetivos específicos	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1. Preparo do material vegetal	37
5.2. Preparo do extrato vegetal	38
5.3. Preparo da formulação	39
5.4. Estudos de segurança	41
5.4.1. Estudos de segurança <i>in vitro</i>	41
5.4.1.1. Avaliação da citotoxicidade.....	41
5.4.1.2. Avaliação do potencial mutagênico	43
5.4.1.2.1. Em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	43
5.4.1.2.2. Em células humanas HepG2	48
5.4.1.2.3. Em células humanas HaCat.....	51
5.4.2. Estudos de segurança <i>in vivo</i>	51
5.4.2.1 Avaliação da irritação dérmica primária.....	51
5.4.2.2. Avaliação da irritação dérmica cumulativa.....	53
5.4.2.3. Avaliação do potencial comedogênico	53
5.4.2.4. Avaliação da irritação ocular primária.....	54

5.4.2.5. Análises histopatológicas.....	55
5.5. Estudos de eficácia.....	60
5.5.1. Estudos de eficácia <i>in vitro</i>	60
5.5.1.1. Avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase	60
5.5.1.2. Avaliação do potencial fotoprotetor.....	60
5.5.1.3. Avaliação do potencial quimioprotetor.....	61
5.5.1.4. Avaliação do potencial antimutagênico	62
5.5.1.5. Análise da atividade antioxidante pelo método da enzima superóxido dismutase (SOD-like activity).....	63
5.5.1.6. Análise da produção de colágeno em células HDFa.....	64
5.5.2. Estudos de eficácia <i>in vivo</i>	66
5.5.2.1. Análises histopatológicas.....	66
5.6. Estudos das respostas celulares frente ao tratamento com o extrato de <i>Psidium guajava</i> L.....	68
5.6.1. Avaliação do perfil de produção de TGF- β 1	68
5.6.2. Análise do perfil de despolarização de membrana mitocondrial (indicativo de apoptose).....	70
5.7. Análise estatística dos resultados.....	72
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1. Estudos de segurança	75
6.1.1. Estudos de segurança <i>in vitro</i>	75
6.1.1.1. Avaliação da citotoxicidade.....	75
6.1.1.2. Avaliação do potencial mutagênico	79
6.1.1.2.1. Em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	79
6.1.1.2.2. Em células humanas HepG2	85
6.1.1.2.3. Em células humanas HaCat.....	90
6.1.2. Estudos de segurança <i>in vivo</i>	90
6.1.2.1. Avaliação da irritação dérmica primária.....	90
6.1.2.2. Avaliação da irritação dérmica cumulativa.....	91
6.1.2.3. Avaliação da potencial comedogênico	93
6.1.2.4. Avaliação da irritação ocular	95
6.1.2.5. Análises histopatológicas.....	96
6.2. Estudos de eficácia.....	112
6.2.1. Estudos de eficácia <i>in vitro</i>	112

6.2.1.1. Avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase	112
6.2.1.2. Avaliação do potencial fotoprotetor.....	115
6.2.1.3. Avaliação do potencial quimioprotetor.....	118
6.2.1.4. Avaliação do potencial antimutagênico	132
6.2.1.5. Análise da atividade antioxidante pelo método da enzima superóxido dismutase (SOD-like activity)	136
6.2.1.6. Análise da produção de colágeno em células HDFa.....	138
6.2.2. Estudos de eficácia <i>in vivo</i>	141
6.2.2.1 Análises histopatológicas.....	141
6.3. Estudos das respostas celulares frente ao tratamento com o extrato de <i>Psidium</i> <i>guajava</i> L.....	148
6.3.1. Avaliação do perfil de produção de TGF- β 1	148
6.3.2. Análise do perfil de despolarização de membrana mitocondrial (indicativo de apoptose)	155
7. CONCLUSÃO.....	165
8. REFERÊNCIAS	167
ANEXO I.....	187

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de preparação do material vegetal (CHIARI, 2011).....	38
Figura 2. Imagem do processo extrativo	38
Figura 3. Procedimento para avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> (CHIARI, 2011).....	43
Figura 4. Esquema simplificado do teste de Ames (Modificado de: http://www.prc.cnrs-gif.fr/spip.php?rubrique98&lang=fr)	47
Figura 5. Fotomicrografias de células binucleadas apresentando 1 micronúcleo (a), 2 micronúcleos (b), brotamentos nucleares (c) e pontes nucleoplasmáticas (d) (Modificado de: NEFIC e HANDZIC, 2013).....	50
Figura 6. Visualização de micronúcleos através da coloração acridina laranja (Fonte: http://www.hdbiosciences.com/inv.html).....	51
Figura 7. Esquema de tratamento dos animais para avaliação da irritação dérmica (Figura do autor).....	53
Figura 8. Esquema de tratamento dos animais para avaliação da comedogenicidade (Figura do autor).....	54
Figura 9. Biópsia da pele dos animais sendo envolta em papel manteiga (à esquerda) e acondicionada em cassetes histológicos identificados (à direita).....	55
Figura 10. Bateria de diafanização dos cortes histológicos.....	56
Figura 11. Preparação das lâminas, com quatro cortes histológicos	57
Figura 12. Representação das áreas analisadas em cada lâmina histológica obtida após a captura das imagens (Figura do autor)	59
Figura 13. Régua quadriculada utilizada sobre as fotomicrografias para a quantificação das diferentes estruturas.....	59
Figura 14. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de <i>P. guajava</i> L. em células HepG2	75
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. em células HepG2	76

Figura 16. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de <i>P. guajava</i> L. em células HaCat.....	76
Figura 17. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. em células HaCat.....	77
Figura 18. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de <i>P. guajava</i> L. em células HDFa	77
Figura 19. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. em células HDFa	78
Figura 20. Formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas (Adaptado de FENECH, 2007)	86
Figura 21. Quantidade de células binucleadas que apresentaram um, dois ou três micronúcleos (MNs) em 1000 células. A análise estatística (ANOVA, $p<0,05$) foi realizada separadamente para células binucleadas que apresentaram 1 micronúcleo (^{a,b}), 2 micronúcleos (^c) e 3 micronúcleos (^d) (CN: Controle negativo e CP: Controle positivo) (^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$))	87
Figura 22. Frequência de micronúcleos em cada 1000 células binucleadas (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$))	88
Figura 23. Frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares a cada 1000 células em relação aos tratamentos (CN: Controle negativo, CP: Controle positivo) (A análise estatística foi realizada separadamente para as pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares) (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$)).....	89
Figura 24. Aspecto da pele de um dos coelhos após 14 dias consecutivos de tratamento (1 – controle, 2 – creme base, 3- fitocosmético, 4 – peróxido de hidrogênio, 5 – peróxido de hidrogênio/fitocosmético).....	92
Figura 25. Aspecto da pele de um dos coelhos após 24h do último dia de tratamento com o fitocosmético (1- fitocosmético, 2 – controle negativo).....	94
Figura 26. Aspecto da pele de um dos coelhos após 24h do último dia de tratamento com o creme base (1- creme base, 2 – controle negativo).....	94

Figura 27. Olho tratado com fitocosmético (esquerda) e controle (direita), após 24 horas da aplicação.....	95
Figura 28. Olho tratado com o creme base (esquerda) e controle (direita), após 24 horas da aplicação	95
Figura 29. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele sem tratamento (controle negativo) (aumento de 200 vezes).....	97
Figura 30. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele sem tratamento (controle negativo). Destaque para células inflamatórias (○) e para células fusiformes (▬)	98
Figura 31. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base (aumento de 200 vezes).....	99
Figura 32. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base. Destaque para células inflamatórias (○), para células fusiformes (▬) e para vasos sanguíneos dilatados (◇).....	99
Figura 33. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o fitocosmético (aumento de 200 vezes)	100
Figura 34. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o fitocosmético. Destaque para células inflamatórias (○), para células fusiformes (▬) e para vasos sanguíneos dilatados (◇)	101
Figura 35. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio (aumento de 200 vezes).....	102
Figura 36. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio. Destaque para células inflamatórias (○), para células fusiformes (▬) e para vasos sanguíneos dilatados (◇)	102
Figura 37. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada alternadamente com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético (aumento de 200 vezes)	104

Figura 38. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada alternadamente com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético. Destaque para células inflamatórias (●) e para células fusiformes (■)	104
Figura 39. Porcentagem de células inflamatórias quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$))	106
Figura 40. Porcentagem de células inflamatórias quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (média dos 6 animais) (^a letras iguais indicam valores estatisticamente iguais ($p<0,05$)).....	106
Figura 41. Porcentagem de células fusiformes quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$))	108
Figura 42. Porcentagem de feixes de fibras colágenas quantificados em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$)).....	109
Figura 43. Via biossintética da melanina (Fonte: http://osfilhosdalua-albinismo.blogspot.com.br/)	112
Figura 44. Porcentagem de inibição da enzima tirosinase promovida por diferentes concentrações do extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	113
Figura 45. Perfil de absorção espectrofotométrica de soluções do extrato de <i>Psidium guajava</i> L. em diferentes concentrações.....	116
Figura 46. Fator de proteção máximo (FPM) exibido pelas formulações CB, F, FS e FFS nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm.	117
Figura 47. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HepG2	120
Figura 48. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HaCat.....	120
Figura 49. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HDFa	121

Figura 50. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	123
Figura 51. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	124
Figura 52. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	125
Figura 53. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	126
Figura 54. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	127
Figura 55. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	128
Figura 56. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	129
Figura 57. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	130

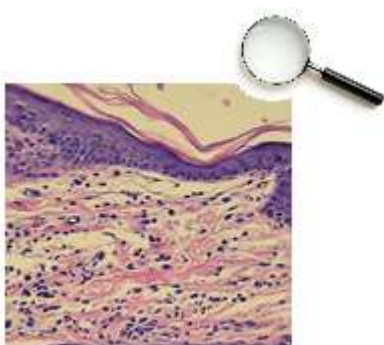
Figura 58. Co-tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de extrato de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 7,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 7,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	131
Figura 59. Co-tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio a 7,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 7,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).....	131
Figura 60. Porcentagem de inibição da formação dos cristais de formazana de WST-1 por diferentes concentrações do extrato de <i>Psidium guajava</i> L.....	137
Figura 61. Curva analítica da concentração de colágeno ($\mu\text{g/mL}$) <i>versus</i> a absorbância (550 nm)	138
Figura 62. Curva analítica da absorbância a 450 nm <i>versus</i> a concentração de TGF- β 1 (pg/mL).....	149
Figura 63. Expressão de TGF- β 1 em células HepG2 tratadas com o extrato de <i>P. guajava</i> L (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).	150
Figura 64. Expressão de TGF- β 1 em células HepG2 tratadas com o extrato neutralizado de <i>P. guajava</i> L (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual do fitocosmético (CHIARI, 2011)	40
Tabela 2. Tratamentos para as células HepG2 utilizados no ensaio do citoma	48
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ de cada um dos tratamentos com cada linhagem celular	78
Tabela 4. Atividade mutagênica, sem ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM)	81
Tabela 5. Atividade mutagênica, com ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM).....	83
Tabela 6. Índice de divisão nuclear (IDN) em cada um dos tratamentos	85
Tabela 7. Valores de FPS das formulações mensurados por espectrofotometria clássica e de reflectância.	118
Tabela 8. Valores de IC ₅₀ dos tratamentos com peróxido de hidrogênio em cada linhagem celular	122
Tabela 9. Atividade antimutagênica, sem ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e a porcentagem de inibição da mutagenicidade (%InM) promovida pelo controle positivo.	134
Tabela 10. Porcentagem de células HepG2 (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	159
Tabela 11. Porcentagem de células HaCat (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	161
Tabela 12. Porcentagem de células HDFa (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	162

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.....	44
Quadro 2. Conteúdo dos tratamentos do ensaio de mutagenicidade submetidos à pré-incubação.	46
Quadro 3. Procedimento de diafanização.....	56
Quadro 4. Etapas de coloração das lâminas com hematoxilina-eosina.....	58
Quadro 5. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.....	63
Quadro 6. Brancos de reação preparados para o ensaio de inibição da xantina oxidase (SOD determination kit, Sigma-Aldrich).	64
Quadro 7. Etapas de coloração das lâminas com tricrômio de Masson	67
Quadro 8. Concentrações de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. e peróxido de hidrogênio utilizadas nos tratamentos para avaliação do perfil de despolarização de membrana mitocondrial.....	71

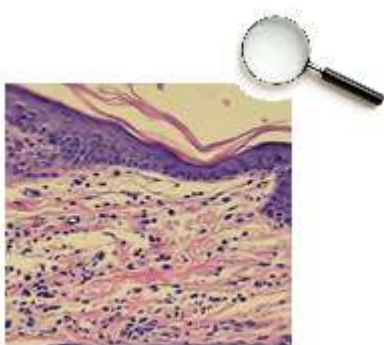


Resumo

RESUMO

É sabido que a maior consequência causada pela radiação ultravioleta gerada pela luz solar é o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de cânceres cutâneos por meio da ação dos radicais livres gerados na pele. A utilização, pela população, de uma formulação, de uso tópico, que auxilie na prevenção do envelhecimento precoce e de doenças causadas pelos radicais livres à pele humana teria imenso impacto, pois promoveria benefícios estéticos, que influenciariam diretamente a saúde psicológica do usuário e preveniriam a fotocarcinogênese. Este fato se torna ainda mais importante em um país tropical como o Brasil, onde a incidência de radiação UV tem se tornado cada vez maior, assim como o desenvolvimento de cânceres de pele na população. Este trabalho teve como objetivo realizar ensaios que comprovem a eficácia e a segurança de um fitocosmético contendo extrato de goiaba (*Psidium guajava* L.), além de descrever respostas celulares promovidas pelo tratamento com este extrato. No que diz respeito à eficácia deste produto, foram explorados os efeitos quimioprotetores, que podem ser obtidos com o emprego deste extrato e os efeitos relacionados à melhoria do aspecto da pele envelhecida. Em relação à segurança, foram realizadas análises *in vivo* e utilizados métodos alternativos, visando a substituição do emprego de animais. De acordo com os estudos realizados, o extrato de *Psidium guajava* L. é citotóxico apenas em concentração bastante superior à concentração ativa, com uma margem de segurança satisfatória. Nas concentrações sugeridas para efeito cosmético, o extrato vegetal não é mutagênico e não causou irritação dérmica, ocular e, nem mesmo comedogenicidade, quando aplicado em coelhos. Além disso, o extrato de *Psidium guajava* L. revelou atividade inibidora sobre os efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, é capaz de estimular a proliferação de fibroblastos, a biossíntese de colágeno e é capaz de reduzir a hiperpigmentação produzida pela exposição excessiva à luz solar.

Palavras-chave: *Psidium guajava* L.; cosmético; antioxidante; fotoquimioprotetor; eficácia e segurança; colágeno.

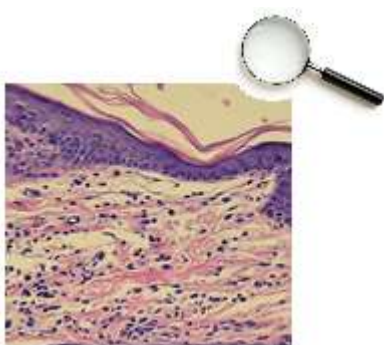


Abstract

ABSTRACT

It is known that the major consequence caused by the ultraviolet radiation generated by sunlight is photoaging and the development of skin cancers through the action of free radicals generated on the skin. The use by the population of a topical formulation aiming to prevent the premature skin aging and diseases caused by free radicals to human skin would be of great value. It also should provide aesthetic benefits that directly influence the psychological health of the user and would prevent photocarcinogenesis. This fact becomes even more important in a tropical country like Brazil, where the incidence of UV radiation has become increasingly larger, as well as the development of skin cancers in the population. This research aimed to perform assays to prove the efficacy and safety of a phytocosmetic containing guava (*Psidium guajava* L.) extract, and also, describe cellular responses observed with the treatment with this extract. With regard to the efficacy of this product, the chemoprotectors effects that can be obtained with the use of this extract and the improvement on the aged skin that could be obtained with the treatment with it were explored. In relation to the assessment of the safety of this phytocosmetic, *in vivo* and alternative methods to the use of animals were conducted. According to the results, the *Psidium guajava* L. extract is cytotoxic only at concentrations higher than the active concentration of this compound, exhibiting a satisfactory margin of safety. At the concentrations suggested for the cosmetic effect, the plant extract is not mutagenic and did not cause dermal, ocular, or even comedogenicity irritation when applied to rabbits. Moreover, the extract of this fruit was able to inhibit the deleterious effects of hydrogen peroxide in *in vitro* and *in vivo* experimental models, was able to induce the fibroblasts proliferation and collagen biosynthesis and is capable of reducing hyperpigmentation produced by overexposure to sunlight.

Key words: *Psidium guajava* L.; cosmetic; antioxidant; photochemoprotector, efficacy and safety; collagen.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A pele, além de ser o maior órgão do corpo humano é, também, o único cronicamente exposto ao ambiente (FISHER et al., 2008), agindo portanto, como uma fronteira ativa entre o organismo e o ambiente. Para a Cosmetologia, o conhecimento das estruturas e funcionamento da pele é essencial, pois tem como objetivo melhorar sua aparência com a utilização de ativos ou prevenir possíveis danos (WILKINSON e MOORE, 1990).

Este órgão é submetido a um fenômeno biológico complexo denominado envelhecimento, que pode ser didaticamente dividido em envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco é controlado geneticamente e ocorre, também, devido à formação de espécies reativas de oxigênio, de origem intracelular, resultantes do metabolismo das células. Já o extrínseco, ocorre devido a fatores ambientais, entre eles, o fumo, o álcool, a má nutrição e, finalmente, o sol (DRAELOS, 1999; BERRA et al., 2006; MCCULLOUGH e KELLY, 2006).

A radiação ultravioleta, produzida pelo sol, é uma importante fonte de formação de radicais livres no organismo, sendo a gravidade do dano causado proporcional ao tempo de exposição (THIELE et al., 1997; FUCHS et al., 1998; FISHER et al., 2002; MIYAMURA et al., 2007).

Os radicais livres estão diretamente relacionados com lesões provocadas na pele através da ação solar. Dentre os três tipos de radiação ultravioleta, a radiação ultravioleta A (UVA) é a maior responsável pelo fotoenvelhecimento (LAVKER et al., 1995). Esta radiação gera estresse oxidativo por ser absorvida por cromóforos da pele, como o ácido trans-urocânico, gerando espécies reativas de oxigênio, capazes de causar danos ao material genético, proteínas e lipídeos celulares (HANSON e SIMON, 1998; MCCULLOUGH e KELLY, 2006).

As alterações observadas na pele envelhecida pelo tempo são: desidratação, coloração pálida, rugas finas, flacidez e uma variedade de neoplasias benignas. Quando ocorre o fotoenvelhecimento, ou seja, o envelhecimento agravado pela ação da luz solar, a pele se apresenta desidratada, com pigmentação irregular, com sulcos profundos e lesões pré-malignas (YAAR e GILCHREST, 2001; YAAR et al., 2002). Estas características são observadas em áreas do corpo mais expostas como face, pescoço, dorso, antebraço e mãos, que sofrem alterações mais drásticas do que áreas protegidas

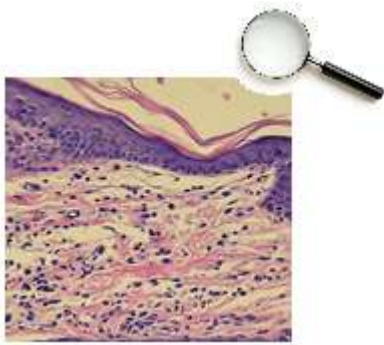
(FISHER et al., 2008), podendo apresentar anomalias clínicas, como as queratoses actínicas e a elastose solar (DE RIGAL et al., 1989).

Sendo assim, para prevenir ou minimizar o efeito dos radicais livres, quantidades suficientes de antioxidantes precisam ser consumidas diariamente (LIU, 2003). Outra forma de prevenção da ação danosa destas espécies reativas sobre a pele é a aplicação de produtos cosméticos contendo antioxidantes, que são produtos com função de reproduzir a proteção natural e limitar as reações químicas oxidativas. Assim, são utilizados, em formulações cosméticas, substâncias antioxidantes como vitaminas (E e C); ativos vegetais, como os flavonoides, entre outros.

Neste contexto, extratos de plantas com ação antioxidante são cada vez mais procurados para o desenvolvimento de cosméticos antienvhecimento. Cosméticos com atividade antioxidante têm se apresentado cada vez mais eficientes, capazes não só de prevenir, mas, também, de amenizar os efeitos do tempo sobre a pele, minimizando rugas e linhas de expressão (RODRIGUES, 2003).

A utilização de um produto de uso tópico pela população com esta atividade antioxidante e, possivelmente, quimioprotetora, poderia ser uma grande aliada na prevenção dos efeitos deletérios da radiação solar sobre a pele, podendo até evitar a formação de células cancerosas no maior e mais exposto órgão humano.

A goiaba, cuja atividade antioxidante foi apresentada em estudos anteriores (CHIARI et al., 2012a), foi explorada neste trabalho visando seu emprego seguro e eficaz em um fitocosmético, potencialmente capaz de prevenir, na pele humana, os efeitos danosos do tempo e de influências ambientais, como a luz solar.



Revisão *da Literatura*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A importância do uso de plantas para a promoção de benefícios à saúde humana

O conceito de que substâncias de origem vegetal são capazes de promover diversos efeitos benéficos à saúde humana não é novo, porém, com o avanço da ciência, cada vez mais se reconhece, de maneira detalhada, qual a forma que estes compostos podem agir e se verifica, que os efeitos benéficos que podem ser obtidos, são ainda mais expressivos. RASKIN et al., em 2002, afirmaram que existe a necessidade de redescobrir a conexão entre plantas e saúde para o lançamento de uma nova geração de produtos terapêuticos de origem botânica, onde são incluídos medicamentos derivados de plantas, suplementos alimentares, alimentos funcionais e proteínas recombinantes obtidas a partir de plantas.

Esses autores ainda acreditam que, em breve, estes produtos serão capazes de complementar não só os tratamentos convencionais com medicamentos, como também auxiliar na prevenção e até mesmo no diagnóstico de doenças. Poderão, também, colaborar com a sustentabilidade, valorizando a agricultura e com a preservação de espécies vegetais (RASKIN et al., 2002).

Apesar da grande exploração dos derivados vegetais para a descoberta de novos fármacos, acredita-se, ainda, que grande parte dos produtos naturais derivados de plantas não foi descoberta ou não foi explorada em relação à atividade farmacológica, sendo que estes recursos naturais podem ser avaliados em bilhões de dólares (MENDELSON e BALICK, 1995; RASKIN et al., 2002).

Além dos estudos de bioprospecção para a busca de derivados promissores de plantas, destinados a gerar benefícios à saúde, existe também a necessidade de validar o uso terapêutico de plantas medicinais já conhecidas, sendo esta uma etapa crucial no desenvolvimento de agentes fitoterápicos de baixo custo (CAVALCANTE et al., 2007).

A indústria farmacêutica, por muito tempo, buscou isolar substâncias ativas das plantas e, até mesmo, definir as estruturas químicas com o objetivo de sintetizá-las ou mesmo de sintetizar industrialmente seus análogos. É indiscutível a importância deste processo, uma vez que diversos fármacos utilizados atualmente foram derivados desta estratégia, como é o caso do ácido salicílico (RASKIN et al., 2002).

Contudo, é preciso considerar que a atividade biológica de extratos de plantas pode ser resultado do efeito sinérgico de seus componentes. Neste sentido, foram apresentadas evidências de que combinações fitoquímicas específicas são mais eficientes na proteção contra doenças quando comparados a compostos isolados (DE KOK et al., 2008), o que encoraja o estudo de extratos vegetais.

2.2. Alguns efeitos benéficos do uso de plantas

Nesta revisão da literatura são apresentados alguns dos efeitos benéficos do uso de plantas, dentre os inúmeros existentes na literatura científica.

NASCIMENTO et al. (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e seus efeitos sinérgicos com antibióticos considerados não efetivos, devido ao desenvolvimento da resistência bacteriana. Os resultados mais expressivos foram obtidos com *Caryophyllus aromaticus* e *Syzygium joabolanum*, que inibiram em 64,2 e 57,1%, respectivamente, o crescimento dos micro-organismos. Outro dado interessante obtido com este estudo foi que antibióticos considerados não efetivos, quando associados com extratos vegetais, em baixas concentrações, exerceram efeito antimicrobiano satisfatório.

Extratos vegetais também têm sido estudados em relação ao efeito estrogênico e muitos deles têm demonstrado eficácia, até mesmo como suplementos alimentares, para o tratamento dos sintomas da menopausa. LIU et al. (2001) demonstraram que o extrato de *Trifolium pratense* L. (trevo vermelho) apresentou efeitos estrogênicos mais satisfatórios entre os oito extratos vegetais avaliados (*Vitex agnus-castus* L., *Humulus lupulus* L., *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Panax quinquefolius* L., *Angelica sinensis*, *Glycyrrhiza glabra* L., *Cimicifuga racemosa* L.), sendo que a ginesteína é o principal componente responsável por este efeito.

As plantas possuem uma série de compostos que podem apresentar efeito protetor contra danos ao DNA causados por agentes mutagênicos ambientais nocivos para diversos organismos, incluindo seres humanos (DHIR et al., 1993; COZZI et al., 1997; CAVIN et al., 2001). O acúmulo de mutações está relacionado com o desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e desordens degenerativas, assim como a idade e anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE e COPPEDÈ, 2002). A fim de prevenir a genotoxicidade, é pertinente tanto identificar

agentes mutagênicos, visando à diminuição à sua exposição como, também, aumentar a exposição a compostos antigenotóxicos, como aqueles encontrados em plantas (IKUMA et al., 2006; JEONG et al., 2006). Este fato é particularmente relevante quando se considera que 31% dos tumores malignos podem ser evitados com dietas ricas em frutas e vegetais (KUNDU e SURH, 2005). Desta forma, estudos vêm sendo conduzidos a fim de identificar compostos que possam apresentar atividade antigenotóxica (CARIÑO-CORTÉS et al., 2007).

Muitas plantas são ricas em compostos fenólicos, que apresentam diversos efeitos biológicos, inclusive efeitos antioxidantes. Estes compostos têm sido amplamente estudados e efeitos como a prevenção de doenças coronarianas e cânceres têm sido relatados (LÖLIGER, 1991).

Em uma revisão da literatura realizada por MANTLE et al. (2001), diversos efeitos promovidos pelas plantas em desordens cutâneas foram descritas. Dentre elas, podem ser citadas: cicatrização de feridas e tratamentos de queimaduras, principalmente com o uso de *Aloe vera*; atividade antifúngica, antiviral, bactericida e acaricida em infecções cutâneas como acne, herpes e escabiose, principalmente com o uso do óleo de *Melaleuca alternifolia*; atividade anti-inflamatória e auxílio em alterações imunológicas que afetam a pele, como na psoríase, entre outras.

É claro que esta pequena revisão da literatura não teve a intenção de esgotar este assunto mas, sim, de mostrar o grande potencial benéfico que derivados vegetais podem apresentar para a saúde humana.

2.3. Os efeitos benéficos do uso de plantas para a Cosmetologia

Diversos foram os efeitos benéficos dos extratos vegetais descritos anteriormente, entretanto, a Cosmetologia é outra Ciência que tem encontrado nos extratos vegetais uma fonte inesgotável de atividades biológicas de interesse.

Neste sentido, os flavonoides podem ser citados. São metabólitos secundários encontrados em muitos vegetais e que podem apresentar efeitos cosméticos diversos. ARCT e PYTKOWSKA (2008) indicam o uso cosmecêutico dos flavonoides para atuação nos vasos sanguíneos, prevenindo o surgimento de petéquias e telangiectasias causadas pela ruptura dos vasos, reduzindo a permeabilidade, protegendo-os e, ainda, prevenindo a agregação plaquetária. Também, não se podem ignorar os efeitos

antioxidante e anti-irritante, apresentados por estes metabólitos secundários, muito utilizados na área cosmética (ARCT e PYTKOWSKA, 2008).

LEE et al. (2009) descreveram o efeito antimetaloproteinase de matriz de plantas taiwanesas. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases capazes de promover a degradação da matriz extracelular da pele. O envelhecimento e a exposição a fatores ambientais, como a radiação solar, promovem o aumento na expressão destas enzimas. Sendo assim, a ação das MMPs está relacionada à perda de elasticidade, dilatação dos microcapilares da pele e ao surgimento de rugas, promovendo as características da pele envelhecida (LEE et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial inibidor da enzima tirosinase por extratos de plantas (LEE et al., 1997; CHEN et al., 2010). A inibição da enzima tirosinase promove o bloqueio da síntese de melanina sendo que, portanto, estes extratos podem ser empregados para a promoção da melhoria estética de peles acometidas por lentigos, melasmas, manchas hiperpigmentadas promovidas pelo acne, etc. CHEN et al. (2010) demonstraram os efeitos inibidores da tirosinase promovido pelo extrato obtido das sementes de *Sapindus mukorossi*. LEE et al. (1997) também pesquisaram diversas plantas em relação a esta atividade e espécies como *Chaenomeles speciosa*, *Dryopteris crassirhizoma*, *Gastrodia ellata*, *Glycyrrhiza glabra*, *Morus alba*, *Myristica fragrans*, *Rheum palmatum* e *Sophora japonica* foram capazes de promover a inibição da enzima chave no processo da melanogênese.

SHIMIZU et al. (2000) relataram que o extrato de *Boehmeria niponovivea* apresentou potente atividade inibidora da enzima 5 α -redutase, promovendo o crescimento de pelos em ratos. Esta enzima está envolvida na calvície androgenética e, de acordo com estes autores, os ácidos graxos presentes no extrato estudado, que são responsáveis pelo efeito observado, são: α -linolênico, linoleico, palmítico, elaídico, oleico e esteárico.

Tendo em vista o grande potencial cosmético apresentado pelos vegetais, o Brasil é um país privilegiado neste setor.

2.4. A biodiversidade brasileira

O Brasil apresenta a flora mais diversificada do mundo, com grande variedade de frutas e vegetais, dos quais muitos nunca foram estudados (SUFFUDINI et al., 2006; SCARANO, 2007).

Tendo em vista esta grande diversidade, a comunidade científica brasileira pode utilizar este recurso; porém, de maneira consciente, buscando benefícios à população e vislumbrando, neste setor, uma possibilidade de crescimento e desenvolvimento para o país.

Apesar de não ser nativa do Brasil, a goiaba (*Psidium guajava* L.), fruta estudada, é encontrada abundantemente no país.

2.5. A goiaba

Psidium guajava L., denominada popularmente de goiabeira, é uma espécie arbustiva a arbórea de pequeno porte, pertencente à família Myrtaceae e nativa da América tropical (DUARTE e PAULA, 2005). Produz um dos frutos tropicais e subtropicais de maior valor nutricional, a goiaba (LIMA et al., 2002). Possui açúcares, ferro, cálcio, fósforo e vitaminas A, B e C em concentrações superiores à maioria das frutas, sendo rica em fibras e carotenoides (LIMA et al., 2002; MONTEIRO, 2006; ESCOBAR e SYLOS, 2006; PADULA e RODRIGUEZ-AMAYA, 1986).

Segundo resultados obtidos por IHA et al. (2008), o extrato etanólico de *P. guajava* L. contém taninos e flavonoides e apresenta atividade antioxidante. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa (CHIARI et al., 2012b).

Compostos polifenólicos naturais, tais quais os flavonoides presentes na goiaba, são potentes antioxidantes devido à propriedade em sequestrar radicais livres, colaborando para a atividade quimioprotetora (ETCHEVERRY et al., 2008).

Além deste potencial, a goiaba foi também escolhida para este estudo por ser uma fruta de grande disponibilidade no território brasileiro e que poderia ser usada em grande escala (LIMA et al., 2002).

Na literatura científica são encontrados diversos trabalhos utilizando a goiaba buscando efeitos benéficos à saúde humana (LUTTERODT, 1989; LOZOYA et al.,

2002; QA'DAN et al., 2005; RAI et al., 2009). Entretanto, os trabalhos se baseiam nos extratos obtidos, principalmente, de suas folhas e não de sua fruta, como proposto no presente estudo. Além disso, diversas são as aplicações sugeridas para este extrato, mas a prevenção do envelhecimento cutâneo ainda não foi descrita.

2.6. O estudo de efeitos quimioprotetores na Cosmetologia

A quimioprevenção ainda é um assunto recente para a Cosmetologia. Este termo se refere à prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer cutâneo através do uso de substâncias capazes de inibir ou reverter os processos de fotoenvelhecimento e carcinogênese (ULIASZ e SPENCER, 2004).

Considerando que o uso de produtos cosméticos ou mesmo de cosmecêuticos representa uma arma valiosa na prevenção de diversas patologias, principalmente as relacionadas à pele, prevenir efeitos deletérios ao DNA celular, principalmente de linhagens como queratinócitos e fibroblastos, é uma forma de prevenir o surgimento dos cânceres cutâneos, patologia de incidência cada vez maior na população. O uso profilático destes produtos também é assunto recente, pois, de maneira geral, o consumidor recorre à aplicação de cosméticos após o surgimento das rugas e de outras marcas produzidas pelo envelhecimento (ULIASZ e SPENCER, 2004).

Estes produtos não devem ter o objetivo de substituir o uso de filtros solares mas, sim, de atuar de maneira sinérgica, oferecendo proteção antifotocarcinogênica adicional (BALIGA e KATIYAR, 2006).

A avaliação dos efeitos quimioprotetores pode ser realizada por metodologias *in vitro*, o que é uma vantagem no cenário atual, onde alternativas para a substituição dos modelos animais em testes de eficácia e segurança têm se tornado uma necessidade.

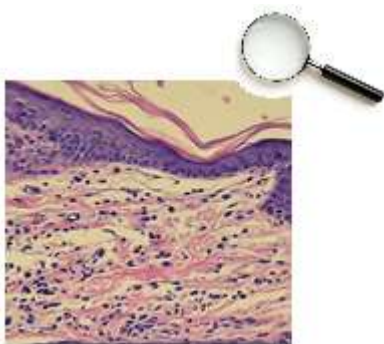
A diretiva da Comunidade Européia (93/95/EC) determinou que os produtos cosméticos produzidos e comercializados nos países membros não devem utilizar animais para a realização de ensaios toxicológicos (AUGUSTIN et al., 1996). Entretanto, apesar dos esforços da comunidade científica em reduzir e/ou substituir a utilização de animais de laboratório na experimentação biológica, diversos estudos ainda utilizam animais em ensaios pré-clínicos (MARONA, 2003).

No Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, os testes com animais para avaliação da eficácia e segurança de produtos cosméticos foram proibidos. No dia

23 de janeiro de 2014 foi aprovado o projeto de Lei nº 777 que proíbe o uso de animais para qualquer tipo de ensaio com produtos cosméticos (DOSP, 2014).

Como alternativa para a experimentação em animais, ensaios com cultivo celular têm sido propostos com o objetivo de prever o potencial tóxico de produtos químicos e formulações (VIRAVADYA et al., 2004; LIVNY et al., 2003; RABACHINI, 2007). Dessa forma, os experimentos em cultura de células permitem o estudo do comportamento celular em micro-ambiente controlado, utilizando células epiteliais humanas não-tumorais (BEDONI et al., 2007; HEISE et al., 2006). Cultura de células primárias (por exemplo, queratinócitos), explantes de pele, culturas de órgãos ou células organotípicas têm sido utilizados nos ensaios pré-clínicos de produtos naturais (BOTHAM et al., 1998; MEDINA et al., 2000; ABU-YOUSIF et al., 2008).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a avaliação da segurança de vários ativos cosméticos usando diferentes linhagens celulares (CHIARI et al., 2012a) na tentativa de contribuir para a Ciência Cosmética na busca incessante por metodologias alternativas ao uso de animais.



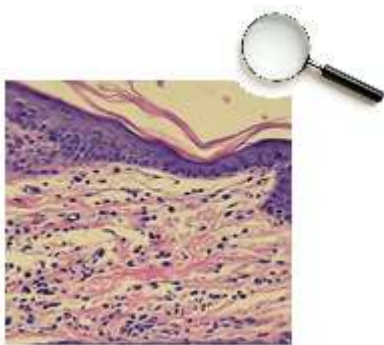
Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Um cosmético seguro e eficaz, produzido à base de uma fruta abundante no Brasil poderia representar uma alternativa à população de um produto de qualidade, com efeitos de prevenção de danos cutâneos e de melhoria das características da pele envelhecida cientificamente comprovados.

Estudos comprovam os efeitos benéficos que podem ser obtidos com o uso de extratos vegetais, mas, apesar disto e da grande diversidade vegetal à disposição da comunidade científica, ainda poucas espécies foram estudadas de maneira aprofundada com o intuito de validar seu uso terapêutico.

Neste sentido, a goiaba que é uma fruta utilizada no Brasil apenas para o consumo humano *in natura* e para a produção de alimentos industrializados, pode representar, com base em estudos descritos na literatura, uma fonte de benefícios à população, inclusive relacionados à prevenção de alterações cutâneas e do envelhecimento precoce devido ao seu potencial antioxidante. Poderia significar, ainda, aumento na renda de produtores devido ao maior valor agregado do produto, sustentabilidade e valorização da agricultura. Todos estes fatores impulsionaram a realização do presente estudo.



___ *Objetivos*

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos relacionados à eficácia e à segurança de um fitocosmético contendo extrato de goiaba (*Psidium guajava* L.).

4.2. Objetivos específicos

Avaliar a segurança do fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. por métodos:

A) *in vitro*:

- avaliação da citotoxicidade em células HepG2,
- avaliação da citotoxicidade em células HaCat,
- avaliação da citotoxicidade em células HDFa,
- avaliação da mutagenicidade gênica (Teste de Ames) e cromossômica (Ensaio do citoma),

B) *in vivo*:

- avaliação da irritação dérmica primária,
- avaliação da irritação dérmica cumulativa,
- avaliação da comedogenicidade,
- avaliação da irritação ocular primária
- análises histopatológicas de alterações teciduais promovidas pelo tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.

Avaliar a eficácia do fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. por métodos:

A) *in vitro*:

- avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase,
- avaliação do potencial fotoprotetor,
- avaliação do potencial quimioprotetor em células HepG2, HaCat e HDFa,
- avaliação da atividade antimutagênica,
- avaliação da atividade antioxidante em comparação com a enzima superóxido dismutase (SOD)

- avaliação do potencial em estimular a síntese de colágeno,

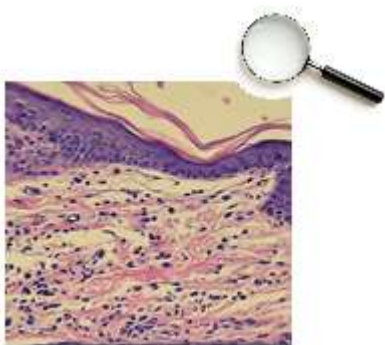
B) *in vivo*:

- por meio de análises histopatológicas de biópsias tratadas com o fitocosmético e com peróxido de hidrogênio.

Avaliar de respostas celulares frente ao tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.:

- por meio da análise da produção da citocina TGF- β 1 em células HepG2 e HaCat,

- por meio da análise do perfil de despolarização de membrana mitocondrial, indicativo de apoptose, em células HepG2, HaCat e HDFa.



Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Preparo do material vegetal

As goiabas da variedade Paluma foram cedidas pela Indústria de Alimentos Predilecta, de São Lourenço do Turvo – SP. A exsicata de *Psidium guajava* L. foi identificada e depositada na coleção “Herbário - Algas, Briófitas, Pteridófitas e Angiospermas” da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP recebendo a identificação: *Psidium guajava* SJRP 31237.

No mesmo dia em que foram colhidas, as frutas foram lavadas em água corrente, submersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% durante 2 horas para desinfecção e, posteriormente, lavadas com água destilada e secas. Após 24 horas, foram fatiadas e submetidas à temperatura de 60 ± 2 °C em estufa de ar circulante, até que o peso se mantivesse estável.

O material seco foi triturado em moinho de facas. O pó resultante foi classificado em tamises com abertura de malha de 0,59 mm, para assegurar que todo o material vegetal apresentasse esta granulometria máxima, sendo considerado um pó moderadamente grosso (Figura 1) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O material foi acondicionado em embalagens de vidro, vedadas com plástico e estocadas a -5 ± 2 °C.



Figura 1. Etapas de preparação do material vegetal (CHIARI, 2011).

5.2. Preparo do extrato vegetal

A extração foi efetuada através do método de percolação (SIMÕES et al., 2007).

Para extração com 50 gramas de fruta seca e pulverizada, foram utilizados 1500 mL de etanol 70 °GL, em fluxo contínuo sob a amostra durante 96 horas. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e ao abrigo da luz (Figura 2).



Figura 2. Imagem do processo extrativo.

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e estocados a 5 ± 2 °C.

Para a redução do volume, os extratos foram submetidos a evaporador rotativo (MA-120, Marconi), à temperatura máxima de 60° C e, em seguida, foram liofilizados (Modulyo D Freeze Dryer, Thermo Scientific).

Após liofilização, foram mantidos em frascos de vidro âmbar a 5 ± 2 ° C (CHIARI et al., 2012b).

5.3. Preparo da formulação

A formulação contendo o extrato de *Psidium guajava* L., denominada fitocosmético, foi preparada sendo pesadas, separadamente, a fase aquosa e a fase oleosa, com exceção do extrato de *Psidium guajava* L (Tabela 1). Em seguida, estas fases da emulsão foram submetidas a aquecimento em banho-Maria a 75 ± 2 ° C. Ao atingirem esta temperatura, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa e o sistema foi mantido sob agitação até o resfriamento. Neste momento, o valor de pH da formulação foi ajustado para $6,5 \pm 0,5$.

Separadamente, o extrato foi solubilizado em parte da água utilizada na manipulação da formulação e, também, neutralizado ($6,5 \pm 0,5$), uma vez que apresenta pH em torno de 4,0. A solução do extrato foi, então, incorporada à formulação.

Tabela 1. Composição percentual do fitocosmético (CHIARI, 2011).

Matéria prima	INCI name*	Função	Composição percentual (m/m)
Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE	Cetareth - 20	tensoativo não-iônico	1,00
Álcool cetílico	Cetyl alcohol	agente de consistência	4,00
Monoestearato de glicerila	Glyceryl stearate	agente de consistência	1,40
Adipato de diisopropila	Diisopropyl adipate	Emoliente	1,30
Estearato de octila	Ethylhexyl stearate	Emoliente	0,80
Óleo mineral	Mineral oil	Emoliente	1,00
BHT	BHT	Antioxidante	0,02
Metilparabeno	Methylparaben	conservante microbiano	0,20
Propilparabeno	Propylparaben	conservante microbiano	0,18
EDTA dissódico	Dissodium EDTA	Sequestrante	0,02
Propilenoglicol	Propylene Glycol	umectante e solubilizante	3,00
Carbopol® 940 (Dispersão a 2%)	Carbomer	espessante hidrofílico	7,00
Água deionizada	Aqua		q.s.p. 100,00
Trietanolamina q.s.p.	Trietanolamine	Neutralizante	q.s. pH 6,00
Extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	<i>Psidium guajava</i> L. extract	ativo cosmético	5,00

* *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

Durante este trabalho, em alguns momentos, foi importante avaliar se os efeitos estudados não eram promovidos pela própria formulação (excipiente) e não pelo extrato de *Psidium guajava* L. Por este motivo, o creme base, caracterizado pela formulação descrita acima, sem a adição do extrato, também foi preparado.

Neste trabalho, os efeitos promovidos pelo extrato de *Psidium guajava* L. e da formulação que o contém foram avaliados por meio de diversas metodologias. Para tornar clara a apresentação deste estudo, as metodologias foram divididas em estudos de segurança e eficácia, além da avaliação das respostas celulares promovidas pelo extrato. Foram denominados estudos de segurança quando o resultado observado foi capaz de informar o quanto seguro é este extrato e o cosmético obtido pela sua adição e, estudos de eficácia, quando o resultado observado poderia significar efeitos benéficos promovidos pelo extrato.

5.4. Estudos de segurança

5.4.1. Estudos de segurança *in vitro*

5.4.1.1. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da promoção de toxicidade celular pelo extrato de *Psidium guajava* L. foi avaliada em três diferentes linhagens celulares: HepG2, HaCat e HDFa.

As células HepG2 são células de hepatoma humano, metabolicamente ativas, amplamente empregadas em diferentes estudos, por serem capazes de simular a função hepática de um organismo *in vitro*. Foram escolhidas para este estudo pois pesquisas recentes demonstraram que o fígado é um alvo frequente de produtos cosméticos quando atingem a corrente sanguínea (VINKEN et al., 2012) e, desta forma, são um modelo importante para avaliar a segurança de produtos cosméticos (CHIARI et al., 2012a).

As células HaCat são uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados, que mantém a capacidade de diferenciação epidérmica (BOUKAMP et al., 1988). Os queratinócitos são muito empregados para o estudo de produtos cosméticos, uma vez que representam um tipo celular que está em abundância na camada mais externa da

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

pele, a epiderme, e que, portanto, é mantida em contato com substâncias ativas capazes de permear o estrato córneo (SHELLEY e ARTHUR, 1958).

Os fibroblastos (*Human Dermal Fibroblasts* - HDFa) foram empregados pois são o tipo celular mais abundante na derme humana e, sabendo-se que o extrato contido na formulação cosmética é capaz de penetrar até esta camada da pele, é importante conhecer quais os resultados do contato entre esta linhagem celular e o extrato de *Psidium guajava* L. (CHIARI, 2011).

Foi utilizado o método do MTT, que tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), formando cristais insolúveis de formazana, de coloração violeta (MOSMANN, 1983).

Para isto, as diferentes linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura *Minimum Essential Media* (MEM), no caso da HaCat e HepG2, e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), no caso da HDFa, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a $37\pm 2^{\circ}$ C em atmosfera de 5% de CO₂. As células com confluência de 80 a 90% após a 3ª passagem foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos e, então, semeadas em placas de 96 poços. Para a neutralização da tripsina, foi utilizado o meio de cultura com soro fetal bovino. A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade (MTT) foi de 1×10^6 células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para adesão completa das células às placas de 96 poços.

Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (dimetilsulfóxido a 10%), controle negativo (meio de cultura sem soro fetal bovino) e diferentes concentrações do extrato (solubilizado em meio sem soro, neutralizado ou não neutralizado), durante 24 horas.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (BRUGGISSER et al., 2002) e 100 µL de MTT (1 mg/mL em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a $37\pm 2^{\circ}$ C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violeta de formazana (3 a 5 horas). Este procedimento pode ser visualizado no esquema da Figura 3.

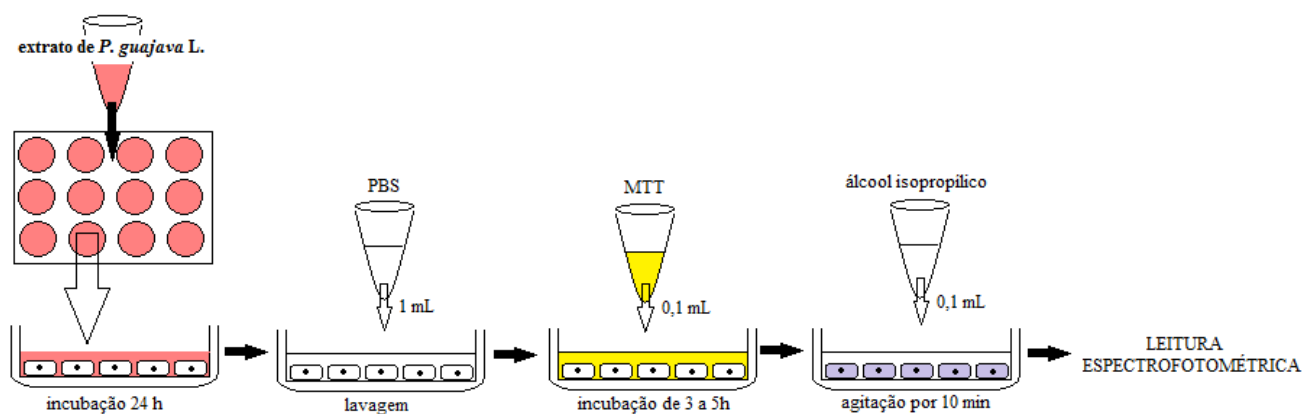


Figura 3. Procedimento para avaliação da citotoxicidade do extrato de *P. guajava* (CHIARI, 2011).

Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μ L de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 595 nm, foi realizada, em leitor de placas.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al. (2004) e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas. Para as diferentes linhagens foi calculado o IC₅₀. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

5.4.1.2. Avaliação do potencial mutagênico

5.4.1.2.1. Em cepas de *Salmonella typhimurium*

Este ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Mutagenicidade do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

Foram avaliados os efeitos mutagênicos do extrato de *Psidium guajava* L. nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, primariamente recomendadas para testes padrões de mutagenicidade. São utilizadas quatro cepas diferentes, pois cada uma delas sofreu um tipo diferente de mutação no *operon* de

histidina, oferecendo resultados mais completos ao pesquisador (MARON e AMES, 1983).

O ensaio foi realizado como descrito por MARON e AMES (1983), utilizando apenas o extrato de *Psidium guajava* L. como tratamento e, também, utilizando o sistema de ativação metabólica S9. A utilização do sistema de ativação metabólica S9, um homogenato de fígado de ratos é conveniente pois muitas substâncias só são capazes de se ligar covalentemente ao DNA celular, causando uma mutação, após ativação metabólica (HAKURA et al., 1999).

Inicialmente, o inóculo de cada uma das cepas utilizadas foi preparado. Para isto, com uma alça de inoculação, 10 mL do caldo nutriente Oxoid nº 2 foram semeados a partir de culturas estoques de cada uma das quatro cepas mantidas em freezer -80° C. Em seguida, os inóculos foram incubados em *shaker* a 37° C por 14 horas e 160 rpm.

Após este período, soluções do extrato de *Psidium guajava* L. foram preparadas. O extrato foi avaliado no teste de Ames em cinco diferentes concentrações, sendo que a concentração máxima foi correspondente à máxima concentração do extrato solúvel em água (1,253 g/mL). Esta concentração inicial do extrato foi reduzida apenas quando foi verificada toxicidade do extrato às cepas de bactérias, o que foi avaliado previamente à realização dos estudos de mutagenicidade propriamente ditos.

Além do tratamento com extrato, foram preparadas placas de controle negativo, utilizando água destilada estéril, ou seja, o veículo; controle de revertência espontânea, para verificação da taxa de revertência das bactérias e placas de controle positivo, contendo mutágeno, como mostrado no Quadro 1, para verificação da reversão da dependência à histidina.

Quadro 1. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo (MARON e AMES, 1983).

Cepas	Sem fração S9		Com fração S9	
	Mutágeno	Concentração (mg/mL)	Mutágeno	Concentração (mg/mL)
TA 97a	Nitrofenildiamino	0,2	2-antramina	0,03
TA 98	Nitrofenildiamino	0,2	2-antramina	0,03
TA 100	Azida sódica	0,5	2-antramina	0,03
TA 102	Mitomicina-C	0,01	Aminofluoreno	0,2

Estes tratamentos foram realizados em placas de Petri contendo ágar mínimo glicosado, previamente solidificado; porém, as bactérias foram submetidas à pre-incubação, antes de serem semeadas sobre as placas. Os tratamentos utilizados foram preparados em tubos de ensaio estéreis e estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Esquemas dos tratamentos do ensaio de mutagenicidade submetidos à pré-incubação

TA 97a	CP		CN		CRE	T1
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	50 µL de mutágeno	200 µL de água destilada	-	3,19 mg de extrato	
TA 98	T2		T3		T4	T5
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	6,38 mg de extrato	12,76 mg de extrato	25,52 mg de extrato	51,04 mg de extrato	
TA 100	CP		CN		CRE	T1
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	50 µL de mutágeno	200 µL de água destilada	-	15,66 mg de extrato	
TA 102	T2		T3		T4	T5
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	31,325 mg de extrato	62,65 mg de extrato	125,3 mg de extrato	250,6 mg de extrato	
TA 102	CP		CN		CRE	T1
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	50 µL de mutágeno	200 µL de água destilada	-	3,19 mg de extrato	
TA 102	T2		T3		T4	T5
	Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
	Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Tratamento	6,38 mg de extrato	12,76 mg de extrato	25,52 mg de extrato	51,04 mg de extrato	

CP: Controle positivo

CN: Controle negativo

CRE: Controle de revertência espontânea

T: tratamento

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

Após pré-incubação, por 20 minutos, a $37\pm 2^\circ\text{C}$, a cada tubo de ensaio foram adicionados 2 mL de top ágar (suplementado com traços de histidina e biotina), com rápida agitação em vórtex e o conteúdo vertido sobre as placas de ágar mínimo glicosado.

Quando o top ágar solidificou, as placas foram incubadas invertidas, por 48 horas, a $37\pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida, o número de colônias revertentes foi quantificado manualmente, com auxílio de contador de colônias.

Um esquema simplificado do teste de Ames pode ser observado na Figura 4.

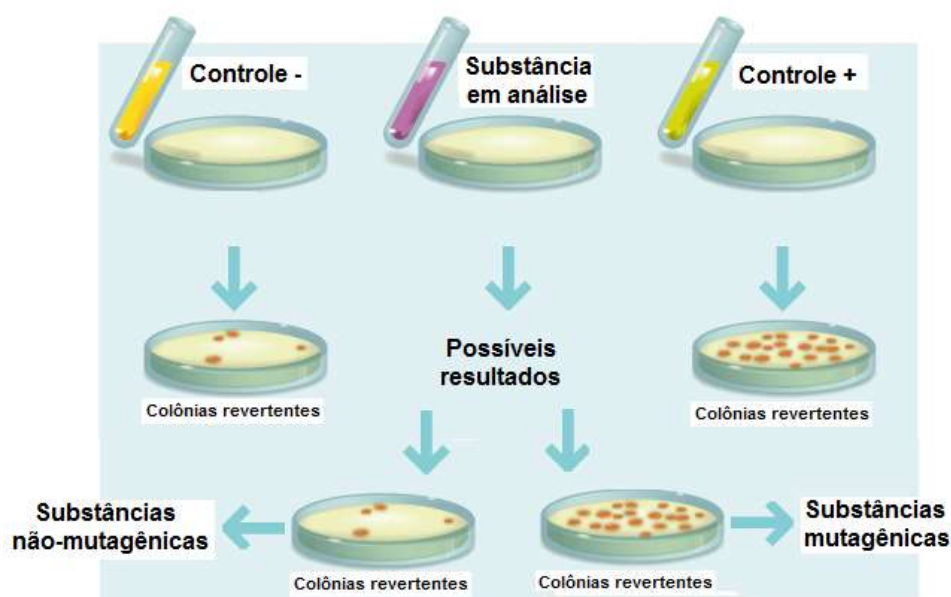


Figura 4. Esquema simplificado do teste de Ames (Modificado de: <http://www.prc.cnrs-gif.fr/spip.php?rubrique98&lang=fr>).

Como foi dito anteriormente, este ensaio também foi realizado utilizando a fração microssomal S9. Neste caso, no lugar dos 500 μL de tampão fosfato adicionados ao tubo de ensaio para o preparo dos tratamentos, foram adicionados 500 μL de solução da fração S9.

A solução da fração microssomal S9 (sistema de ativação metabólica) foi preparada em banho de gelo e apresenta a composição: 4% de fração S9, 1% de cloreto de magnésio (0,4 M), 1% de cloreto de potássio (1,65 M), 0,5% de glicose-6-fosfato (1 M), 4% de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (0,1 M), 50% de tampão

fosfato pH 7,4 (0,2 M) e 39,5% de água destilada estéril. Esta solução foi preparada extemporaneamente.

5.4.1.2.2. Em células humanas HepG2

A avaliação do potencial mutagênico do extrato de *Psidium guajava* L. foi realizada por meio do Ensaio do Citoma (*Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*) descrito por FENECH, em 2007.

Foram utilizadas células HepG2 ($5,0 \times 10^5$ células), mantidas em garrafas de cultivo por 24 horas (5% de CO₂ a $37 \pm 2^\circ$ C). Após este período, o meio de cultura contido nas garrafas foi removido e as células receberam os seguintes tratamentos, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos para as células HepG2 utilizados no ensaio do citoma

CN	CP	T1	T2	T3
5 mL de meio de cultura completo	5 mL de cloridrato de doxorrubicina a 0,03 µg/mL em meio de cultura completo	5 mL de solução de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. a 5,0 mg/mL em meio de cultura completo	5 mL de solução de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. a 7,5 mg/mL em meio de cultura completo	5 mL de solução de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. a 15 mg/mL em meio de cultura completo

CN: Controle negativo

CP: Controle positivo

T: tratamento

Meio de cultura completo: contendo 10% de soro fetal bovino.

Os tratamentos foram mantidos por mais 20 horas e, durante este período, as células em cultura foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a $37 \pm 2^\circ$ C.

Em seguida, o tratamento foi removido das garrafas de cultura e foi realizado um procedimento de lavagem utilizando 5 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) a $37 \pm 2^\circ$ C. Depois, em todas as culturas celulares foram adicionados 5 mL de meio de cultura completo e 50 µL de solução de citocalasina B, para que a concentração final, no meio de cultura, fosse de 3 µg/mL de citocalasina B.

A seguir, as culturas foram incubadas por mais 28 horas e, após este período de tratamento, os procedimentos seguintes foram realizados em ambiente não estéril.

O meio de cultura contido nas garrafas de cultura foi removido e acondicionado em tubos de centrifuga devidamente identificados. Cada garrafa de cultura foi lavada

por duas vezes com PBS, sendo o resíduo da primeira lavagem dispensado no tubo de centrífuga e o da segunda lavagem descartado.

As células foram removidas das garrafas de cultura com o uso de 0,5 mL de tripsina a 0,1%, após incubação por 5 minutos a $37\pm 2^\circ\text{C}$ e adicionadas ao respectivo tubo de centrífuga.

As suspensões celulares obtidas nos tubos de centrífuga foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo apenas 0,5 mL para realizar a agitação e promover a desagregação do precipitado de células. A cada tubo, foram adicionadas 5 mL de solução de citrato de sódio (0,01%) a $5\pm 2^\circ\text{C}$ e a suspensão celular foi homogeneizada com o auxílio de pipeta Pasteur por 5 minutos. Posteriormente, a cada tubo de centrífuga foram adicionados 20 μL de formol.

Novamente, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, restando apenas 0,5 mL no tubo para permitir a desagregação do precipitado. Em seguida, 5 mL da solução fixadora composta por metanol: ácido acético (3:1) foram adicionados e a suspensão celular foi homogeneizada. Foi realizada centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido.

Então, o sobrenadante foi novamente descartado; porém, 0,5 mL foram preservados. A suspensão celular foi homogeneizada e, em seguida, foi realizada a confecção das lâminas.

Para cada tubo de centrífuga, referente a uma garrafa de cultura que recebeu tratamento, foram confeccionadas três lâminas. As lâminas de microscopia foram previamente lavadas e mantidas em água destilada a temperatura de $5\pm 2^\circ\text{C}$. No momento do uso, um filme d'água foi mantido sobre as lâminas e rapidamente foram adicionados 50 μL da suspensão celular.

As lâminas foram armazenadas a temperatura ambiente até secagem.

No momento da leitura, as lâminas foram coradas com 2 mL de solução de acridina laranja a 40 $\mu\text{g/mL}$ por 2 minutos, seguidas de lavagem em água corrente. Sobre as lâminas coradas foram dispostas lamínulas de microscopia e a análise foi realizada em microscópio de fluorescência.

Para cada tratamento foram analisadas 500 células, determinando a frequência de células mononucleadas, binucleadas e trinucleadas. Além disso, foram visualizadas 1000 células binucleadas, sendo determinada a frequência de micronúcleos, pontes

Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares, segundo FENECH (2007), conforme mostrado na Figura 5.

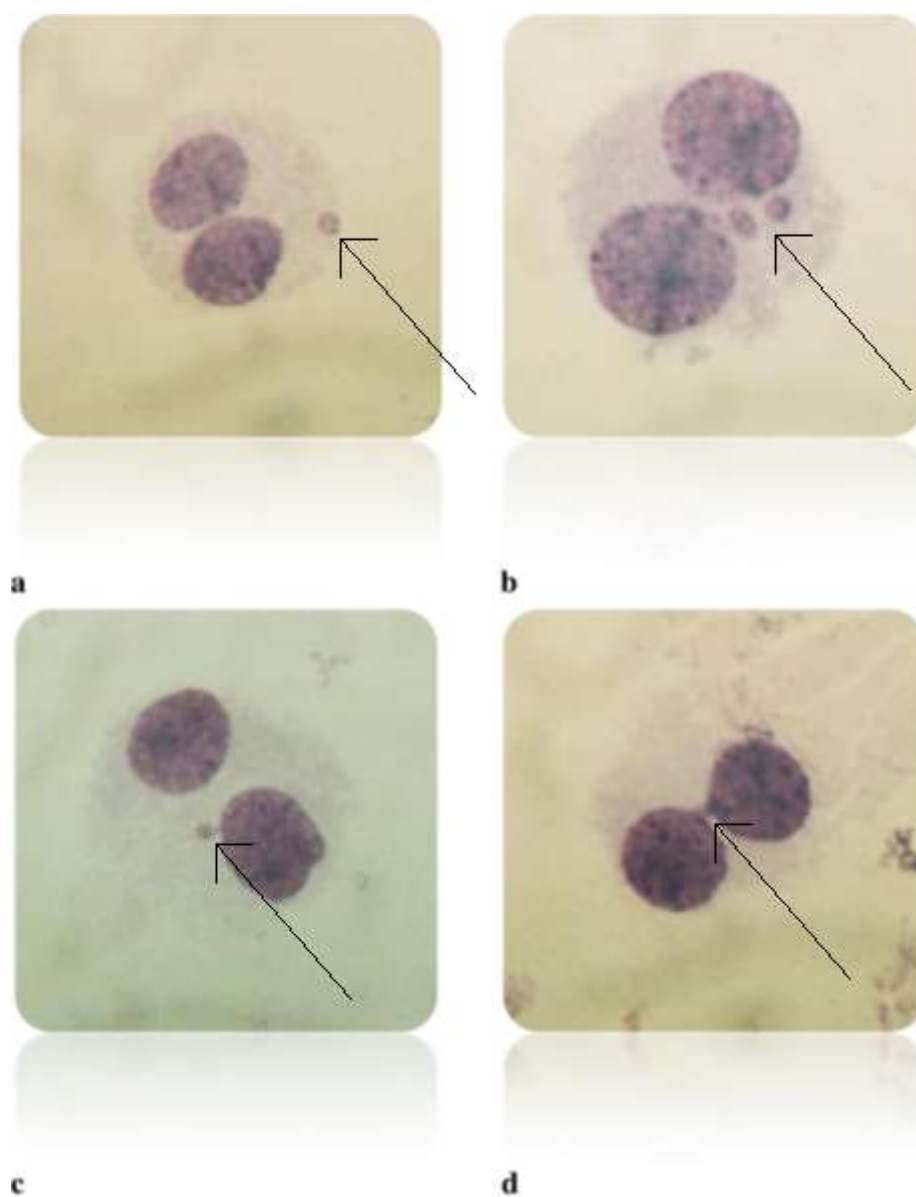


Figura 5. Fotomicrografias de células binucleadas apresentando 1 micronúcleo (a), 2 micronúcleos (b), brotamentos nucleares (c) e pontes nucleoplasmáticas (d) (Modificado de: NEFIC e HANDZIC, 2013).

Na Figura 5, as estruturas estão apresentadas através da coloração de Giemsa. Na coloração com acridina laranja, utilizada neste estudo, a visualização ocorre através de fluorescência, como mostrado na Figura 6.

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

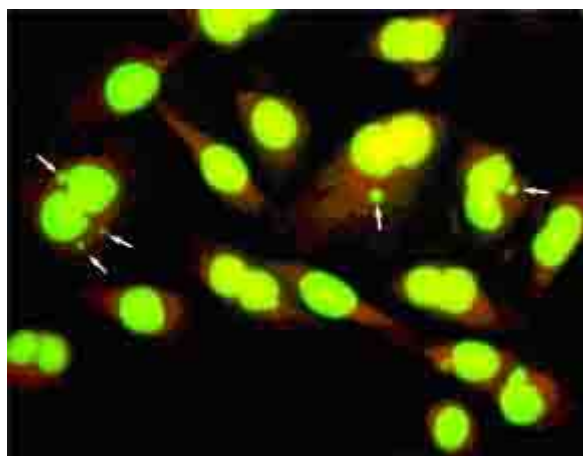


Figura 6. Visualização de micronúcleos através da coloração acridina laranja (Fonte: <http://www.hdbiosciences.com/invt.html>).

5.4.1.2.3. Em células humanas HaCat

O mesmo procedimento descrito por FENECH, em 2007, foi repetido para a avaliação do potencial mutagênico do extrato de *Psidium guajava* L. em células HaCat, queratinócitos humanos imortalizados.

5.4.2. Estudos de segurança *in vivo*

Este estudo, aprovado com parecer nº 17/2012 do Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (ANEXO I), foi realizado em 6 coelhos machos, albinos, da linhagem Grupo genético Botucatu (Norfolk), com aproximadamente 90 dias e peso entre 2 a 3 kg.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP. Para a alimentação, foi oferecida água potável e ração *ad libitum*.

5.4.2.1 Avaliação da irritação dérmica primária

O ensaio foi realizado conforme preconizado pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2003; ANVISA, 2012).

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

Um dia antes das análises, foi realizada a tricotomia do dorso dos animais, de maneira cuidadosa, para a manutenção da pele íntegra.

O tratamento consistiu da aplicação única, de 1 grama do produto, testado no dorso de coelhos, em uma área de 6 cm² de pele e coberta com uma gaze afixada com fita adesiva não-irritante. Este *patch* oclusivo foi mantido por 4 horas e, após esse período, o produto foi retirado com água destilada. Após 24 e 72 horas da aplicação, foi realizada a graduação das lesões (eritema e edema), seguindo a escala de Draize.

De acordo com esta escala, para a avaliação de eritema é utilizada a seguinte graduação:

- Grau 1: eritema muito leve;
- Grau 2: eritema bem definido;
- Grau 3: eritema de moderado a severo;
- Grau 4: eritema severo com ligeira formação de escara (DRAIZE et al., 1944).

Para a avaliação de edema é utilizada a graduação:

- Grau 1: edema muito leve;
- Grau 2: edema leve (borda da área bem definida por elevação definitiva);
- Grau 3: edema moderado (área elevada aproximadamente 1 mm);
- Grau 4: edema severo (elevação maior que 1 mm e extensão além da área de exposição).

As análises foram realizadas por dois pesquisadores diferentes, de maneira independente, para que, posteriormente, fosse calculada a média e o desvio padrão dos escores dos pesquisadores, segundo BRIET et al. (2009).

Cada animal foi utilizado como grupo tratado, controle e branco; ou seja, o dorso dos animais foi dividido em partes: sem tratamento, o branco; emulsão sem extrato, o controle e emulsão com extrato (tratamento com o fitocosmético). Também foi realizado o tratamento com a emulsão contendo 5% de peróxido de hidrogênio (tratamento indutor de danos) e tratamento alternado entre a emulsão contendo 5% de peróxido de hidrogênio e o fitocosmético (Figura 7).

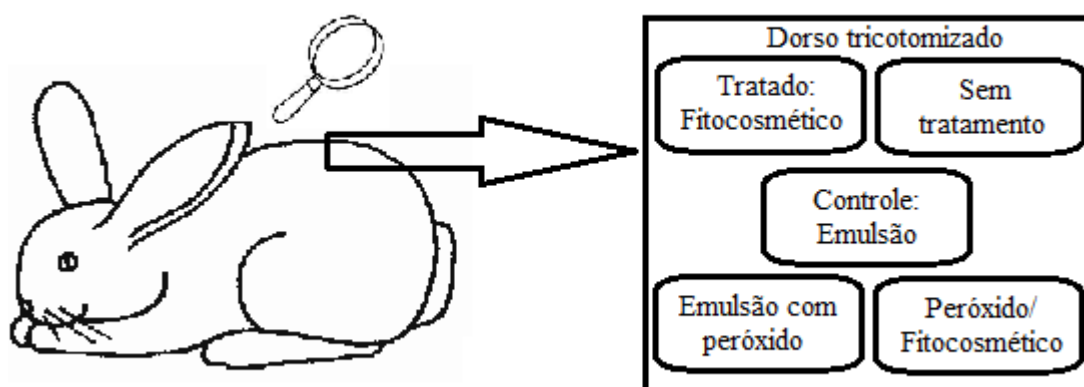


Figura 7. Esquema de tratamento dos animais para avaliação da irritação dérmica (Figura do autor).

O acesso do animal à gaze e à ingestão do tratamento foi evitado, uma vez que o *patch* foi colocado no dorso superior do animal e foram utilizados colares Elizabetanos.

5.4.2.2. Avaliação da irritação dérmica cumulativa

Os animais foram tratados da mesma maneira como descrito para a avaliação da irritação dérmica primária; entretanto, a aplicação do tratamento foi realizada durante 14 dias consecutivos, sendo realizadas observações durante e após as aplicações, para verificação de possível formação de edema e eritema nos locais da aplicação.

5.4.2.3. Avaliação do potencial comedogênico

A metodologia foi realizada de acordo com o ensaio preconizado pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2003; ANVISA, 2012).

Foram efetuadas 15 aplicações (três semanas com cinco aplicações cada) de 1,0 g do fitocosmético na parte interna da orelha. Em três coelhos, na orelha direita foi aplicado o fitocosmético e a orelha esquerda foi utilizada como controle (Figura 8). Em outros três coelhos, na orelha direita foi aplicada a emulsão sem extrato (creme base) e a orelha esquerda foi utilizada como controle, como sugerido por MORRIS e KWAN

(1983). Foram realizadas leituras diárias e 24 horas após a última aplicação, sendo avaliada a formação de eritema, edema e presença ou ausência de comedões.

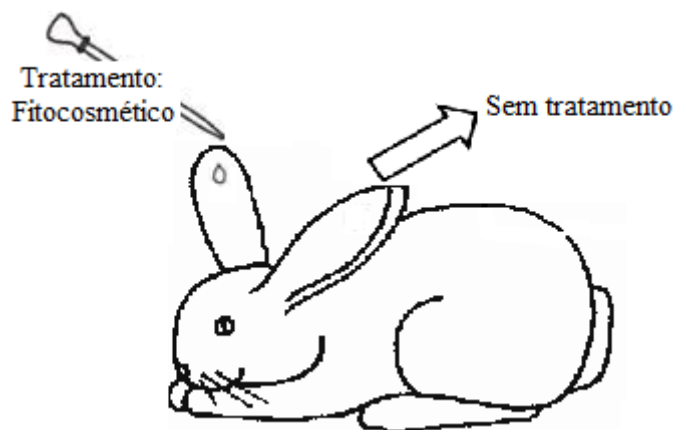


Figura 8. Esquema de tratamento dos animais para avaliação da comedogenicidade (Figura do autor).

Os resultados foram descritos como uma escala de 0 a 5. Grau 0 significa que não houve aumento na queratose folicular; graus 1 a 2, significam o aumento visível de queratose (hiperqueratose); graus 3 a 4, significam o desenvolvimento de comedões e grau 5, significa a presença de comedões severos, conforme preconizado por FULTON et al. (1984).

5.4.2.4. Avaliação da irritação ocular primária

A metodologia foi realizada de acordo com o ensaio preconizado pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2003; ANVISA, 2012).

Foi realizada uma aplicação única do produto, no saco conjuntival de coelhos, de 100 mg da amostra. A evolução das possíveis lesões foi observada em 24, 48, 72 horas e 7 dias após a instilação. Foram graduadas as alterações de conjuntiva (secreção, hiperemia e quemose), íris (irite) e córnea (densidade e área de opacidade) de acordo com a escala de DRAIZE et al. (1944).

Em 3 animais, foi aplicado o fitocosmético no olho direito e o olho esquerdo foi mantido sem tratamento (controle). Em outros três animais foi aplicada a emulsão sem

extrato (creme base) no olho direito e o olho esquerdo foi mantido sem tratamento (controle), conforme preconizado por SUGAI et al. (1990).

5.4.2.5. Análises histopatológicas

Para as análises histopatológicas, foram obtidas biópsias das áreas tratadas através de procedimento cirúrgico realizado pela veterinária Jaqueline Ferreira Santos, cujo protocolo foi aprovado pelo CEUA (ANEXO I). Durante o procedimento, os animais foram anestesiados com Zoletil® 50 e, antes e após o procedimento, receberam Shotapen® L.A. para prevenção de infecções.

As biópsias foram acondicionadas em pequenos envelopes de papel manteiga, colocadas dentro de cassetes histológicos e mantidas em paraformaldeído por 24 horas, como mostrado na Figura 9.



Figura 9. Biópsia da pele dos animais sendo envolta em papel manteiga (à esquerda) e acondicionada em cassetes histológicos identificados (à direita).

Em seguida, os cassetes contendo as biópsias foram lavados em água corrente por 5 horas e imersos em etanol 70 °GL, até o processamento. Antes do processamento, as folhas de papel manteiga que envolviam as biópsias foram removidas e o excesso de pelos sobre o tecido foi cuidadosamente removido para não lesar a pele, com o auxílio de uma lâmina.

Durante o processamento, o material foi submetido à diafanização (Figura 10), sendo submerso em diferentes solventes, de acordo com o Quadro 3.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

Quadro 3. Procedimento de diafanização

Etapa	Solvente para imersão	Tempo de imersão
1	etanol 90 °GL	30 minutos
2	etanol absoluto	30 minutos
3	etanol absoluto	30 minutos
4	etanol absoluto	30 minutos
5	etanol absoluto	30 minutos
6	etanol absoluto	30 minutos
7	etanol absoluto	30 minutos
8	etanol:xilol (1:1)	30 minutos
9	xilol	30 minutos
10	xilol	30 minutos

**Figura 10.** Bateria de diafanização dos cortes histológicos.

Após a diafanização, os cassetes foram secos em papel absorvente e conservados em parafina a 62° C *overnight*.

Finalmente, o material foi submetido à inclusão em parafina.

Os cassetes foram transferidos para a região com parafina a 62±2° C da inclusora (Histo Embedder-Leica). Nos moldes para os blocos de histologia, foi adicionada uma pequena porção de parafina. Em seguida, as biópsias foram posicionadas de maneira a possibilitar, posteriormente, a obtenção de cortes transversais e o volume do molde foi preenchido com parafina. Uma lateral dos cassetes histológicos foi utilizada como “fechamento” do bloco, para identificar a biópsia.

Após total solidificação da parafina, os blocos foram removidos dos moldes.

Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

Para a preparação das lâminas histológicas, foram realizados cortes semi-seriados de 5 μm de espessura. De cada biópsia foram obtidas 10 lâminas, contendo 4 cortes cada, como mostrado na Figura 11, sendo 5 lâminas obtidas logo após o desgaste do bloco e mais 5 lâminas após descartar 100 μm do tecido. Os cortes foram preparados em micrótomo American Optical.

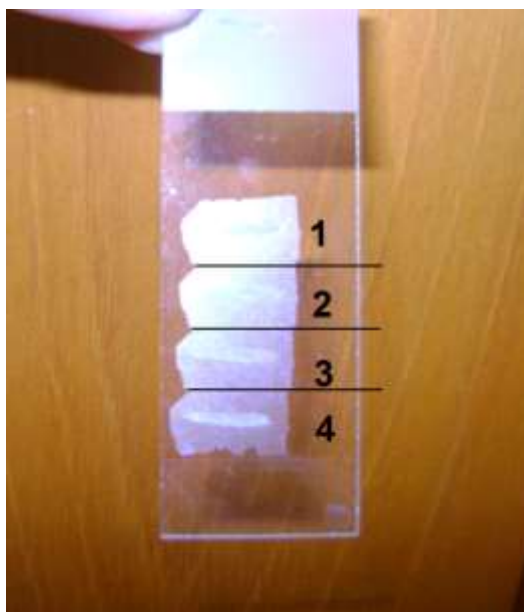


Figura 11. Preparação das lâminas, com quatro cortes histológicos.

Os cortes obtidos foram submersos em solução de etanol a 10%, em temperatura ambiente, aproximadamente 24 ± 2 °C e, em seguida, já dispostos nas lâminas, foram transferidos para um banho de água a 45 ± 2 ° C, para a adesão dos cortes à lâmina.

Os cortes histológicos foram corados com eematoxilina-eosina e, em seguida, uma lamínula foi colocada sobre os cortes e fixada com o uso de Permount.

As etapas de coloração das lâminas estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4. Etapas de coloração das lâminas com hematoxilina-eosina

Etapa	Solvente para imersão	Tempo de imersão
1	Xilol	3 a 5 minutos
2	Xilol	3 a 5 minutos
3	Etanol/Xilol	3 a 5 minutos
4	Etanol Absoluto	3 a 5 minutos
5	Etanol 90 °GL	3 a 5 minutos
6	Etanol 70 °GL	3 a 5 minutos
7	Água destilada	3 a 5 minutos
8	Hematoxilina	1 minuto e 30 segundos
9	Água corrente	5 a 7 minutos
10	Eosina	10 segundos
11	Água corrente	3 segundos
12	Etanol 95 °GL	4 minutos
13	Etanol Absoluto	4 minutos
14	Etanol Absoluto	4 minutos
15	Etanol /Xilol	3 a 5 minutos
16	Xilol	3 a 5 minutos
17	Xilol	3 a 5 minutos

Os cortes histológicos foram avaliados em microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera CAMEDIA C-5060 para a captura das imagens.

Foram confeccionadas duas lâminas por animal, sendo que as fotomicrografias foram capturadas em aumento de 200 vezes, em três regiões de dois dos quatro cortes histológicos presentes em cada lâmina, totalizando a análise de 12 fotomicrografias por animal, como mostra a Figura 12.

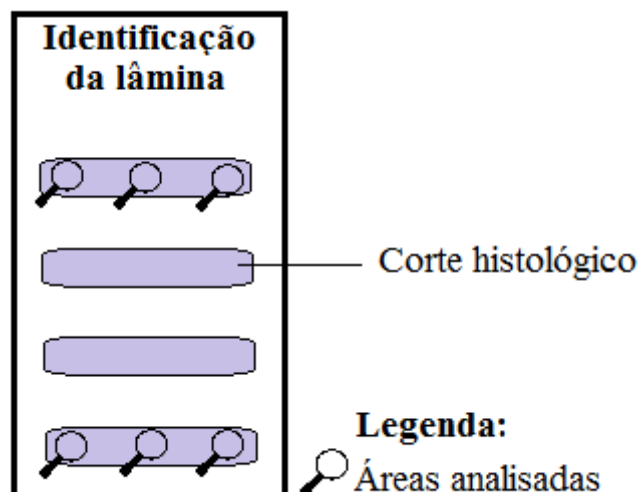


Figura 12. Representação das áreas analisadas em cada lâmina histológica obtida após a captura das imagens (Figura do autor).

A análise quantitativa das fotomicrografias (estereometria) foi realizada com o auxílio do software ImageJ, posicionando sobre as mesmas uma régua quadriculada de 100 pontos de intersecção, como mostrado na Figura 13, logo abaixo da epiderme. Estruturas como células inflamatórias, fibroblastos (identificados como células fusiformes ou estreladas, de núcleo ovóide ou alongado), fibras colágenas e espaços vazios, foram quantificadas nos pontos de intersecção da régua, coincidentes sobre as estruturas histológicas.

Também foram quantificadas estruturas que não interessavam para esta contagem, como pontos de intersecção da régua que encontravam a epiderme, vasos sanguíneos, folículos pilosos e glândulas sebáceas. Estes pontos foram descontados da contagem para que não interferissem na porcentagem final das estruturas estudadas.

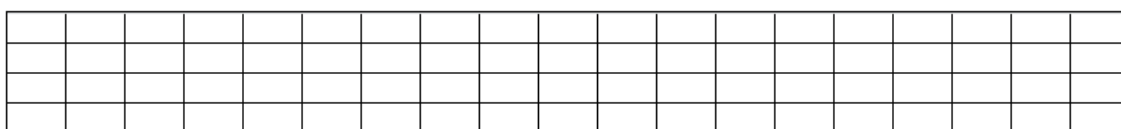


Figura 13. Régua quadriculada utilizada sobre as fotomicrografias para a quantificação das diferentes estruturas.

5.5. Estudos de eficácia

5.5.1. Estudos de eficácia *in vitro*

5.5.1.1. Avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase

A metodologia empregada foi previamente descrita por KHAZAELI et al., em 2009. É baseada em uma reação colorimétrica da dihidroxifenilalanina (DOPA) com a enzima tirosinase, promovendo a formação de dopaquinona, que pode ser quantificada a 492 nm.

Para a reação, foram utilizadas diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L. solubilizadas em tampão fosfato (pH 6,8), sendo obtido o volume final de 80 µL. À solução de extrato, foram adicionados 45 µL de DOPA (4,5 mM) e 25 µL de tirosinase (80 unidades/mL).

Após 4, 6, 8, 10, 12, 15 e 20 minutos de reação, a absorbância foi determinada a 492 nm, em leitor de placas.

Além de determinar a absorbância das reações, entre as diferentes concentrações do extrato, DOPA e a enzima tirosinase, foi determinada, também, a absorbância das soluções de extrato adicionadas de DOPA mas, sem a enzima tirosinase, para que a absorbância promovida pela coloração do extrato fosse desconsiderada.

O mesmo experimento foi realizado com uma substância reconhecidamente inibidora da enzima tirosinase, o ácido ascórbico.

O experimento foi realizado em triplicata.

5.5.1.2. Avaliação do potencial fotoprotetor

Inicialmente foi determinado o perfil espectrofotométrico de absorção do extrato, de acordo com o descrito por VIOLANTE et al. (2009). O extrato de *Psidium guajava* L. foi solubilizado em etanol:água (9:1) nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/mL para a varredura espectrofotométrica entre os comprimentos de onda de 260 a 400 nm, para verificar a absorção máxima nas regiões ultravioleta A e B, considerando que filtros solares UVB absorvem entre 290 a 320 nm e filtros UVA entre 320 a 400 nm (SCHAUDER e IPPEN, 1997; AIKENS, 2006).

*Bruna Galdorfini Chíari Andréo*_____

Em seguida, o fator de proteção solar (FPS) foi determinado por meio de duas metodologias *in vitro*: o método descrito por MANSUR et al. (1986), utilizando espectrofotometria clássica e utilizando o equipamento Optometrics SPF-290S, que emprega espectrofotometria de reflectância.

Foi realizada a determinação do fator de proteção solar (FPS) do creme base (CB), do fitocosmético (F), do creme base adicionado de filtro solar sintético (metoxicinamato de octila a 7,5%) (FS) e do creme base adicionado de filtro solar sintético e do extrato de *Psidium guajava* L. (FFS).

A metodologia de determinação do FPS pelo método MANSUR et al. (1986) é simples e se baseia na preparação de uma solução com solvente apropriado para a formulação com concentração conhecida. Sendo assim, foram preparadas soluções a 0,2 $\mu\text{L/mL}$ das emulsões em etanol e a absorbância das soluções foi medida em comprimentos de onda definidos (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm). Através da fórmula matemática desenvolvida por MANSUR et al. (1986), foi possível relacionar os valores de absorbância com o FPS da amostra. Os ensaios foram repetidos por nove vezes.

Para a determinação do fator de proteção solar (FPS) utilizando o equipamento Optometrics SPF-290S, as instruções do fabricante foram seguidas. Para isto, 110 mg de formulação foram aplicados sobre a fita Transpore[®] para se obter um filme da amostra de 2 $\mu\text{L/cm}^2$. Em seguida, a amostra foi exposta à lâmpada de Xenônio, em uma faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm, possibilitando a determinação do fator de proteção solar pelo software (KALE et al., 2010; DURASAIMY et al., 2011). As leituras foram repetidas por seis vezes.

5.5.1.3. Avaliação do potencial quimioprotetor

O efeito protetor do extrato de *Psidium guajava* L. contra dano oxidativo, induzido por peróxido de hidrogênio, foi investigado em células HepG2, HaCat e HDFa. Para isto, mais uma vez, o corante vital MTT foi empregado (YANG et al., 1999; KANNO et al., 2003; BENEDÍ et al., 2004).

A indução de danos foi realizada tratando as células com peróxido de hidrogênio. Sendo assim, inicialmente, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de reduzir a viabilidade celular para 50% (IC₅₀) foi determinada com cada linhagem

Bruna Galdorfini Chíari Andréo

celular. Isto foi realizado utilizando a mesma metodologia descrita para a avaliação da citotoxicidade, utilizando o corante MTT.

Em seguida, a mesma metodologia descrita para a avaliação da citotoxicidade foi repetida; entretanto, o tratamento consistiu na concentração do IC₅₀ de peróxido de hidrogênio adicionada a diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L.; porém, esta condição de tratamento foi realizada de duas diferentes maneiras: utilizando pré-tratamento e utilizando co-tratamento. O pré-tratamento consistiu no tratamento das células com diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L. e, após 24 horas, este tratamento foi removido e substituído pela solução de peróxido de hidrogênio na concentração do IC₅₀. O co-tratamento, por sua vez, consistiu em um tratamento simultâneo com diversas concentrações do extrato de *Psidium guajava* L. e a concentração do IC₅₀ para o peróxido de hidrogênio.

Também foi utilizado um tratamento com o meio de cultura (controle negativo) e apenas com o peróxido de hidrogênio (controle positivo).

A proteção celular promovida pelo extrato pode ser avaliada por meio da comparação da porcentagem de células viáveis verificada no controle positivo com a porcentagem de células viáveis dos diferentes tratamentos.

5.5.1.4. Avaliação do potencial antimutagênico

A avaliação do potencial antimutagênico foi realizada por meio do teste de Ames, da mesma forma como descrito para o estudo da mutagenicidade do extrato de *Psidium guajava* L.; entretanto, aos tratamentos que continham o extrato foram adicionados os mutágenos, permitindo a verificação da capacidade do extrato em evitar mutações nas cepas de *Salmonella typhimurium*.

Os mutágenos usados foram os mesmos empregados como controle positivo, nos estudos de mutagenicidade, utilizando o método de Ames (Quadro 5).

Quadro 5. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.

Cepas	Mutágeno	Concentração	Massa por placa (µg)
TA 97a	Nitrofenildiamino	0,2 mg/mL	10
TA 98	Nitrofenildiamino	0,2 mg/mL	10
TA 100	Azida sódica	0,5 mg/mL	25
TA 102	Mitomicina-C	0,01 mg/mL	0,5

5.5.1.5. Análise da atividade antioxidante pelo método da enzima superóxido dismutase (SOD-like activity)

Neste ensaio, o sal solúvel WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) é empregado. Este sal é transformado em um cristal colorido de formazana, solúvel em água, após a reação com ânions superóxido. Os ânions superóxido são formados na reação através da enzima xantina oxidase, a partir do oxigênio molecular. A taxa de redução do oxigênio molecular a ânion superóxido é diretamente proporcional à atividade da xantina oxidase e é inibido pela SOD (UKEDA et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2007).

Os níveis de inibição da formação dos cristais de formazana WST-1 (SOD-like activity) do extrato etanólico de *Psidium guajava* L. foram mensurados seguindo metodologia descrita pelo fabricante do kit (Sigma-Aldrich) e UKEDA et al. (1999).

Para isto, 20 µL de soluções do extrato em diferentes concentrações foram adicionados a poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, 200 µL da solução de trabalho do WST foram adicionados a cada poço. A reação foi cuidadosamente agitada e, em seguida, mais 20 µL da solução de xantina oxidase foram adicionados. A placa foi novamente agitada e incubada durante 20 minutos a 37±2° C. Os valores de absorbância foram mensurados em leitor de placas a 450 nm.

Além da reação entre os reagentes adquiridos juntamente com o kit e as soluções de extrato de *P. guajava* L. foram preparados três brancos da reação, para impedir interferências nos resultados, como apresentado no Quadro 6.

Quadro 6. Brancos de reação preparados para o ensaio de inibição da xantina oxidase (SOD determination kit, Sigma-Aldrich).

	Branco 1	Branco 2	Branco 3
Solução de extrato		20 µL	
Água mili-Q	20 µL		20 µL
Solução de WST	200 µL	200 µL	200 µL
Solução de enzima	20 µL		
Solvente da enzima (<i>dilution buffer</i>)		20 µL	20 µL

O branco 1 corresponde à absorbância máxima que pode ser obtida com esta reação, uma vez que não há nenhum agente inibidor da enzima xantina oxidase adicionado à reação.

Com os resultados, a porcentagem de inibição da enzima xantina oxidase e uma curva dose *versus* resposta foi elaborada. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação a seguir

$$\% \text{ Inibição} = \left\{ \frac{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco2}})}{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}})} \right\} \times 100, \text{ onde:}$$

A_{branco1} , A_{branco2} , A_{branco3} e A_{amostra} são os valores de absorbância referentes ao branco 1, branco 2, branco 3 e amostra, respectivamente.

O ajuste da curva ao modelo polinomial foi realizado para determinação da equação que a descreve e, também, para o cálculo do valor de IC_{50} , ou seja, da concentração de extrato necessária para inibir 50% da formação dos cristais de formazana de WST-1.

5.5.1.6. Análise da produção de colágeno em células HDFa

Para a avaliação da capacidade do extrato de *Psidium guajava* L. em estimular a biossíntese de colágeno, foram utilizadas células HDFa.

Estas células em cultura foram transferidas para placas de 96 poços. Foram semeados 100 µL da suspensão celular para cada poço. Após 24 horas, garantindo a adesão das células à placa, as células foram tratadas com diferentes concentrações do

Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

extrato de *Psidium guajava* L., solubilizado em meio de cultura DMEM, sem soro bovino fetal. Além destes tratamentos, as células também foram mantidas apenas com meio de cultura, o que foi denominado de controle negativo.

Os tratamentos foram mantidos em contato com as células por 24 horas e, no terceiro dia, o procedimento para quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos foi iniciado, de acordo com WIROHADIDJOJO et al. (2012).

Para isto, os tratamentos foram removidos e a placa lavada com PBS. A cada poço, foram adicionados 200 μ L de solução de Bouin para fixar o material. Após 1 hora, a solução de Bouin foi descartada e a placa lavada com água corrente, até remoção completa da coloração do sobrenadante. A placa foi vertida sobre papel absorvente para remoção de toda umidade e mantida à temperatura ambiente *overnight* para completa secagem.

A cada poço, foram adicionados 200 μ L da solução do corante vermelho Sirius (Sirius Red – Sigma Aldrich). A placa foi mantida em agitação por 1 hora, na ausência de luz. Então, o sobrenadante foi removido e a placa foi lavada, por quatro vezes, com 200 μ L de ácido clorídrico a 0,1 mol/L para completa remoção da cor do sobrenadante.

Em seguida, a cada poço, foram adicionados 200 μ L de hidróxido de sódio a 0,5 mol/L. A placa foi novamente mantida em agitação, por 1 hora, para completa solubilização das fibras colágenas (previamente coradas com Sirius Red). Finalmente, as absorbâncias foram determinadas em leitor de placas a 550 nm.

Este experimento foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

Para que fosse possível determinar a concentração de colágeno promovida por cada tratamento, uma curva analítica (concentração de colágeno *versus* absorbância) foi construída. Diferentes concentrações de colágeno tipo I (0 a 1000 μ g/mL) foram preparadas em ácido acético 0,2%. Estas concentrações foram acondicionadas em placas de 96 poços e incubadas a $37\pm 2^\circ$ C, em estufa úmida. Após 24 horas, a placa foi transferida para uma estufa seca a $37\pm 2^\circ$ C, para completa secagem. Finalmente, o mesmo procedimento realizado para a coloração do colágeno, produzido pela cultura celular, foi repetido para a placa contendo soluções do padrão de colágeno tipo I.

5.5.2. Estudos de eficácia *in vivo*

5.5.2.1. Análises histopatológicas

Além das análises *in vitro* anteriormente descritas, foi possível, também, avaliar a eficácia do fitocosmético utilizando as biópsias obtidas do dorso dos animais tratados para a avaliação da segurança. A avaliação da eficácia utilizando as biópsias coradas com hematoxilina-eosina foi baseada na comparação do número de fibras colágenas e de fibroblastos das biópsias que não receberam tratamento com as biópsias tratadas com o fitocosmético. Também foram comparados os resultados obtidos do tratamento com o peróxido de hidrogênio, substância reconhecidamente oxidante e do tratamento alternado, com peróxido de hidrogênio e fitocosmético. Áreas sem tratamento (controle negativo) e tratadas apenas com o creme base também foram avaliadas para auxiliar na compreensão dos efeitos promovidos pelo extrato de *Psidium guajava* L.

As lâminas, além de serem coradas com hematoxilina-eosina, também foram coradas com tricrômio de Masson. Esta coloração permite uma análise mais detalhada das fibras colágenas presentes nas biópsias, auxiliando na avaliação dos efeitos benéficos produzidos pelo tratamento com o fitocosmético à pele dos animais.

As etapas de coloração que foram utilizadas para cada lâmina, estão descritas no Quadro 7.

Quadro 7. Etapas de coloração das lâminas com tricrômio de Masson

Etapa	Solvente para imersão	Tempo de imersão
1	Água corrente	5 a 7 minutos
2	Água acética a 1%	1 minuto
3	Água corrente	Breve lavagem. Em seguida, retirar excesso de água das lâminas.
4	Solução A (composta por fucsina ácida, Briebricht, água destilada e ácido acético)	5 segundos
5	Água corrente	Até clareamento
6	Água acética a 1%	1 minuto
7	Água corrente	Breve lavagem
8	Ácido fosfomolibídico a 1%	1 minuto
9	Água corrente	Breve lavagem. Em seguida, retirar excesso de água das lâminas.
10	Solução B (composta por azul de anilina, água destilada e ácido acético)	2 minutos
11	Água corrente	Breve lavagem. Em seguida, retirar excesso de água das lâminas
12	Água acética a 1%	1 minuto
13	Água corrente	Breve lavagem. Em seguida, retirar excesso de água das lâminas
14	Ácido fosfomolibídico a 1%	5 minutos
15	Água corrente	Breve lavagem. Em seguida, retirar excesso de água das lâminas
16	Etanol 95° GL	5 segundos
17	Etanol absoluto	3 a 5 minutos
18	Etanol absoluto	3 a 5 minutos
19	Etanol / Xilol	3 a 5 minutos
20	Xilol	3 a 5 minutos
21	Xilol	3 a 5 minutos

Após a coloração, sobre cada lâmina, foi colada uma lamínula previamente limpa e desengordurada.

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX51, acoplado à câmera CAMEDIA C-5060, para a captura das imagens. Foi utilizado aumento de 200 vezes. O procedimento para análise das lâminas foi o mesmo descrito anteriormente para a coloração com hematoxilina-eosina, utilizando a régua quadriculada com 100 pontos de intersecção.

Foram quantificadas as fibras colágenas e os espaços em branco, correspondendo, portanto, às regiões onde ocorria ausência destas fibras, localizadas sob os cem pontos de intersecção da régua. Estruturas que não interessavam para esta contagem, como pontos de intersecção da régua que encontravam a epiderme, células, vasos sanguíneos, folículos pilosos e glândulas sebáceas, também foram quantificadas. Estes pontos foram descontados da contagem para que não interferissem na porcentagem final das estruturas estudadas.

5.6. Estudos das respostas celulares frente ao tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.

5.6.1. Avaliação do perfil de produção de TGF- β 1

A avaliação do perfil de produção da citocina TGF- β 1 foi realizada nas linhagens HepG2 e HaCat, utilizando diferentes tratamentos:

- Controle negativo: tratamento, apenas, com o meio de cultura, para verificação da produção basal de TGF- β 1,
- Controle positivo: tratamento com solução de peróxido de hidrogênio nas concentrações respectivas ao IC₅₀ de cada uma das linhagens celulares (2,5 mM para HepG2 e 5,0 mM para HaCat),
- Extrato em concentração não citotóxica: extrato de *Psidium guajava* L. a 5 mg/mL, uma concentração não citotóxica para ambas as linhagens celulares,
- Extrato na concentração do IC₅₀: extrato de *Psidium guajava* L. a 25 mg/mL, para HaCat e a 15 mg/mL para HepG2, que correspondem às concentrações que, segundo o estudo de citotoxicidade, promovem em torno de 50% de viabilidade celular para estas linhagens.

*Bruna Galdorfini Chíari Andréo*_____

- Extrato em concentrações superiores ao IC₅₀: extrato de *Psidium guajava* L., a 30 mg/mL, para HaCat e a 25 mg/mL para HepG2, que correspondem às concentrações que, segundo o estudo de citotoxicidade, promovem acima de 50% de morte celular para estas linhagens.

O perfil de produção de TGF- β 1 foi avaliado tanto para o tratamento com o extrato neutralizado quanto para o tratamento com o extrato sem neutralizar.

Para isto, foi utilizado o kit diagnóstico Human/Mouse TGF- β 1 ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience). As instruções do fabricante foram seguidas para a realização do ensaio.

Cada linhagem celular foi semeada em placas de 96 poços (100 μ L da suspensão celular a 10⁶ células/mL). Após a adesão das células à placa, 24 horas depois, foi realizado o tratamento descrito acima (100 μ L/poço). As células foram mantidas em contato com o tratamento durante 24 horas.

No mesmo dia do tratamento das células, o procedimento do kit diagnóstico foi iniciado. A placa de Elisa foi recoberta com 100 μ L do anticorpo de captura solubilizado em *Coating Buffer*. A placa foi selada e incubada *overnight* à temperatura de 4 $\pm$ 2° C.

Em seguida, a solução do anticorpo de captura foi aspirada da placa de Elisa e cinco lavagens com o *Wash Buffer* (1x) foram realizadas. Entre cada uma das lavagens o *Wash Buffer* foi mantido em contato com a placa por 1 minuto. Ao final deste processo, todo o resíduo deste tampão foi removido vertendo a placa sobre um papel absorvente.

A cada poço da placa de Elisa foram adicionados 200 μ L do *Assay Diluent* (1x). A placa novamente foi incubada, por 1 hora, à temperatura ambiente.

O conteúdo da placa foi aspirado e outras cinco lavagens com o *Wash Buffer* (1x) foram realizadas. Mais uma vez, o resíduo foi removido, vertendo a placa sobre papel absorvente.

Em seguida, na placa de 96 poços, onde ocorreu o tratamento das células, foi realizada a ativação ácida das amostras. Para isto, a cada poço foram adicionados 20 μ L de ácido clorídrico (1N), seguida de incubação, por 10 minutos, a temperatura ambiente. As amostras foram, então, neutralizadas, com 20 μ L de hidróxido de sódio (1N). Estas amostras ativadas foram transferidas para as placas de ELISA, contendo o anticorpo de

captura. Foram transferidos 100 μL de cada amostra (sobrenadantes). As placas foram incubadas, por 2 horas, à temperatura ambiente, com as placas seladas.

Após este período de incubação, as placas foram aspiradas e as cinco lavagens com *Wash Buffer* foram repetidas.

Então, o anticorpo de detecção (100 μL por poço) foi adicionado. A placa foi incubada por 1 hora.

A cada poço foram adicionados 100 μL de Avidina HRP. A placa foi selada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

Sete lavagens com o *Wash Buffer* foram repetidas, mantendo-o em contato com a placa por 1 a 2 minutos entre cada lavagem.

A cada poço foram adicionados 100 μL de *Substrate Solution*, com incubação de 15 minutos à temperatura ambiente.

Finalmente, 50 μL de ácido sulfúrico 2 N (*Stop Solution*) foram adicionados em cada poço e a absorbância foi determinada em leitor de placas a 450 nm.

As concentrações de TGF- β 1 obtidas com cada tratamento foram calculadas a partir de uma curva analítica obtida com concentrações conhecidas de TGF- β 1, submetidas ao mesmo procedimento realizado com as amostras; ou seja, o sobrenadante dos tratamentos das linhagens celulares.

5.6.2. Análise do perfil de despolarização de membrana mitocondrial (indicativo de apoptose)

A avaliação do perfil de despolarização de membrana mitocondrial, indicativo de apoptose, foi realizada submetendo culturas das células HepG2, HaCat e HDFa a diferentes tratamentos.

Os tratamentos realizados foram:

- Controle negativo (CN): células mantidas apenas em meio de cultura sem soro fetal bovino, durante o mesmo período que os outros tratamentos,
- Solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): soluções de peróxido de hidrogênio, em meio de cultura, foram utilizadas para o tratamento das linhagens celulares. As concentrações escolhidas foram referentes ao IC_{50} , do estudo de citotoxicidade, para cada linhagem celular. O peróxido de hidrogênio foi utilizado como substância indutora de apoptose, nas linhagens celulares (LARROSA et al., 2008),

Bruna Galdorfini Chíari Andréo

- Solução de extrato de *P. guajava* L. (IC₅₀ Ext.): soluções do extrato de *P. guajava* L., em meio de cultura, foram utilizadas para o tratamento das linhagens celulares. As concentrações escolhidas foram ao IC₅₀, do estudo de citotoxicidade, para cada linhagem celular,
- Tratamento concomitante com peróxido de hidrogênio e de extrato de *P. guajava* L. (IC₅₀ Ext./H₂O₂): foram utilizadas soluções destas substâncias em concentrações que promovessem 50% de viabilidade celular, em cada uma das linhagens estudadas,
- Tratamento com concentração não citotóxica de extrato de *P. guajava* L. (Ext._não citotox.): foi utilizada solução a 5 mg/mL do extrato de *P. guajava* L. Esta concentração não promove redução da viabilidade celular em nenhuma das linhagens celulares estudadas, de acordo com o estudo de citotoxicidade,
- Tratamento concomitante com peróxido de hidrogênio e de extrato de *P. guajava* L. em concentração não citotóxica (Ext._não citotox./H₂O₂): foram utilizadas soluções do peróxido de hidrogênio, em concentrações que promovem 50% de viabilidade celular, em cada uma das linhagens estudadas, concomitantemente com solução não citotóxica de *Psidium guajava* L. (5 mg/mL).

O resumo dos tratamentos está apresentado no Quadro 8.

Quadro 8. Concentrações de extrato de *Psidium guajava* L. e peróxido de hidrogênio utilizadas nos tratamentos para avaliação do perfil de despolarização de membrana mitocondrial

	HepG2		HaCat		HDFa	
	H ₂ O ₂	Extrato	H ₂ O ₂	Extrato	H ₂ O ₂	Extrato
CN	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂	2,5 mM	-	5,0 mM	-	7,5 mM	-
IC ₅₀ Ext.	-	15 mg/mL	-	25 mg/mL	-	25 mg/mL
IC ₅₀ Ext./ H ₂ O ₂	2,5 mM	15 mg/mL	5,0 mM	25 mg/mL	7,5 mM	25 mg/mL
Ext. não citotox.	-	5 mg/mL	-	5 mg/mL	-	5 mg/mL
Ext. não citotox./H ₂ O ₂	2,5 mM	5 mg/mL	5,0 mM	5 mg/mL	7,5 mM	5 mg/mL

Para realização do experimento, inicialmente, foram distribuídos 1 mL de suspensão celular a 5.10^5 células/mL, em placas de 24 poços. A adesão celular à placa foi aguardada por 24 horas.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

Em seguida, 1 mL de cada um dos tratamentos descritos anteriormente foram distribuídos nas placas de 24 poços contendo as culturas celulares de HepG2, HaCat e HDFa.

Após 24 horas de contato das células com os tratamentos, os procedimentos para determinação da taxa de apoptose promovida por cada um dos tratamentos foram iniciados. O kit BD™ MitoScreen (BD Biosciences) foi empregado e, portanto, as instruções do fabricante foram seguidas.

As células aderidas a cada poço foram removidas por meio de incubação com tripsina. As células então removidas, juntamente com o sobrenadante que continha os tratamentos, foram transferidas para tubos de centrifuga contendo 500 µL de meio de cultura, para inativação da tripsina. Em seguida, foram submetidos à centrifugação a 400 g, por 5 minutos.

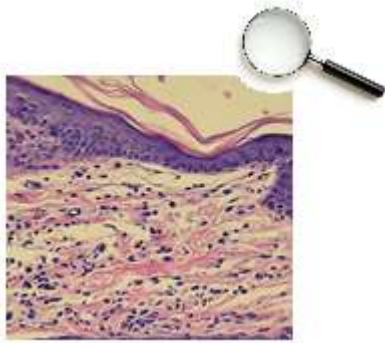
O sobrenadante foi descartado e 0,5 mL da solução do corante JC-1 (preparada no momento do uso) foram adicionados. Os pellets de células foram desmanchados e as suspensões celulares em contato com o JC-1 foram incubadas por 15 minutos a $37\pm 2^\circ\text{C}$ em estufa de CO_2 .

Então, as células foram submetidas ao procedimento de lavagem, em que 2 mL de tampão (*Assay Buffer* 1x) foram adicionados aos tubos contendo as células, os pellets desmanchados e centrifugados a 400 g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido.

Finalmente, 0,5 mL do mesmo tampão foram adicionados às células, os pellets desmanchados e as suspensões celulares avaliadas por citometria de fluxo (FACSDiva – BD Biosciences), sendo verificados 10.000 eventos.

5.7. Análise estatística dos resultados

A análise estatística e a plotagem dos gráficos foi realizada utilizando o software Origin 7. A análise dos dados foi realizada pela determinação de média e desvio padrão, além de análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p<0,05$), quando adequado.



Resultados *e Discussão*

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envelhecimento cutâneo é um processo complexo, consequência de efeitos intrínsecos ou geneticamente programados, combinados com efeitos extrínsecos, causados por fatores ambientais, como a radiação ultravioleta.

O aumento na expectativa de vida da população e o impacto psicossocial causado pelo envelhecimento da pele têm estimulado a demanda por intervenções cosméticas e dermatológicas efetivas. Contudo, apesar dos avanços em relação ao entendimento dos eventos fisiológicos, celulares e moleculares associados ao envelhecimento, ainda é pequena a parcela da população que tem acesso a estas intervenções, ainda tidas por muitos como algo supérfluo, pois desconsideram a importância da prevenção e da elevação da autoestima para a qualidade de vida da população.

A dificuldade de acesso da população às intervenções efetivas para a prevenção do envelhecimento da pele é devida, principalmente, ao alto custo dos produtos eficazes disponíveis no mercado.

Com os resultados dos ensaios descritos a seguir, este trabalho apresenta uma alternativa segura e efetiva de intervenção cosmética, com grande parte de seus efeitos fisiológicos, celulares e moleculares descritos, para a prevenção e amenização dos efeitos do envelhecimento da pele.

Apesar de não estar em nosso alcance prever o custo final deste produto, é possível inferir que seu custo será inferior ao de produtos disponíveis no mercado, que envolvem sofisticadas tecnologias para seu desenvolvimento. Neste trabalho, é sugerido o uso de um derivado vegetal simples; contudo, com seus efeitos benéficos amplamente explorados e que, talvez, apresente custo mais acessível à população, como ocorre com agentes fitoterapêuticos de baixo custo (CAVALCANTE et al., 2007).

No que diz respeito à eficácia deste produto, foram explorados os efeitos relacionados à atividade antioxidante do extrato, que pode proporcionar efeitos protetores contra a ação de substâncias oxidantes (quimioproteção e antimutagenicidade), além de avaliar o estímulo à proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, efeito de clareamento da pele e fotoprotetor. Em relação à segurança, os efeitos *in vitro* e *in vivo* promovidos pelo extrato de *Psidium guajava* L. foram explorados. Além disso, respostas celulares foram avaliadas como tentativa de compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos desencadeados por este extrato.

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

6.1. Estudos de segurança

6.1.1. Estudos de segurança *in vitro*

6.1.1.1. Avaliação da citotoxicidade

O efeito citotóxico gerado pelo extrato de *Psidium guajava* L. foi avaliado nas linhagens celulares HepG2, HaCat e HDFa.

Além de as linhagens terem sido submetidas ao tratamento com soluções do extrato, também foram tratadas com soluções do extrato neutralizado (pH 7,2 – 7,4). Este procedimento teve como objetivo a verificação da influência da acidez do extrato no efeito causado às células, uma vez que, na preparação da formulação cosmética, o extrato foi previamente neutralizado.

Os resultados obtidos para os tratamentos estão mostrados nas Figuras 14 a 19.

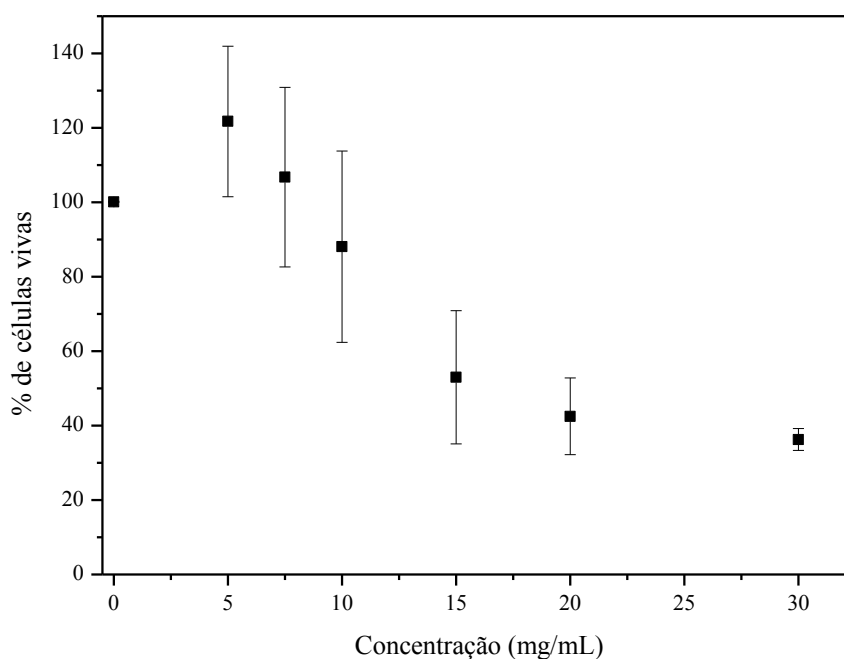


Figura 14. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de *P. guajava* L. em células HepG2.

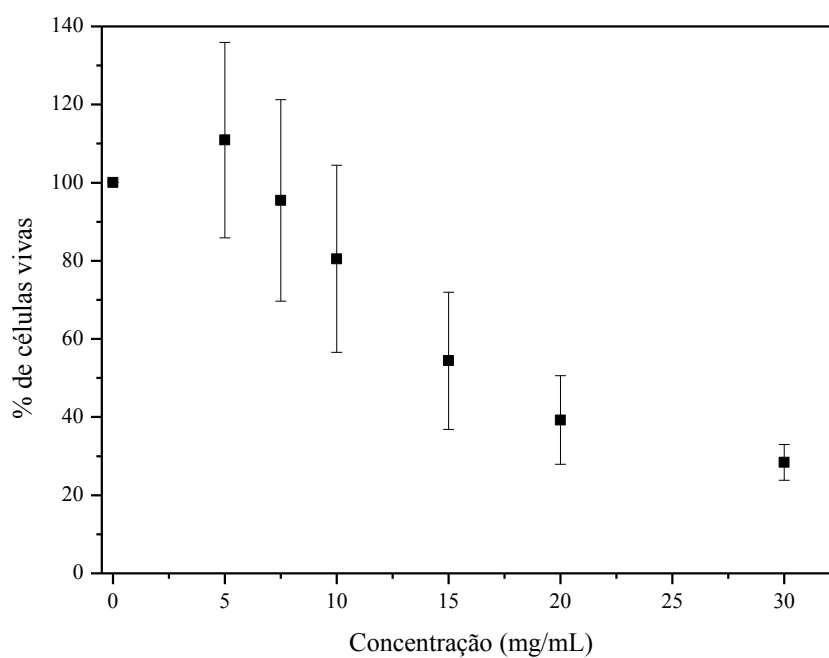


Figura 15. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de *P. guajava* L. em células HepG2.

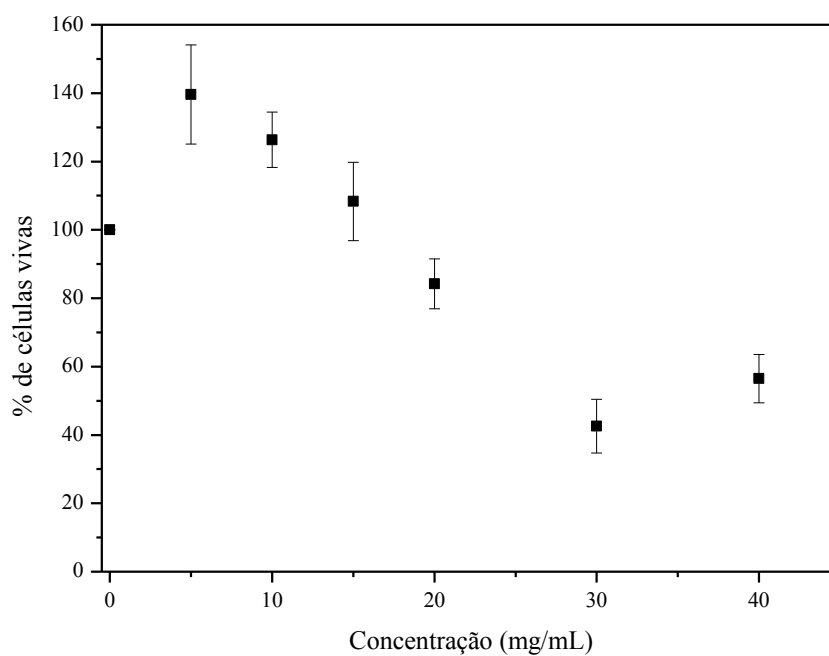


Figura 16. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de *P. guajava* L. em células HaCat.

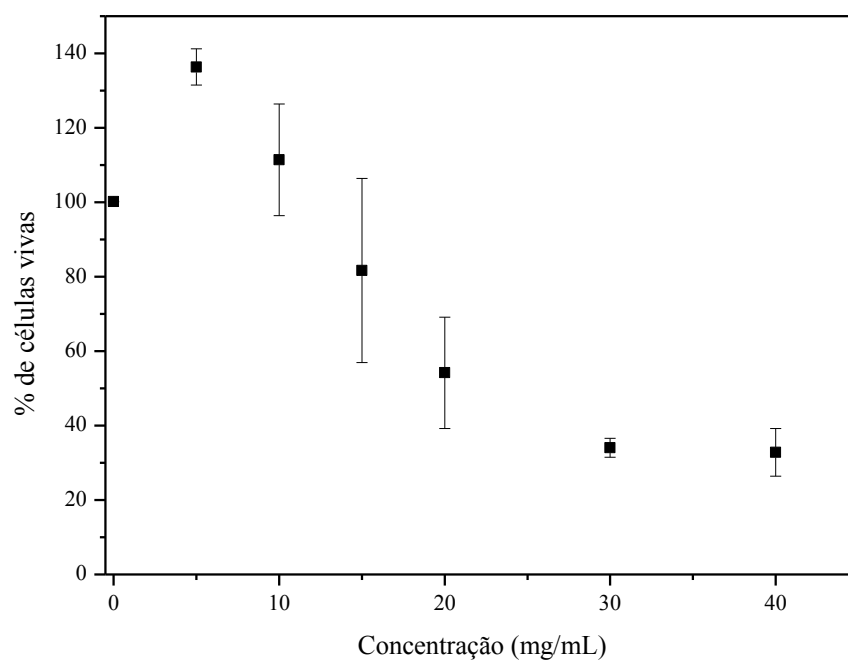


Figura 17. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de *P. guajava* L. em células HaCat.

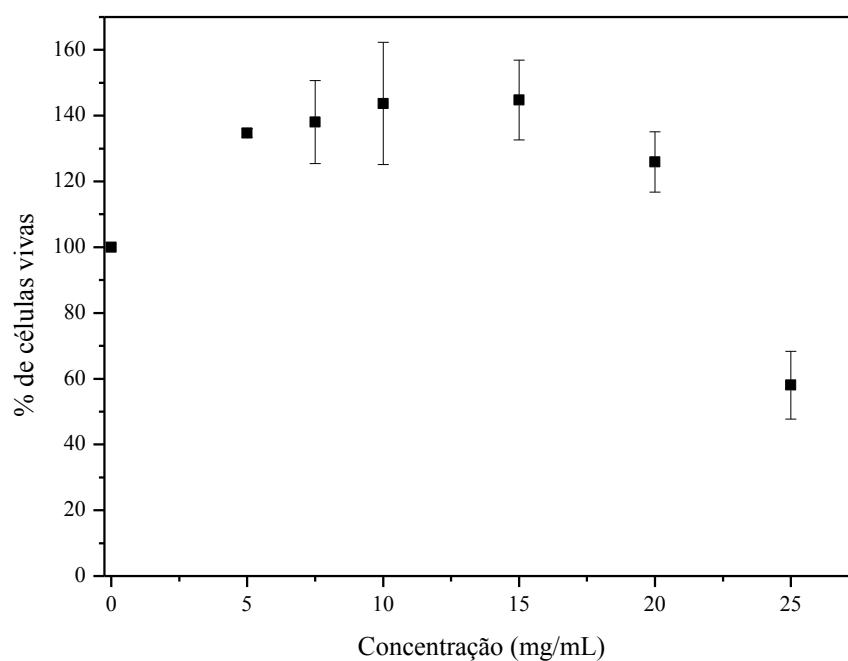


Figura 18. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato de *P. guajava* L. em células HDFa.

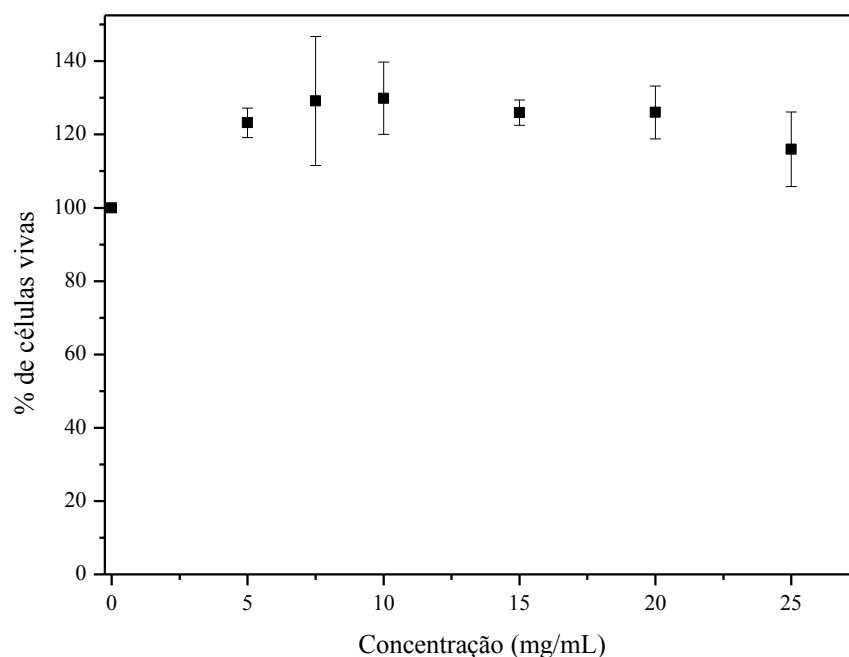


Figura 19. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo extrato neutralizado de *P. guajava* L. em células HDFa.

A partir dos gráficos obtidos com 3 experimentos independentes, foi calculado o IC_{50} para cada tratamento e linhagem celular, cujos dados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC_{50} de cada um dos tratamentos com cada linhagem celular.

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Média	Desvio padrão
HepG2	Extrato (mg/mL)	21,74	13,45	13,82	16,34 ^a	4,68
	Extrato neutralizado (mg/mL)	11,57	15,71	20,04	15,77 ^a	4,24
HaCat	Extrato (mg/mL)	26,14	26,54	28,15	26,94 ^b	1,06
	Extrato neutralizado (mg/mL)	23,98	24,92	28,82	25,91 ^b	2,56
HDFa	Extrato (mg/mL)	22,95	23,18	25,70	23,94 ^c	1,52
	Extrato neutralizado (mg/mL)	>25,00	>25,00	>25,00	>25,00 ^d	-

^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Avaliando os resultados expressos na Tabela 3, é possível inferir que, em relação ao efeito citotóxico, não há diferença no tratamento das células HepG2 e HaCat, com o extrato original ou neutralizado, permitindo supor que a acidez do extrato não é um fator determinante na toxicidade.

Contudo, para as células HDFa, há diferença no perfil de toxicidade promovido pelo tratamento com o extrato e com o extrato neutralizado; mas, ambos somente em concentrações muito elevadas promovem toxicidade celular.

De acordo com os valores de IC_{50} , é possível inferir elevada segurança em relação ao uso cosmético do extrato de *Psidium guajava* L., uma vez que são necessárias concentrações elevadas para promover a toxicidade. Ainda, quando estes valores de IC_{50} são comparados à atividade antioxidante do extrato, é possível notar uma elevada margem de segurança, pois são necessários apenas $0,290 \pm 0,004$ mg/mL do extrato para inibição de 50% de radicais livres presentes em solução, conforme descrito, em 2012, por CHIARI e colaboradores (CHIARI et al., 2012b), que avaliaram o potencial antioxidante do extrato de *P. guajava* L. frente ao radical DPPH.

É possível calcular o índice de segurança do extrato, pela divisão entre o valor da concentração tóxica às células e valor da concentração antioxidante efetiva. Desta forma, foram obtidos os seguintes índices de segurança, respectivamente, para células HepG2, HaCat e HDFa: 56,34; 92,90 e 82,55, para o tratamento das células com o extrato não neutralizado.

6.1.1.2. Avaliação do potencial mutagênico

6.1.1.2.1. Em cepas de *Salmonella typhimurium*

Os resultados do teste de Ames foram expressos na forma de média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa, além do índice de mutagenicidade, cujos dados estão apresentados na Tabela 4.

O índice de mutagenicidade (IM) é calculado pela razão entre o número de colônias revertentes verificadas no tratamento com o composto em análise (extrato de *Psidium guajava* L.) e o número de colônias revertentes verificadas no controle negativo (água destilada) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Para a realização deste ensaio, as cepas bacterianas utilizadas foram modificadas, de forma a serem dependentes da adição de histidina para o seu

desenvolvimento em meio de cultura e só se desenvolvem quando reverterem esta condição, de dependência de histidina, por algum tipo de mutação (MARON e AMES, 1983). É comum que haja uma pequena taxa de revertência espontânea nas culturas, mas é considerado resultado significativo apenas quando o índice de mutagenicidade for igual ou superior a 2 ou quando for verificada relação dose resposta entre o número de colônias revertentes e a concentração testada (BERNSTEIN et al. 1982; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Em todos os experimentos foram empregadas substâncias reconhecidamente mutagênicas, como controle positivo. Este procedimento é realizado para confirmar a capacidade de reversão da mutação, em cada cepa bacteriana (MARON e AMES, 1983).

Tabela 4. Atividade mutagênica, sem ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM)

TA 97a			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	148,00	49,50	-
3,19	229,00	3,61	1,55
6,38	110,50	41,72	0,75
12,76	146,67	11,50	0,99
25,52	166,00	74,95	1,12
51,04	184,50	4,95	1,25
CP	1059,33	277,29	7,16
TA 98			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	21,33	1,53	-
15,66 mg	35,67	11,59	1,67
31,325 mg	37,00	11,27	1,73
62,65 mg	37,00	4,36	1,73
125,3 mg	33,00	0,00	1,55
250,6 mg	98,00	2,65	4,59
CP	1310,67	204,21	61,45
TA 100			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	92,67	22,05	-
15,66 mg	107,67	17,39	1,16
31,325 mg	102,33	4,73	1,10
62,65 mg	94,00	13,00	1,01
125,3 mg	106,33	5,86	1,15
250,6 mg	53,66	10,60	0,58
CP	1262,33	227,36	13,62
TA 102			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	421,00	25,52	-
7,83125 mg	491,33	91,10	1,17
15,6625 mg	524,00	58,92	1,24
31,325 mg	516,00	24,98	1,23
62,65 mg	532,00	38,16	1,26
125,3 mg	522,67	95,44	1,24
CP	2386,67	22,52	5,67

CN: controle negativo

CP: controle positivo

Como pode ser observado na Tabela 4, a massa de extrato analisada variou de acordo com as cepas bacterianas. Esta quantidade foi definida de acordo com estudos prévios de toxicidade e, quando foi verificada toxicidade às cepas bacterianas (redução da viabilidade), a massa de extrato utilizada foi reduzida para os estudos de mutagenicidade, ou seja, foram utilizadas massas de extrato que não causam toxicidade às cepas estudadas.

Para todas as massas de extrato de *Psidium guajava* L. e cepas testadas, não foi verificado índice de mutagenicidade superior a 2, com exceção da maior massa testada (250,6 mg) para a linhagem TA98, onde há, portanto, indício de mutagenicidade.

As mutações evidenciadas na cepa TA98 de *S. typhimurium* são mutações do tipo *frameshift* (adição ou deleção de uma ou mais bases) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Além da análise do extrato de *Psidium guajava* L. em solução aquosa, também foi avaliado o potencial mutagênico do extrato submetido à ativação metabólica, conforme dados da Tabela 5. A ativação metabólica é obtida adicionando, ao extrato, soluções de um sistema de ativação metabólica reconhecido como S9. Este sistema de ativação metabólica é preparado a partir de um homogenato de fígado de ratos e, por isso, contém enzimas hepáticas capazes de promover a metabolização do extrato (MARON e AMES, 1983).

Tabela 5. Atividade mutagênica, com ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM)

TA 97a			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	124,33	17,21	-
3,19	158,33	17,21	1,27
6,38	171,33	8,62	1,38
12,76	175,00	4,58	1,41
25,52	173,00	4,24	1,39
51,04	221,5	16,26	1,78
CP	2205,33	236,28	17,74
TA 98			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	19,5	4,95	-
15,66 mg	27,66	1,53	1,42
31,325 mg	33,00	3,46	1,69
62,65 mg	25,67	1,15	1,32
125,3 mg	33,33	8,33	1,71
250,6 mg	54,50	0,71	2,79
CP	1850,67	228,71	94,91
TA 100			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	125,33	18,15	-
15,66 mg	181,67	16,92	1,45
31,325 mg	166,67	36,36	1,33
62,65 mg	126,00	16,52	1,01
125,3 mg	142,67	32,96	1,14
250,6 mg	203,66	9,24	1,62
CP	2080,00	204,12	16,60
TA 102			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	IM
CN	336,67	72,04	-
7,83125 mg	444,67	30,29	1,32
15,6625 mg	405,33	63,79	1,20
31,325 mg	362,00	46,86	1,08
62,65 mg	404,00	20,30	1,20
125,3 mg	424,66	7,57	1,26
CP	528,67	13,32	1,57

CN: controle negativo

CP: controle positivo

O extrato de *Psidium guajava* L. foi considerado não mutagênico para todas as cepas avaliadas, de acordo com o método de BERNSTEIN et al. (1982), com a mesma exceção verificada para o tratamento sem ativação metabólica. O comportamento foi o mesmo; porém, em menor intensidade. Este resultado pode ser um indicativo de potencial mutagenicidade do extrato de *Psidium guajava* L., se utilizado em concentração bastante elevada.

Esta concentração foi definida como bastante elevada porque, considerando que a concentração proposta para uso do extrato de *Psidium guajava* L. em um fitocosmético seja de 5%, para que fosse atingida a massa de 250 mg de extrato, seria necessária uma massa de 5 g de fitocosmético. Esta quantidade não é atingida com o uso rotineiro de um produto para aplicação facial, geralmente comercializado em embalagens de 30 g, que deve ser utilizado em, aproximadamente, 30 dias, portanto, 1 g ao dia. Assim, a massa aproximada de uso diário (1g/dia) é 5 vezes menor do que a considerada mutagênica pelo teste de Ames.

Além disso, é preciso considerar que, nem toda a substância ativa incorporada em uma formulação será capaz de ser liberada e, em seguida, atingir o estrato córneo, a epiderme e a derme. De acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (CHIARI, 2011), o fitocosmético contendo 5% de extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de liberar em torno de 4 mg/cm^2 de extrato após 8 horas de aplicação do produto, indicando segurança ainda maior no uso deste composto ativo, uma vez que a massa mutagênica é aproximadamente 63 vezes maior que a massa capaz de penetrar 1 cm^2 de pele.

Este resultado é de grande importância, considerando que o teste de Ames é um ensaio utilizado mundialmente para o *screening* de novas substâncias químicas e, inclusive, de novos fármacos (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Os resultados do teste de Ames são utilizados, inclusive, para a submissão de dados às agências regulatórias para o registro ou aceitação de substâncias químicas, como fármacos ou biocidas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; ANVISA, 2003; ANVISA, 2012).

Além disso, este resultado é bastante relevante devido à escassez de estudos sobre o potencial mutagênico de derivados da goiaba, principalmente da fruta (SATO et al., 2010). Provavelmente, devido ao fato de ser uma fruta amplamente utilizada para o consumo humano, este assunto não tenha despertado a atenção de pesquisadores. Um pouco maior é a quantidade de estudos sobre o seu potencial antimutagênico.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

6.1.1.2.2. Em células humanas HepG2

Com a finalidade de complementar os resultados obtidos com o teste de Ames, a avaliação do potencial mutagênico também foi realizada em células humanas HepG2. A complementação de resultados obtidos com o ensaio de Ames, através de ensaios para avaliação de mutagenicidade, em células humanas, tem sido realizada como preconiza WOLLIN e GÖRLITZ (2004).

O índice de divisão nuclear é calculado de acordo com a quantidade de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas, encontradas em uma população de 500 células. Para isto, é utilizada a equação a seguir:

$$IDN = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/n$$

Em que, $M1$, $M2$, $M3$ e $M4$ indicam o número de células verificadas com 1, 2, 3 ou 4 micronúcleos, respectivamente. E n indica o número total de células analisadas.

Quando todas as células falharam no processo de divisão o IDN é igual a 1. Quando todas as células completaram uma divisão celular e, portanto, são binucleadas, o IDN é igual a 2. Quando uma porção substancial de células viáveis completou mais de uma divisão nuclear durante o bloqueio da citocinese, o IDN é maior que 2.

De acordo com os resultados verificados no ensaio (Tabela 6), como para todos os tratamentos o valor de IDN está entre 1 e 2, é possível concluir que uma porção significativa das células completaram uma divisão celular, sendo que parte delas se encontrava binucleada (FENECH, 2007).

Tabela 6. Índice de divisão nuclear (IDN) em cada um dos tratamentos

Tratamento	Média	Desvio padrão
Controle Negativo	1,54	0,06
Controle Positivo	1,21	0,03
5 mg/mL	1,41	0,28
7,5 mg/mL	1,37	0,11
15 mg/mL	1,36	0,09

A obtenção de células binucleadas é importante para garantir que as mesmas completaram a divisão celular e que, portanto, havia a possibilidade da formação dos micronúcleos, que só podem ser formados durante a divisão celular, como pode ser observado na representação estabelecida pela Figura 20. Neste ensaio, a citocalasina-B é empregada para impedir a completa divisão celular, permitindo a análise das células binucleadas e a pesquisa de estruturas que indiquem danos celulares, como os micronúcleos, as pontes nucleoplasmáticas e os brotamentos nucleares (FENECH, 2007).

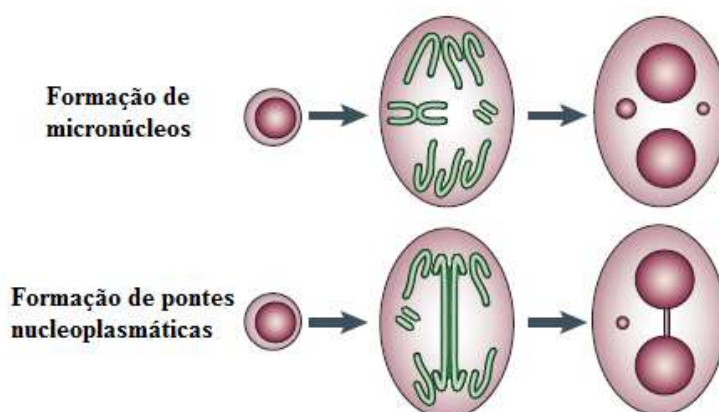


Figura 20. Formação de micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas (Adaptado de FENECH, 2007).

Em relação à frequência de micronúcleos obtida com o tratamento com o extrato de *P. guajava* L., foi possível verificar que, entre as células binucleadas, que apresentavam dois ou três micronúcleos, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos, nem mesmo se comparado o controle negativo com o controle positivo. Isto provavelmente ocorreu devido à baixa incidência destas estruturas; portanto, apenas as células binucleadas, contendo um micronúcleo, foram utilizadas para a análise.

Os resultados demonstraram que o extrato de *Psidium guajava* L., de acordo com este ensaio, não é considerado mutagênico nas concentrações testadas (Figura 21). Devido ao elevado desvio padrão, este resultado não se apresentou de maneira muito clara nas concentrações de 5,0 e 7,5 mg/mL que, apesar de serem estatisticamente iguais ao controle negativo, também podem ser consideradas iguais ao controle positivo. Contudo, na maior concentração testada (15 mg/mL), a similaridade do resultado obtido

no controle negativo e no tratamento com o extrato é nítida, demonstrando a segurança no uso deste composto.

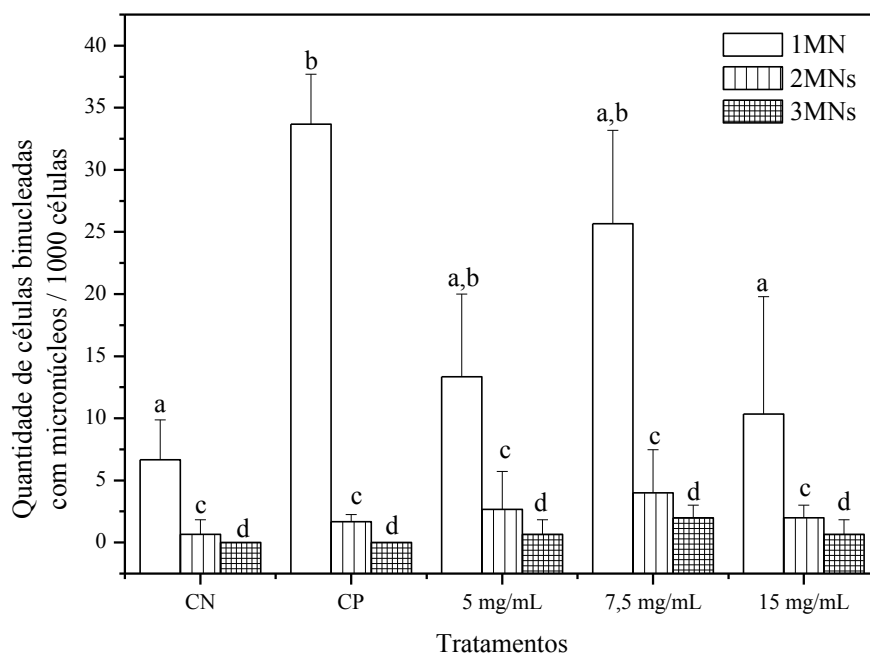


Figura 21. Quantidade de células binucleadas que apresentaram um, dois ou três micronúcleos (MNs) em 1000 células. A análise estatística (ANOVA, $p < 0,05$) foi realizada separadamente para células binucleadas que apresentaram 1 micronúcleo (^{a,b}), 2 micronúcleos (^c) e 3 micronúcleos (^d) (CN: Controle negativo e CP: Controle positivo) (^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Em relação à frequência de micronúcleos, independente da quantidade em cada célula binucleada, a Figura 22 apresenta os resultados obtidos no ensaio realizado:

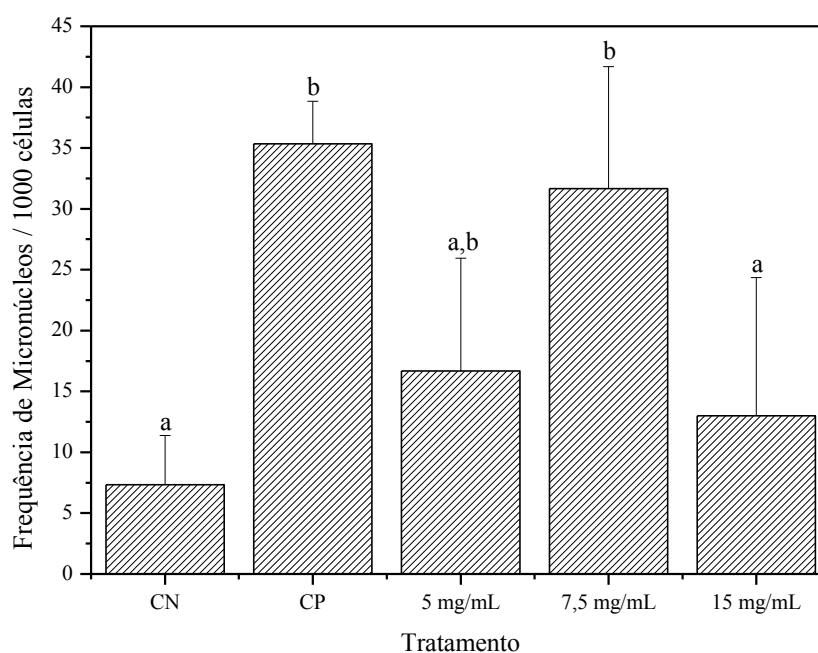


Figura 22. Frequência de micronúcleos em cada 1000 células binucleadas (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Mais uma vez, o resultado para o tratamento com a concentração de 15 mg/mL explicita a atividade não-mutagênica do extrato de *Psidium guajava* L.

A quantificação das pontes nucleoplasmáticas e dos brotamentos nucleares estão apresentadas na Figura 23. As pontes nucleoplasmáticas são estruturas que contém DNA e ligam os núcleos de células binucleadas. São originárias de cromossomos dicêntricos e resultado de reparos insatisfatórios de quebras de DNA ou fusões de telômeros (FENECH, 2007).

Os brotamentos nucleares representam o mecanismo pelo qual o núcleo elimina DNA amplificado ou complexos de reparo de DNA. Tem a aparência muito semelhante à dos micronúcleos, exceto pelo fato de estarem conectados ao núcleo por meio de uma ponte (FENECH, 2007).

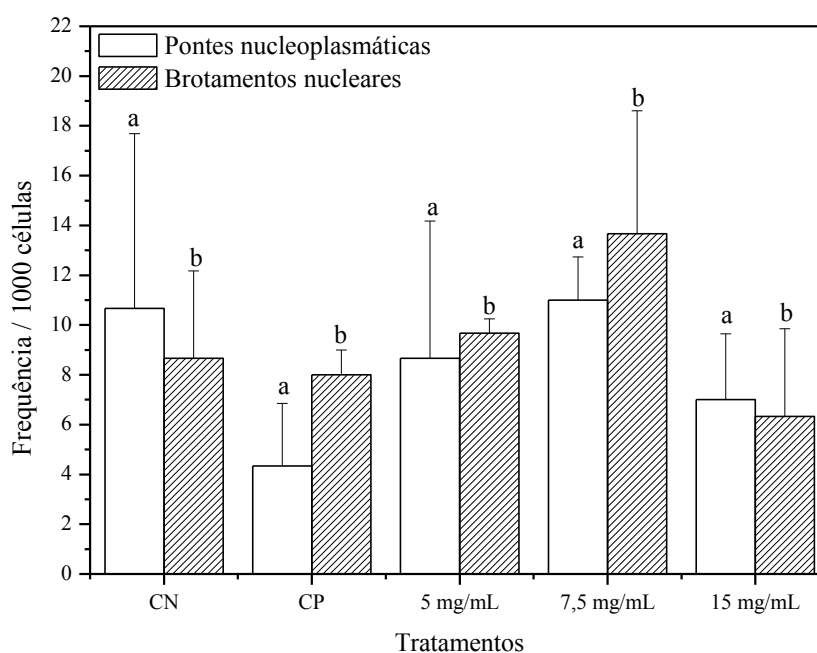


Figura 23. Frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares a cada 1000 células em relação aos tratamentos (CN: Controle negativo, CP: Controle positivo) (A análise estatística foi realizada separadamente para as pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares) (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Estes resultados não foram considerados significativos, uma vez que não houve diferença estatística entre a frequência de pontes nucleoplasmáticas, de brotamentos nucleares dos controles negativo e positivo.

Comparando os resultados obtidos na avaliação da mutagenicidade em cepas de *Salmonella* e em células HepG2, o extrato pode ser considerado como seguro em relação à mutagenicidade. Entretanto, para a cepa TA98, na maior concentração avaliada, foram verificados indícios de mutagenicidade, o que não foi verificado no ensaio com células HepG2. Isto pode ser devido a fatores como: diferenças que ocorrem nas concentrações testadas, nos mecanismos de reparo celular verificados nas cepas bacterianas e de células humanas, assim como nas diferentes capacidades metabólicas (WOLLIN e GÖRLITZ, 2004). Devido a este fato, é recomendável o estudo do potencial mutagênico em, no mínimo, dois modelos experimentais diferentes, como bactérias e células de mamíferos (WOLLIN e GÖRLITZ, 2004).

6.1.1.2.3. Em células humanas HaCat

O estudo do potencial mutagênico em células HaCat foi proposto por serem células derivadas da pele humana, representando a exposição que haveria no uso do fitocosmético (WOLLIN e GÖRLITZ, 2004).

Apesar de o experimento ter sido realizado exatamente da mesma forma como descrito para as células HepG2, não foi obtido êxito. A quantidade de células binucleadas verificadas nas lâminas confeccionadas foi muito inferior à quantidade necessária (500/lâminas), o que inviabilizou a análise dos resultados.

Isto pode ser devido a problemas no tratamento com a citocalasina-B, que pode não ter evitado a completa citocinese para a verificação de células binucleadas.

6.1.2. Estudos de segurança *in vivo*

6.1.2.1. Avaliação da irritação dérmica primária

Na avaliação da irritação dérmica primária, foram avaliadas cinco regiões diferentes do dorso de cada animal, submetidas a diferentes tratamentos. Este procedimento teve como propósito utilizar o próprio animal como seu controle. Além disso, esta forma de desenvolvimento do estudo permitiu reduzir o número de animais e obter diversas respostas ao mesmo tempo. Utilizando três regiões: uma área sem tratamento, uma área tratada com o creme base e uma área tratada com o fitocosmético, foi possível verificar se o manuseio promoveu algum tipo de irritação na pele dos animais, se o creme base, ou seja, o veículo é irritante e se a substância ativa (extrato de *Psidium guajava* L.) é capaz de promover algum tipo de reação à pele dos animais.

Outras duas regiões foram tratadas: uma com creme base, contendo 5% de peróxido de hidrogênio e, a outra, alternando o tratamento com creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético. Estes dois últimos tratamentos foram utilizados apenas nos experimentos seguintes.

Seguindo os parâmetros da Escala de Draize e, analisando a presença de eritema e edema após 24 e 72 horas da aplicação dos tratamentos, não houve nenhuma alteração significativa na pele dos 6 animais, caracterizando Grau 0 para todos os tratamentos.

Sendo assim, o creme base e o extrato de *Psidium guajava* L. podem ser considerados não irritantes se utilizados pelo período de 4 horas.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

6.1.2.2. Avaliação da irritação dérmica cumulativa

Na avaliação da irritação dérmica cumulativa, os três tratamentos citados na avaliação da irritação dérmica primária foram repetidos, além dos tratamentos com creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio e alternando o tratamento com creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético. O tratamento com peróxido de hidrogênio teve por objetivo induzir uma leve irritação na pele dos animais (KLEIN-SZANTO e SLAGA, 1982) e o tratamento alternado teve o intuito de avaliar se o extrato de *Psidium guajava* L. contido no fitocosmético seria capaz de prevenir e/ou minimizar o efeito irritativo do peróxido de hidrogênio. Estes dois últimos tratamentos foram melhor avaliados nas análises histopatológicas.

O peróxido de hidrogênio foi escolhido por ser uma substância reconhecidamente capaz de gerar radicais livres e agir como um irritante cutâneo (KLEIN-SZANTO e SLAGA, 1982). Além disso, por agir de maneira danosa através da geração de espécies reativas, poderia ter seu efeito reduzido ou neutralizado com o uso de uma substância antioxidante como o extrato de *Psidium guajava* L.

A concentração de 5% para o peróxido de hidrogênio foi baseada em uma busca na literatura, na qual foi verificado que, concentrações em torno de 3,5% do peróxido de hidrogênio são utilizadas para o tratamento de isquemia da pele, aumentando a concentração de oxigênio neste órgão devido ao maior fluxo sanguíneo (TUR et al., 1995). Outros estudos demonstraram que concentrações de peróxido de hidrogênio superiores a 15% causam elevada toxicidade e, até mesmo, a necrose do tecido (KLEIN-SZANTO e SLAGA, 1982). Como o intuito era promover uma leve irritação, a concentração igual ou inferior a 3,5% não foi considerada adequada e concentrações superiores a 15% foram descartadas, pois o tratamento não tinha o objetivo de causar danos e sofrimento aos animais.

Em um estudo de KUROKAWA et al. (1984), foi descrito o uso tópico do peróxido de hidrogênio a 5%, pois concentrações superiores são capazes de causar toxicidade aguda. Este mesmo estudo também relatou que, nesta concentração, poderia ocorrer a carcinogênese, se houvesse o uso prolongado.

Assim, como verificado na avaliação da irritação dérmica primária, não houve alterações visíveis na pele dos animais, o que é pontuado como grau 0 segundo a Escala de Draize (Figura 24). Até mesmo na pele que recebeu o tratamento com peróxido de

hidrogênio, em que era esperado algum tipo de reação irritativa, não foi verificado o surgimento de edema e eritema.

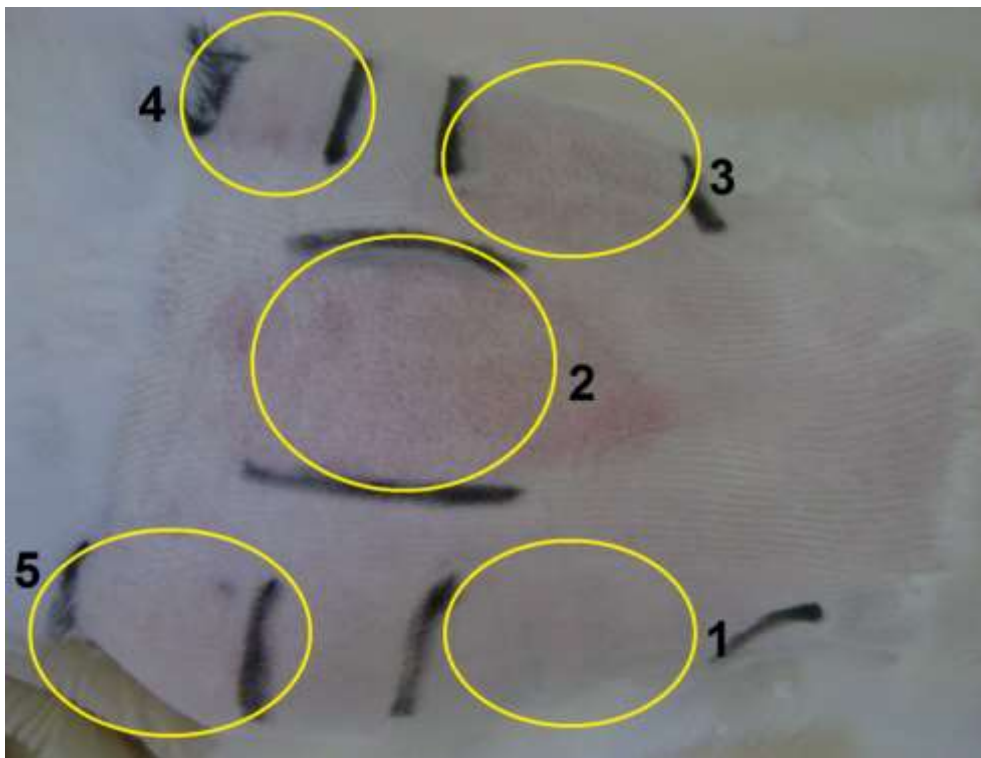


Figura 24. Aspecto da pele de um dos coelhos após 14 dias consecutivos de tratamento (1 – controle, 2 – creme base, 3- fitocosmético, 4 – peróxido de hidrogênio, 5 – peróxido de hidrogênio/fitocosmético).

De acordo com um estudo comparativo entre o ensaio de irritação cutânea realizado na pele de coelhos e na pele de humanos, foi determinado que o ensaio realizado em coelhos é bastante preciso para avaliar produtos irritantes severos e não-irritantes para a pele humana; entretanto, é falho para separar irritantes leves de irritantes moderados (PHILLIPS II et al., 1972). Neste estudo de PHILLIPS II et al. (1972), diversas substâncias consideradas irritantes pelo teste em coelhos foram demonstradas não irritantes quando avaliadas na pele de humanos. Este fato demonstra uma maior sensibilidade da pele destes animais quando comparada à pele humana, o que indica, ainda, maior segurança em relação à capacidade de promover irritação no uso do fitocosmético estudado.

6.1.2.3. Avaliação da potencial comedogênico

A avaliação do potencial comedogênico é uma importante etapa que deve ser considerada no desenvolvimento de produtos indicados para uso tópico, principalmente cosméticos (DRAELOS e DINARDO, 2006). Devido ao potencial em formar comedões promovido por diversos produtos, foi criado até o termo “acne cosmética”, por KLIGMAN e MILLS, em 1972, para denominar o processo de formação de comedões relacionado ao uso de certas matérias primas ou produtos (DRAELOS e DINARDO, 2006).

Para a avaliação da comedogenicidade, os animais foram divididos em dois grupos, sendo que três coelhos foram tratados com o creme base e, os outros três, com o fitocosmético. Em cada um dos animais uma das orelhas foi tratada e a outra foi utilizada como controle.

Esta divisão dos animais em dois grupos foi realizada para que, caso o resultado fosse positivo para a comedogenicidade, fosse possível determinar se este efeito era causado pelo veículo (creme base) ou pelo próprio extrato de *Psidium guajava* L.

Durante o período de estudo, nenhum dos tratamentos promoveu o aparecimento de eritema, edema e de comedões (Figuras 25 e 26). Como não foi verificado nem mesmo o aumento na queratose folicular, os tratamentos, ou seja, tanto o creme base quanto o fitocosmético, podem ser considerados não-comedogênicos.

De acordo com a literatura, os resultados do teste de comedogenicidade devem ser descritos com base em uma escala de 0 a 5. Grau 0 significa que não houve aumento na queratose folicular; graus 1 a 2 significam o aumento visível de queratose (hiperqueratose); graus 3 a 4 significam o desenvolvimento de comedões e grau 5 significa a presença de comedões severos (FULTON et al., 1984). Então, pode ser inferido que o creme base e o fitocosmético foram classificados como grau 0 para a comedogenicidade.



Figura 25. Aspecto da pele de um dos coelhos após 24h do último dia de tratamento com o fitocosmético (1- fitocosmético, 2 – controle negativo).

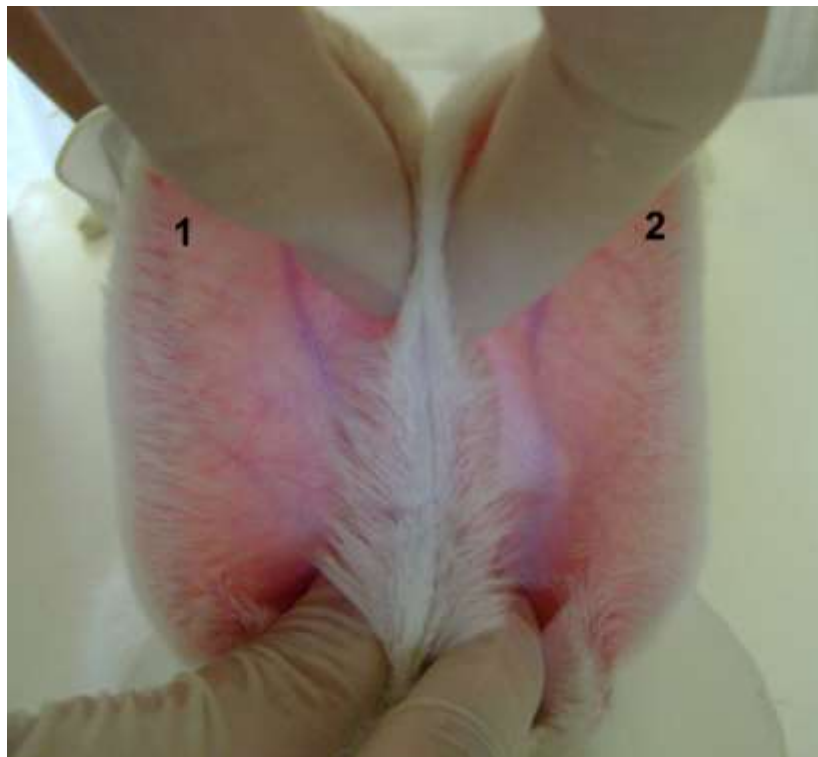


Figura 26. Aspecto da pele de um dos coelhos após 24h do último dia de tratamento com o creme base (1- creme base, 2 – controle negativo).

6.1.2.4. Avaliação da irritação ocular

Em nenhum dos grupos tratados foram observadas secreção, hiperemia, quemose, irite, aumento da densidade da córnea e opacidade, além de não ter sido verificada nenhuma alteração ocular no período de observação (24, 48, 72 horas e 7 dias após a aplicação) (Figuras 27 e 28).

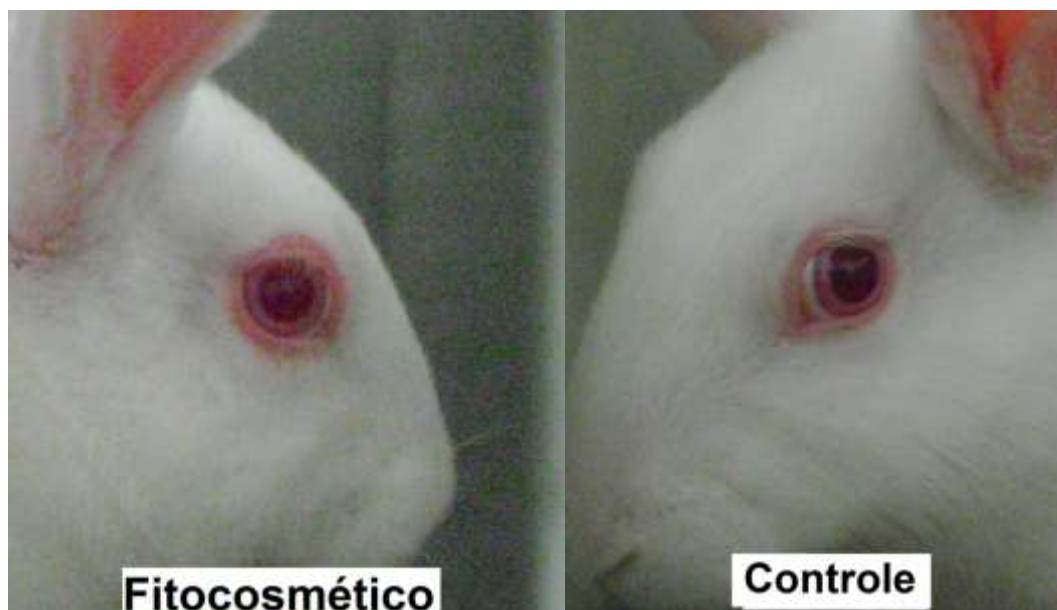


Figura 27. Olho tratado com fitocosmético (esquerda) e controle (direita), após 24 horas da aplicação.

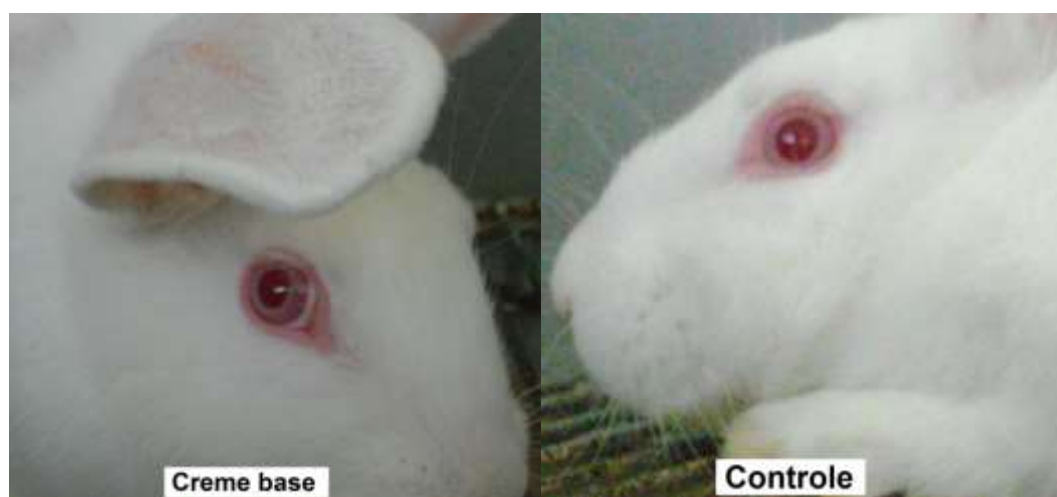


Figura 28. Olho tratado com o creme base (esquerda) e controle (direita), após 24 horas da aplicação.

Apesar de já existirem testes alternativos para a avaliação da irritação ocular, segundo um estudo realizado em 1997 pela COLIPA (BRANTOM et al., 1997), entre os ensaios avaliados, nenhum foi recomendado como capaz de substituir o ensaio *in vivo*. Entretanto, dentre os métodos avaliados, os que apresentaram resultados mais promissores foram o FLT (*Fluorescein Leakage Test*), o TEA (*Tissue Equivalent Assay*) e o RBC (*Red Blood Cell*). Além disto, a avaliação da irritação ocular foi realizada nos coelhos, neste trabalho, uma vez que os animais já seriam utilizados para outros ensaios, sendo justificável a determinação da irritação ocular.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2003; ANVISA, 2012), reconhece que os métodos *in vitro* são métodos que fornecem resultados preliminares e que, quando utilizados, devem ser realizados um conjunto de testes para se obter dados relacionados à vascularização (Het-Cam), opacidade/permeabilização (BCOP) e citotoxicidade (MTT, RBC).

As avaliações de irritação dérmica primária e cumulativa, irritação ocular e comedogenicidade foram realizadas da maneira descrita no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (ANVISA, 2003; ANVISA, 2012) e demonstraram a segurança do creme base e do fitocosmético, sendo os produtos, de acordo com estes parâmetros, descritos como não irritantes para pele e olhos e não-comedogênicos.

6.1.2.5. Análises histopatológicas

Foram confeccionadas 300 lâminas histológicas referentes às 10 unidades de cada tratamento, para cada animal. Parte destas lâminas foi corada com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson e foram avaliadas com auxílio do Prof. Dr. Luiz Carlos Spolidório, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da UNESP.

De acordo com a análise das lâminas coradas com hematoxilina-eosina foi possível verificar um padrão tecidual normal, nas biópsias de pele utilizadas como controle negativo, ou seja, que não receberam nenhum tipo de tratamento (Figuras 29 e 30). A pele analisada era constituída por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado superficial denominado epiderme, apresentando 2 a 3 camadas de células. As fotomicrografias revelaram uma camada córnea delgada, com descamação discreta.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

Foi verificada uma camada mais profunda de tecido conjuntivo, abaixo da epiderme, a derme. A derme era constituída por tecido conjuntivo composto por células fusiformes (fibroblastos) que acompanhavam a orientação dos extensos e espessos feixes de fibras colágenas, figuras vasculares e folículos pilosos. Foi verificada, ainda, a presença de raras células inflamatórias.

As características verificadas nas fotomicrografias das biópsias definidas como controle negativo foram utilizadas como padrão, para comparação com os outros tratamentos.

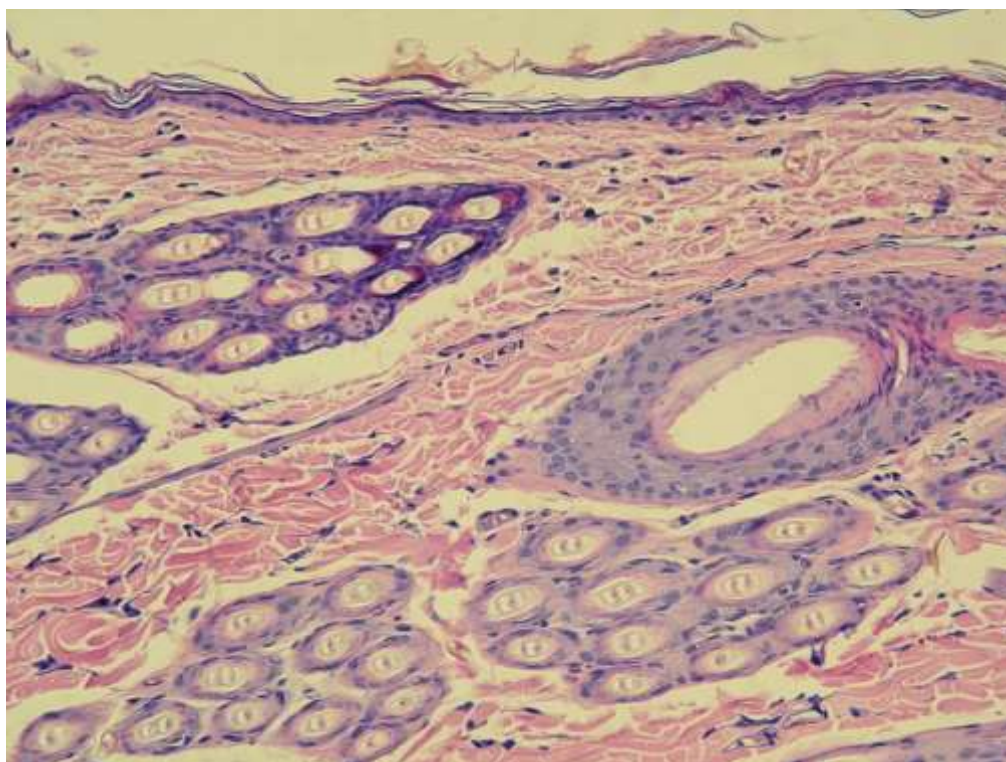


Figura 29. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele sem tratamento (controle negativo) (aumento de 200 vezes).

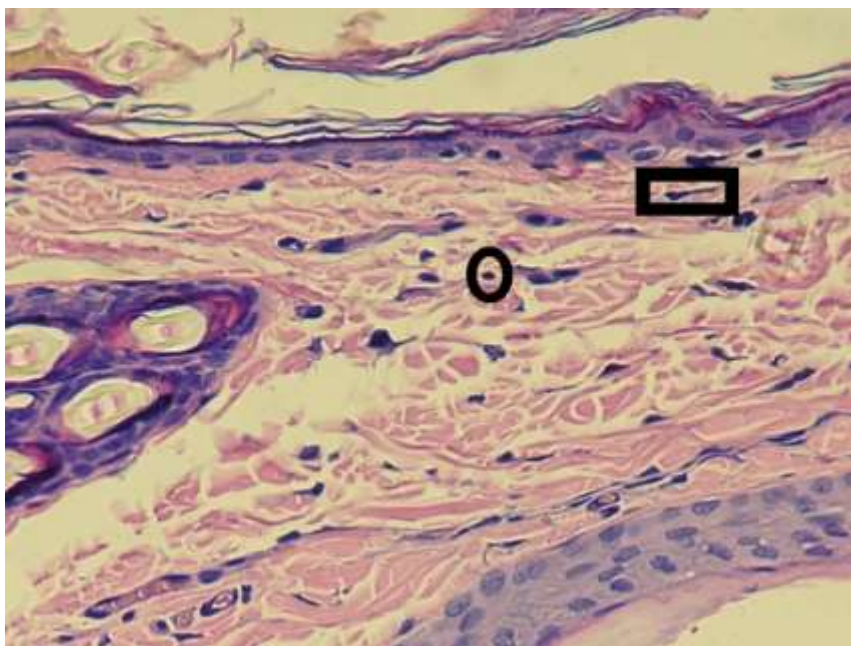


Figura 30. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele sem tratamento (controle negativo). Destaque para células inflamatórias (●) e para células fusiformes (■).

As fotomicrografias de biópsias de pele tratadas com o creme base revelaram hiperplasia da epiderme, traduzindo-se pelo aumento do número de células epiteliais. Outra possível explicação para o aumento da espessura da epiderme promovida pelo creme base, pode ser a maior hidratação proporcionada a esta camada da pele devido à aplicação do creme base. A maior hidratação faz com que exista a presença de água entre as células desta camada, tornando-as mais distantes umas das outras, sendo que a epiderme torna-se visualmente mais espessa. A espessura e a descamação do estrato córneo foram bastante semelhantes às verificadas no controle negativo. No tecido conjuntivo subjacente, foi observado o aumento no calibre dos vasos sanguíneos, acompanhado de aumento na frequência de células inflamatórias (infiltrado inflamatório) composto, predominantemente, por células mononucleares, quando comparado às biópsias de pele sem tratamento (Figuras 31 e 32).

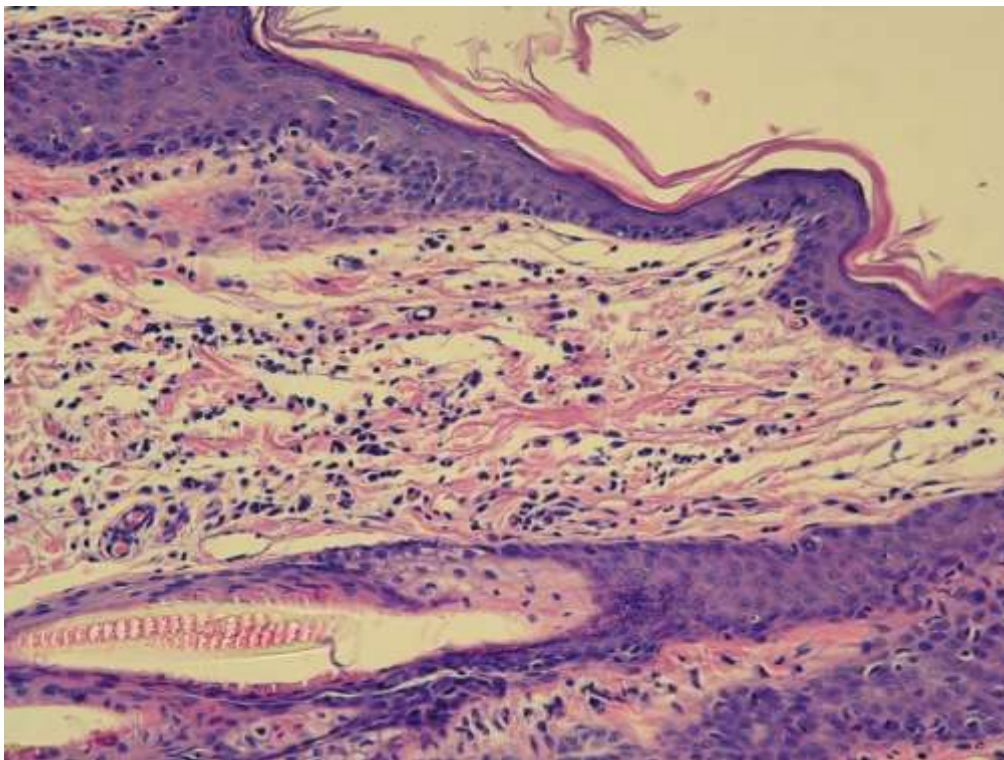


Figura 31. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base (aumento de 200 vezes).

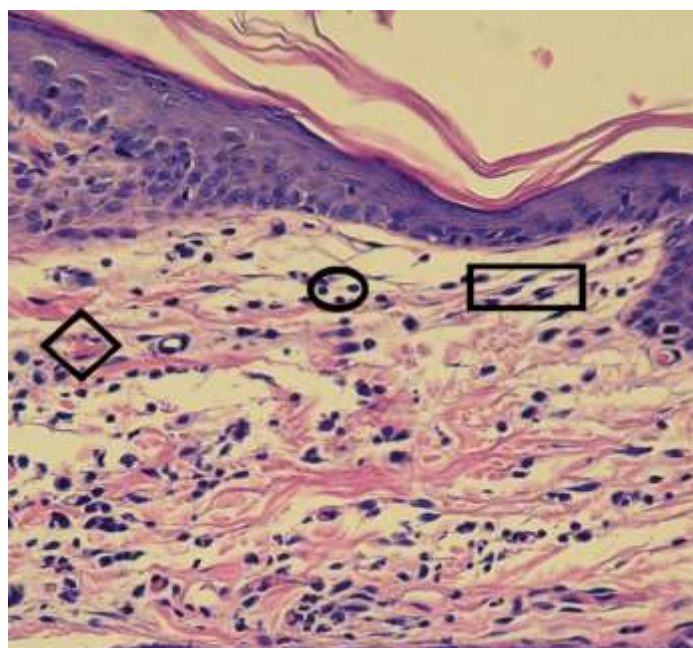


Figura 32. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base. Destaque para células inflamatórias (○), para células fusiformes (▭) e para vasos sanguíneos dilatados (◇).

Semelhante ao grupo anteriormente descrito, o tratamento com o fitocosmético também induziu hiperplasia da epiderme. A espessura e a descamação do estrato córneo foram bastante semelhantes às verificadas no controle negativo. No tecido conjuntivo subjacente, houve aumento na frequência de células inflamatórias (infiltrado inflamatório) e no calibre dos vasos sanguíneos, quando comparados ao controle negativo. Além disso, foi verificado aumento na frequência de células fusiformes quando comparadas às biópsias de pele sem tratamento (Figuras 33 e 34).

Portanto, é possível, a partir das análises histopatológicas anteriormente descritas, aventar a hipótese de que as alterações hiperplásicas e inflamatórias observadas em ambos os grupos podem ser decorrentes do creme base, pois o tratamento com fitocosmético teve comportamento inerte no processo da reação da pele quando comparado ao creme base; entretanto, na presença do fitocosmético, houve aumento da quantidade de células fusiformes, o que permite atribuir ao extrato de *Psidium guajava* L. o estímulo à replicação das células fusiformes na derme da pele dos animais.

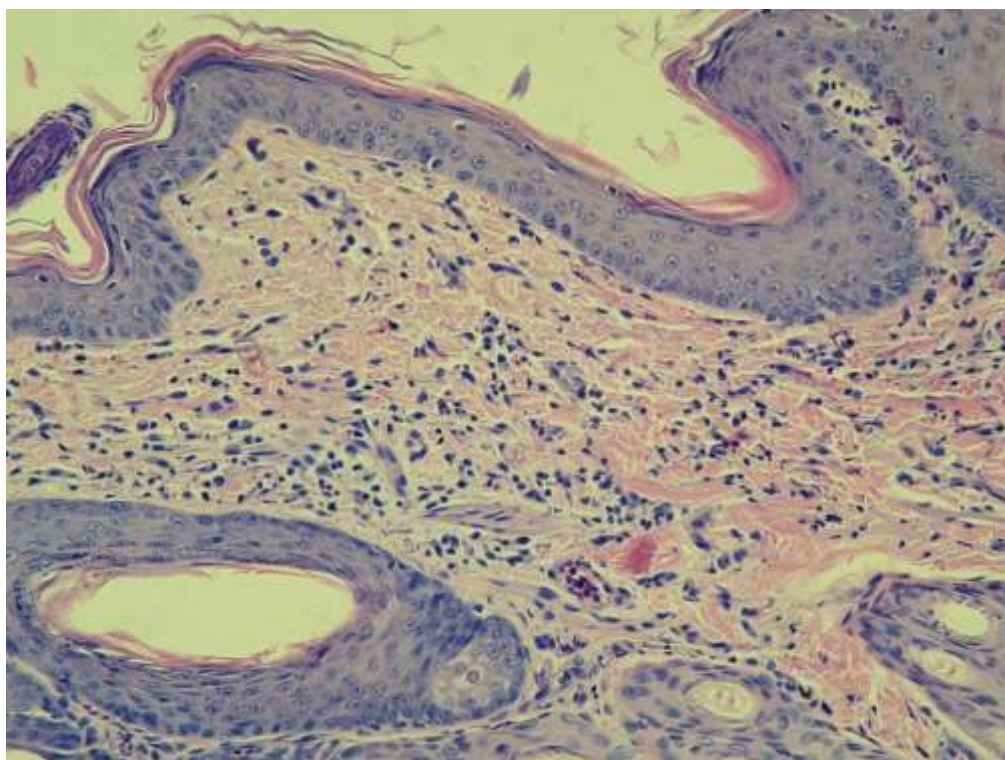


Figura 33. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o fitocosmético (aumento de 200 vezes).

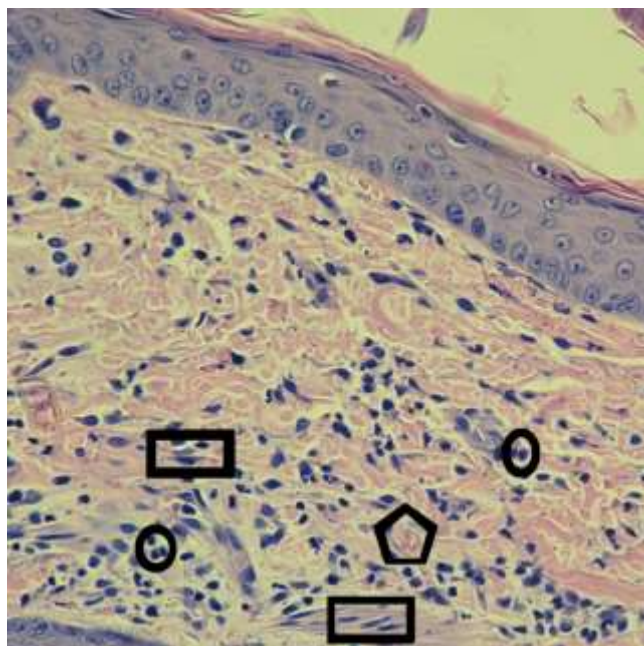


Figura 34. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o fitocosmético. Destaque para células inflamatórias (●), para células fusiformes (■) e para vasos sanguíneos dilatados (◡).

O creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio também induziu hiperplasia da epiderme; entretanto, foi observado que, apesar do estrato córneo apresentar espessura semelhante à verificada no controle negativo, havia desestruturação da sua conformação morfológica, o que pode denotar descamação (Figuras 35 e 36). O aumento do infiltrado de células inflamatórias foi observado e, ao mesmo tempo, o aumento de células fusiformes, quando comparadas às biópsias de pele sem tratamento. Por outro lado, quando comparado ao tratamento com o creme base e com o fitocosmético, houve maior aporte de células inflamatórias associado à vasodilatação. O creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio induziu diminuição da quantidade de feixes de fibras de colágeno, o que é evidenciado pela maior quantidade de espaços vazios.

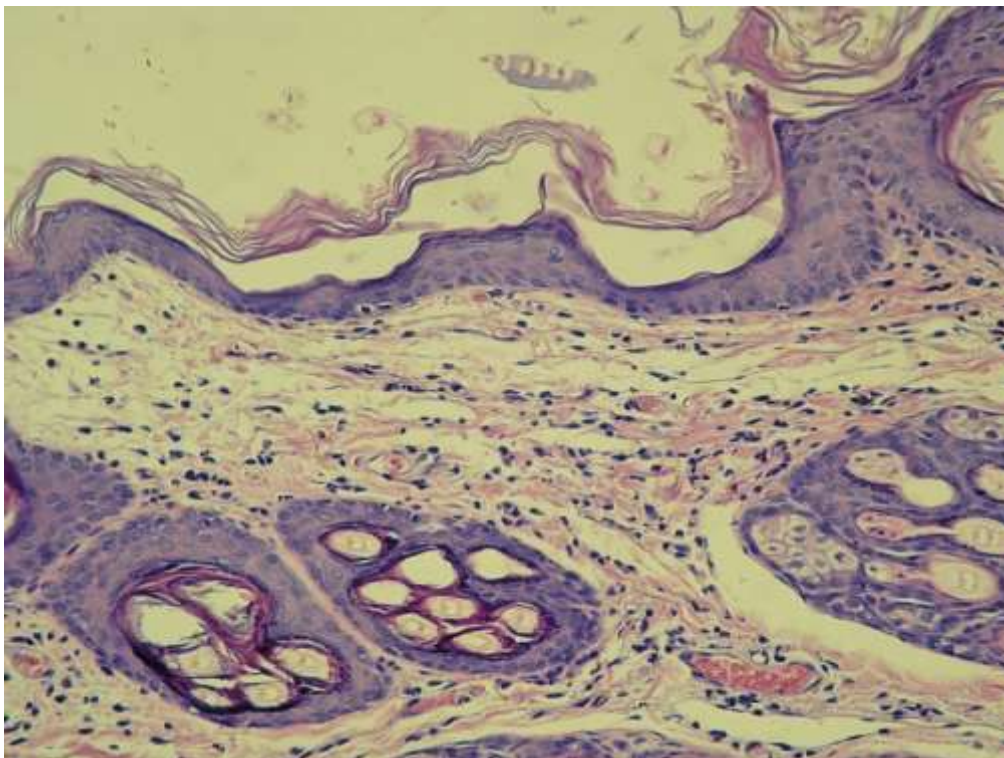


Figura 35. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio (aumento de 200 vezes).

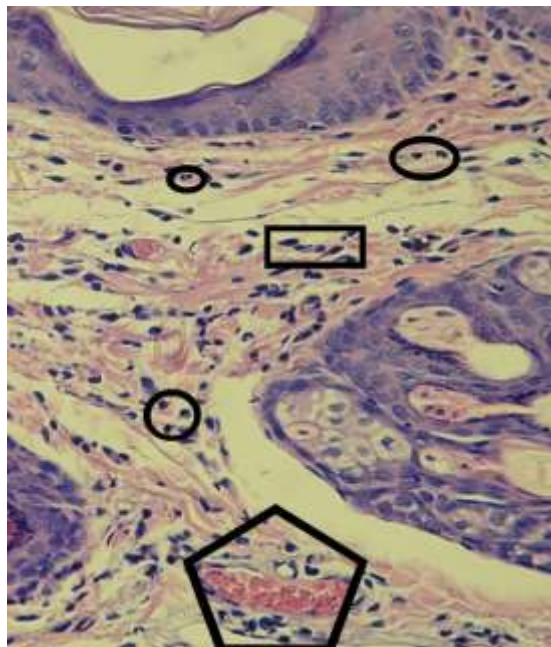


Figura 36. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio. Destaque para células inflamatórias (○), para células fusiformes (▭) e para vasos sanguíneos dilatados (◑).

No tratamento alternado com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético, as biópsias de pele também apresentaram hiperplasia da epiderme, com o estrato córneo de espessura bastante semelhante à verificada no controle negativo, sendo que a hiperplasia pode ser atribuída ao creme base (Figuras 37 e 38). A descamação do estrato córneo aparentemente foi reduzida em relação às biópsias de pele tratada apenas com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio, demonstrando possível efeito neutralizador dos efeitos do peróxido de hidrogênio pelo extrato de *Psidium guajava* L.

Em relação ao infiltrado inflamatório, houve discreta redução nas lâminas das biópsias de pele tratadas com o fitocosmético e com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio alternadamente, assim como discreto aumento na frequência de células fusiformes, o que permite inferir que o efeito tenha sido promovido pelo extrato de *Psidium guajava* L. Em relação às estruturas de tecido conjuntivo, aparentemente houve menor rarefação de fibras colágenas com o tratamento alternado com o fitocosmético. A vasodilatação, também, foi menos intensa do que a verificada no tratamento apenas com creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio.

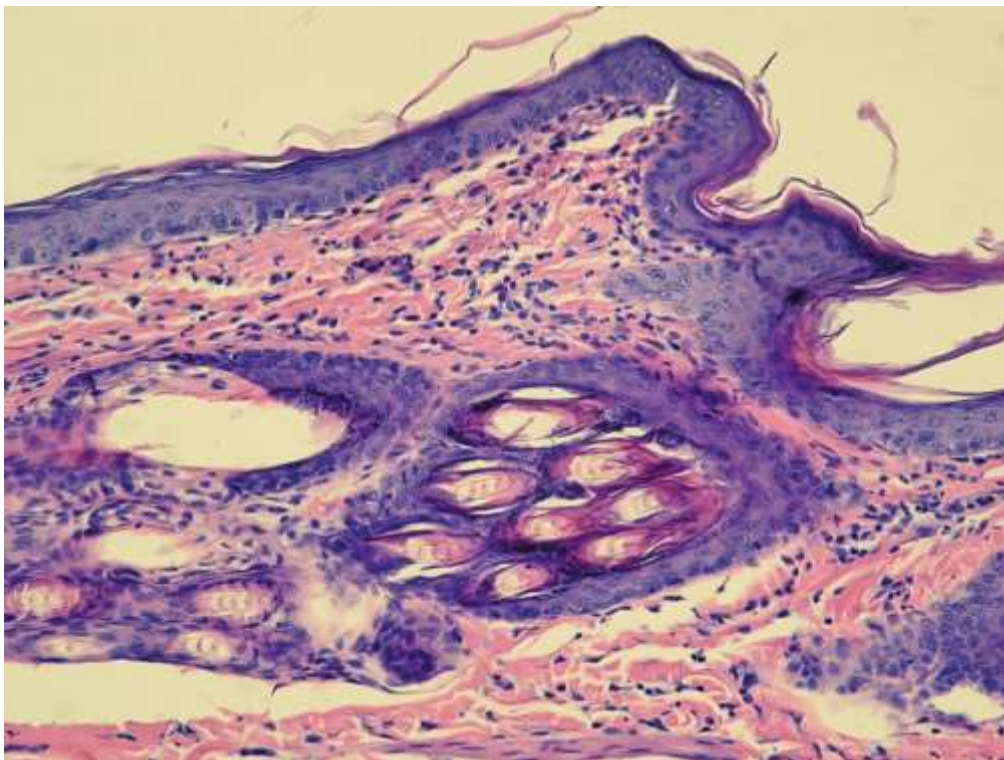


Figura 37. Fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada alternadamente com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético (aumento de 200 vezes).

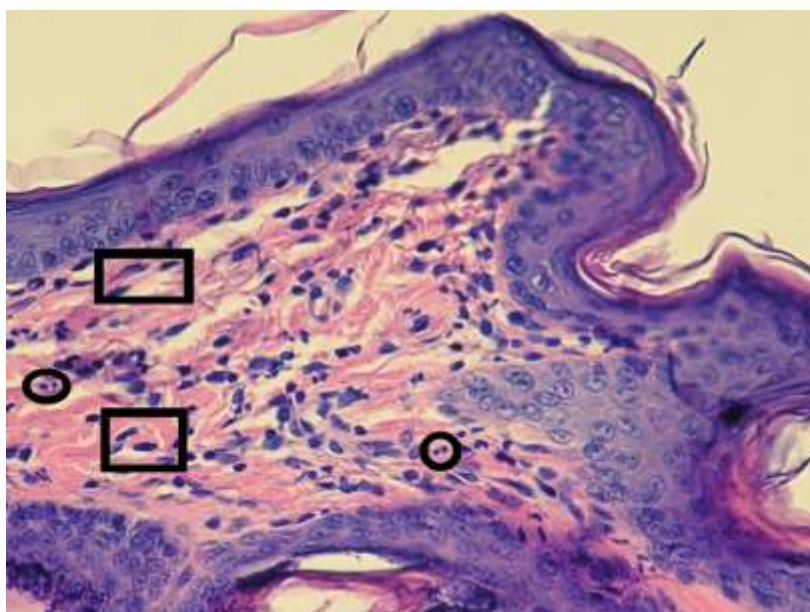


Figura 38. Aproximação de fotomicrografia de corte histológico de biópsia de pele tratada alternadamente com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio e com o fitocosmético. Destaque para células inflamatórias (○) e para células fusiformes (□).

Os resultados do tratamento com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio e do tratamento alternado do creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio e do fitocosmético estão descritos juntamente com os resultados dos estudos de segurança do fitocosmético, pois foram realizados concomitantemente. Entretanto, estes resultados contribuem para a determinação da eficácia deste produto, demonstrando melhora nas características da pele com o tratamento alternado com o fitocosmético, quando comparado ao tratamento apenas do creme contendo peróxido de hidrogênio. Portanto, provavelmente, o extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de reduzir os efeitos indesejáveis promovidos pelo peróxido de hidrogênio.

As lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina também foram avaliadas quantitativamente. Uma régua quadriculada com 100 pontos de intersecção foi posicionada sobre todas as fotomicrografias e diferentes estruturas foram quantificadas sobre estes pontos.

Inicialmente, foi quantificada a frequência de células inflamatórias nos seis animais submetidos aos cinco diferentes tratamentos (Figura 39). Foi possível notar que todos os tratamentos, quando comparados ao controle negativo, de maneira geral, promoveram aumento no infiltrado inflamatório.

Ao serem comparados o tratamento com o creme base e o tratamento com o fitocosmético, pode ser verificado que a frequência de células inflamatórias é bastante semelhante (infiltrado inflamatório moderado). Apenas o tratamento com o creme base contendo 5% de peróxido de hidrogênio foi capaz de tornar o infiltrado inflamatório intenso em alguns animais mas, no geral, estatisticamente igual ao tratamento com o fitocosmético e com o creme base. A intensidade do infiltrado inflamatório voltou a ser moderada quando o tratamento com peróxido de hidrogênio foi alternado com o fitocosmético.

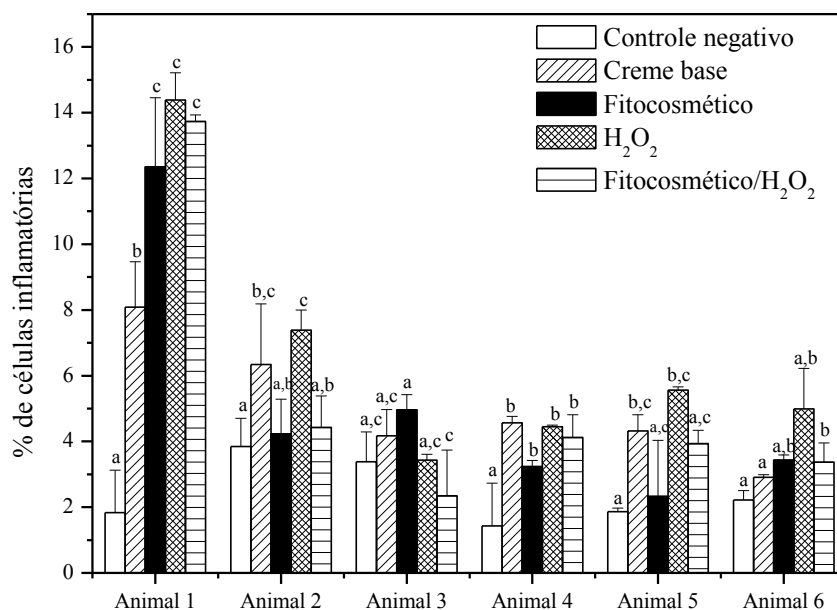


Figura 39. Porcentagem de células inflamatórias quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Para facilitar a compreensão desta análise, um gráfico com a média de todos os animais foi elaborado (Figura 40).

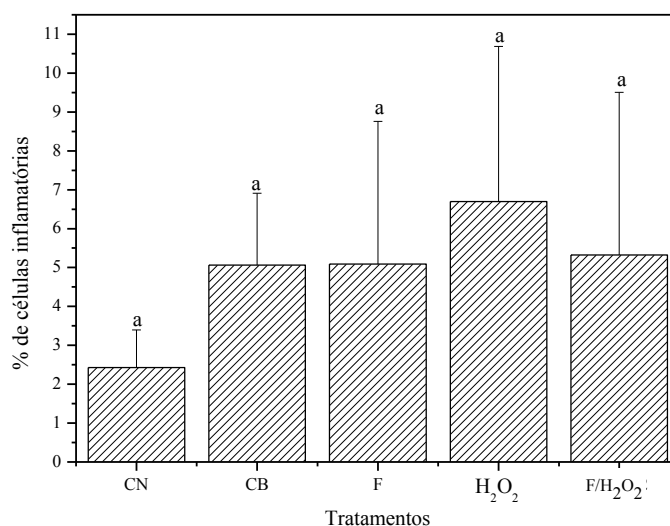


Figura 40. Porcentagem de células inflamatórias quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (média dos 6 animais) (^a letras iguais indicam valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$)).

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

Neste gráfico, pode ser verificado o aumento da porcentagem de células inflamatórias em todos os tratamentos, com destaque para o tratamento com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio; porém, devido à grande variação interindividual verificada nas respostas de cada animal, a análise estatística não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos.

Em relação às células fusiformes (Figura 41), representadas pelos fibroblastos presentes na derme, o tratamento com o fitocosmético foi, claramente, capaz de aumentar a frequência destas células, exceto no animal 3. Considerando a segurança do fitocosmético, este resultado é pouco significativo, mas, em relação à eficácia, é bastante interessante o aumento na quantidade destas células, as quais são capazes de sintetizar fibras colágenas e elásticas, responsáveis pela firmeza, elasticidade e vitalidade da pele (LAVKER, 1979). Este resultado também é interessante, quando verificamos a redução da porcentagem de células fusiformes, promovida pelo tratamento com o creme contendo peróxido de hidrogênio e o fato de que, na alternância deste tratamento prejudicial às células fusiformes, com o fitocosmético, pode ser notada a manutenção da porcentagem de células fusiformes em relação ao controle ou, até mesmo, um incremento na porcentagem destas células.

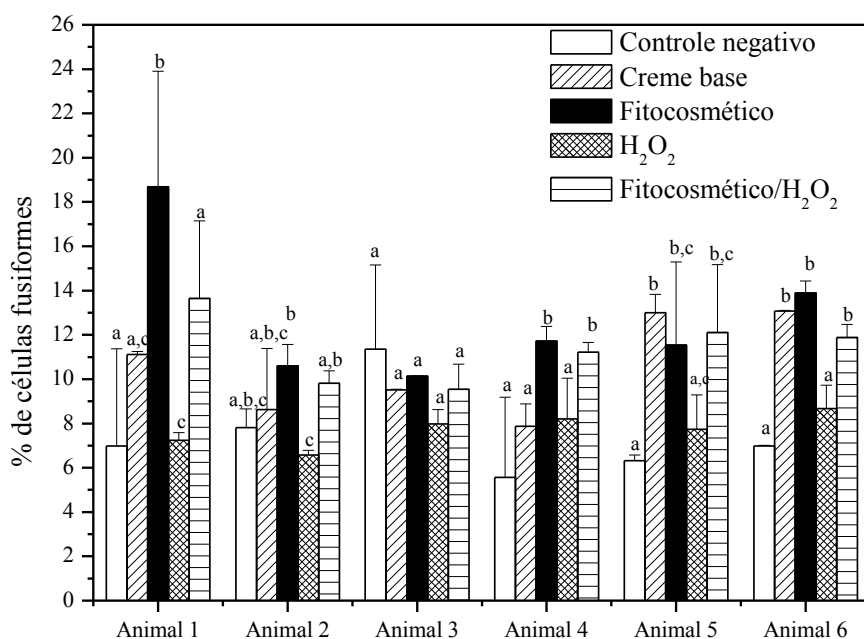


Figura 41. Porcentagem de células fusiformes quantificadas em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Finalmente, foram avaliadas, também, as fibras colágenas presentes nas biópsias (Figura 42). De maneira geral, não foi verificado nenhum perfil definido com os diferentes tratamentos.

Este parâmetro pode ser mais bem avaliado com a análise das lâminas histológicas coradas com tricrômio de Masson, que estão descritas na seção da análise de eficácia do fitocosmético.

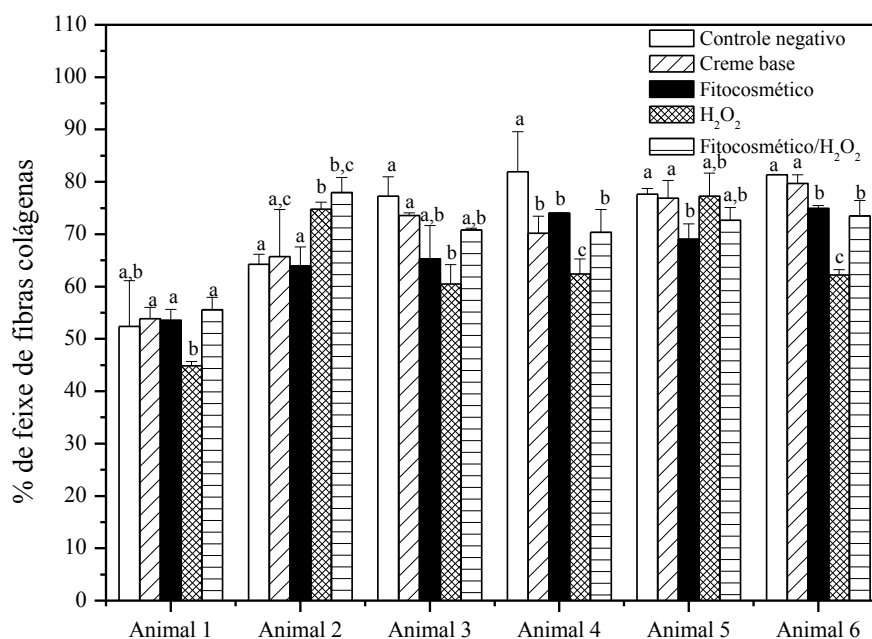


Figura 42. Porcentagem de feixes de fibras colágenas quantificados em biópsias de pele que receberam diferentes tratamentos (^{a,b,c} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Com base nos efeitos verificados nas análises histopatológicas devido ao tratamento com o fitocosmético, é possível descrever outros possíveis efeitos benéficos deste produto.

Por ser um ativo reconhecidamente antioxidante (CHIARI et al., 2012b), o fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. foi proposto para a prevenção do envelhecimento cutâneo, principalmente produzido por espécies reativas, como o que ocorre no fotoenvelhecimento.

As características histológicas da pele fotoenvelhecida são: epiderme espessada, redução da celularidade, redução do material extracelular, inflamação dérmica crônica e redução dos vasos sanguíneos cutâneos (SHAPIRO e SALIOU, 2001). Estas características, em sua grande maioria, podem ser reduzidas com o uso deste fitocosmético que, além disso, por ser antioxidante, pode ser capaz de auxiliar na prevenção dos danos oxidativos.

A redução na celularidade pode ser revertida, já que o fitocosmético promoveu estímulo à proliferação dos queratinócitos e dos fibroblastos. Provavelmente, com o uso prolongado, o estímulo aos fibroblastos contribuirá para aumento na síntese de

colágeno, promovendo melhorias em relação à espessura, firmeza e elasticidade da pele, sem contar na possível melhoria das marcas de expressão. O estímulo à proliferação dos queratinócitos resulta na descamação de queratinócitos maduros, fazendo com que a superfície cutânea tenha aspecto mais suave. Todas estas características descritas também foram previamente verificadas no tratamento com o ácido retinóico e com o retinol, substâncias derivadas da vitamina A e extensivamente utilizadas para obtenção de melhorias no aspecto de peles fotoenvelhecidas (SHAPIRO e SALIOU, 2001).

As análises *in vivo*, principalmente as histopatológicas das biópsias de pele dos animais foram realizadas para avaliar o efeito promovido pelo tratamento com extrato de *Psidium guajava* L. e, principalmente, para que, posteriormente, reunindo os resultados obtidos com metodologias *in vitro* realizadas neste trabalho, com futuros resultados a serem obtidos com culturas organotípicas, seja possível comprovar a possibilidade de substituição das metodologias utilizando animais para o estudo de segurança e eficácia produtos cosméticos e implantá-las no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Entretanto, apesar de todos estes estudos não estarem concluídos, permitindo uma análise precisa desta situação, é possível sugerir que os modelos experimentais *in vitro* não são capazes de reproduzir exatamente o que se verifica nos modelos vivos.

É claro que a Cosmetologia e a Toxicologia têm se desenvolvido amplamente, sendo obtidos, cada vez mais, resultados expressivos; porém, nenhum sistema ainda é capaz de reproduzir as interações de diferentes sistemas verificadas nos complexos organismos vivos. Um simples exemplo é o fato de que, ainda, é impossível reproduzir o sistema imunológico humano em modelos *in vitro* e, por isso, os resultados obtidos neste estudo em relação à frequência de células inflamatórias presentes na pele dos animais, não poderia ser obtida por metodologias alternativas realizadas *in vitro*.

O processo inflamatório agudo é um processo complexo que envolve as células epidermais, as células do tecido conjuntivo, os vasos sanguíneos, os leucócitos, os linfócitos e, ainda, o controle de citocinas e outros mediadores inflamatórios (MÜLLER-DECKER et al., 1994). A interação de todos estes fatores é que promove resultados como a vermelhidão e o calor, devido à dilatação dos vasos sanguíneos; o edema, devido ao aumento da permeabilidade capilar; a formação de pus, devido à invasão celular; a dor, devido à sensibilização de receptores e a hiperplasia do epitélio (MÜLLER-DECKER et al., 1994).

Neste ponto, portanto, os pesquisadores do setor cosmético vivem um dilema, uma vez que existem grandes esforços mundiais direcionados a não-utilização de animais para a avaliação da eficácia e segurança de produtos cosméticos e, por outro lado, as metodologias disponíveis ainda não são capazes de substituir o uso de animais.

Neste momento, parece ser o mais adequado utilizar todos os recursos alternativos disponíveis, visando à obtenção do perfil toxicológico mais completo possível, considerando, entretanto, as limitações destes métodos. Em casos específicos, quando a avaliação em animais for indispensável, parece adequado o *screening* prévio da substância ou produto *in vitro* e, somente com resultados satisfatórios, realizar os estudos com animais. Isto deve ser feito de maneira consciente, utilizando o conceito 3R's (*replace, reduce, refine*) introduzida por RUSSEL e BURCH, em 1959. Esta segunda alternativa é aplicável em países como o Brasil, uma vez que, em países europeus, por exemplo, o uso de animais já foi completamente banido (ADLER et al., 2010). Entretanto, o Brasil também já apresenta limitações, considerando o projeto de lei nº 777 aprovado no Estado de São Paulo.

Outra alternativa viável é que o pesquisador recorra, sempre que possível, a substâncias reconhecidamente seguras na Cosmetologia, reduzindo a possibilidade de promoção de efeitos adversos.

Em 1994, MÜLLER-DECKER et al. sugeriram o uso de queratinócitos como um modelo de estudo da liberação de mediadores inflamatórios, como uma alternativa para a substituição dos estudos de irritação *in vivo*. Esta sugestão é baseada no fato de que os queratinócitos correspondem a 95% da epiderme e agem como receptores e transdutores de sinais provenientes de estímulos exógenos. A transdução destes sinais consiste na transformação em sinais endógenos, ou seja, na liberação de mediadores pro-inflamatórios, como eicosanoides e citocinas. Além disso, os queratinócitos estimulados expressam moléculas de adesão intercelular mediando a interação com células do infiltrado inflamatório. Portanto, de acordo com MÜLLER-DECKER et al. (1994), a expressão destes sinais pelos queratinócitos pode ser considerada um parâmetro de análise de irritação *in vitro*.

Com base nestas informações, neste trabalho foi avaliada a expressão da citocina TGF- β 1 por queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) e células de hepatoma humano (HepG2) tratadas com o extrato. Estes resultados estão descritos posteriormente.

6.2. Estudos de eficácia

6.2.1. Estudos de eficácia *in vitro*

6.2.1.1. Avaliação do potencial inibidor da enzima tirosinase

A radiação ultravioleta, além de causar o fotoenvelhecimento, é capaz de causar a pigmentação da pele. A melanina é o pigmento produzido com o estímulo promovido pela luz solar e, que cada vez mais, vem sendo estudada, principalmente em relação à inibição de sua síntese, para a obtenção de benefícios no campo cosmético. Estes benefícios cosméticos são relacionados, principalmente, ao clareamento de máculas escuras que surgem com a exposição à luz solar, durante o processo de fotoenvelhecimento (BERNARD e BERTHON, 2000).

No processo de síntese da melanina, existe uma enzima, a tirosinase, reconhecida como fator chave deste processo (BERNARD e BERTHON, 2000; BAURIN et al., 2002). Age nos melanócitos e é capaz de catalisar reações de hidroxilação de compostos monofenólicos a compostos *o*-difenólicos, além de catalisar reações de oxidação de *o*-difenóis a *o*-quinonas, assim como pode ser notado na via biossintética da melanina (Figura 43) (BERNARD e BERTHON, 2000).

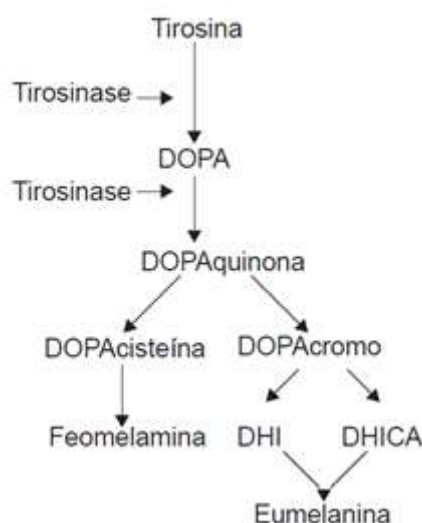


Figura 43. Via biossintética da melanina (Fonte: <http://osfilhosdalua-albinismo.blogspot.com.br/>).

Tendo em vista o importante papel da enzima tirosinase na síntese de melanina, sua inibição é uma forma de reduzir a síntese do pigmento e promover o clareamento da pele. Desta forma, no mercado cosmético são encontrados diversos produtos contendo substâncias inibidoras da tirosinase para promover o clareamento da pele. Exemplos destas substâncias são: o ácido kójico, a hidroquinona e o arbutin (KATAGIRI et al., 1998; BERNARD e BERTHON, 2000).

Apesar de serem utilizadas para esta finalidade, é sabido que estas substâncias têm efeito limitado e, em alguns casos, como a hidroquinona, podem apresentar efeitos tóxicos aos usuários (BERNARD e BERTHON, 2000). Por estes motivos, a busca por novos ativos clareadores é contínua.

A utilização de extratos vegetais tem sido proposta por muitos pesquisadores, principalmente no caso de extratos antioxidantes, que parecem, de alguma forma, inibir a enzima tirosinase, provavelmente por quelar o íon cobre presente na enzima.

Com base no exposto, o extrato de *Psidium guajava* L. foi avaliado quanto ao seu potencial inibidor da enzima tirosinase.

Os resultados demonstraram que, na maior concentração testada (16 mg/mL), o extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de inibir a síntese de melanina em, aproximadamente 70%, após 4 minutos de reação (Figura 44).

Foi verificada a redução na eficiência de inibição enzimática em função do tempo.

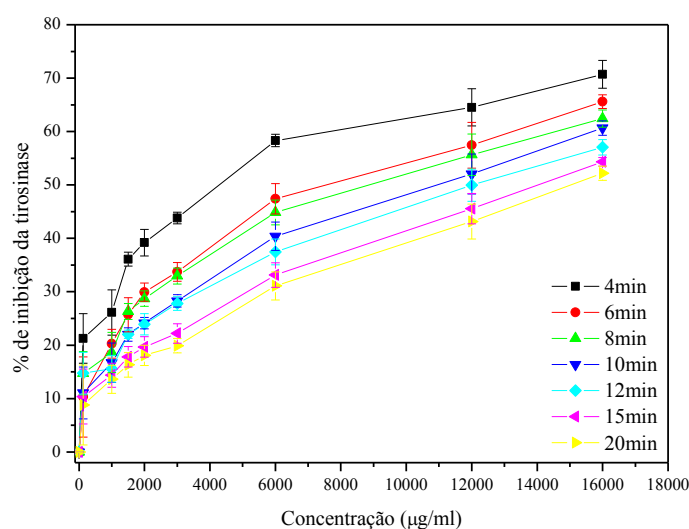


Figura 44. Porcentagem de inibição da enzima tirosinase promovida por diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L.

Este comportamento de redução da eficiência enzimática pode ser explicado como uma ocupação de todos os sítios ativos das moléculas de enzima, fazendo com que as moléculas de enzima livres para atuarem, continuem a produzir melanina, promovendo maior concentração deste pigmento no meio, com o passar do tempo.

Apesar de a inibição enzimática ser apenas parcial com o uso do extrato de *Psidium guajava* L., não se pode ignorar o efeito benéfico que pode ser obtido com o uso tópico do fitocosmético.

Em um trabalho desenvolvido por BERNARD e BERTHON (2000) o potencial inibidor da enzima tirosinase foi avaliado pelo extrato de *Morus alba*. Os autores descrevem este extrato, utilizado a 5%, como o melhor extrato vegetal em relação à atividade inibidora da tirosinase e, por isto, é até mesmo utilizado como controle positivo em estudos deste tipo (BAURIN et al., 2002). Após, aproximadamente, 13 minutos de reação, os autores descreveram inibição de 70% da enzima tirosinase. Esta porcentagem de inibição, como já descrito, foi observada após 4 minutos de reação com o extrato de *Psidium guajava* L. sendo que, em um tempo próximo aos 13 minutos, a porcentagem foi reduzida para 55%. Entretanto, é preciso considerar que a concentração de *Psidium guajava* L. foi bastante inferior à avaliada para o extrato de *Morus alba*. Se a concentração de 16 mg/mL for transformada, são obtidos 1,6%; ou seja, cerca de 3 vezes menor. Este é mais um indicativo da eficiência inibidora da enzima tirosinase apresentada pelo extrato de *Psidium guajava* L.

Comparando os resultados obtidos de inibição da enzima tirosinase com a vitamina C (utilizada como controle positivo) e com o extrato de *Psidium guajava* L., foi verificado que a vitamina C exerce este efeito de maneira mais eficiente, exibindo um IC₅₀ de $0,05 \pm 0,001$ mg/mL. Contudo, as dificuldades em utilizar a vitamina C em produtos de uso tópico são reconhecidas há tempos, principalmente devido à sua instabilidade, o que justificaria o uso do extrato de *Psidium guajava* L. para este fim.

Uma pesquisa recente, publicada no ano de 2012 também indicou a atividade inibidora da enzima tirosinase promovida pelo extrato da fruta de *Psidium guajava* L. (PUSPANINGTYAS, 2012).

Os derivados da vitamina A, como o ácido retinóico e o retinol, também são capazes de inibir a hiperpigmentação da pele devido à ação da radiação ultravioleta, o que resulta no clareamento das máculas que surgem na pele, com a exposição constante

à radiação ultravioleta (SHAPIRO e SALIOU, 2001). Este é mais um efeito semelhante ao dos derivados da vitamina A produzidos pelo extrato de *Psidium guajava* L.

Este efeito cosmético, que pode ser obtido com a inibição da síntese de melanina, é importante para a melhoria estética de diversas desordens dermatológicas provenientes do acúmulo de pigmentação da epiderme, como o melasma, as manchas senis e os danos actínicos (KIM e UYAMA, 2005).

6.2.1.2. Avaliação do potencial fotoprotetor

O estudo do perfil de absorção no ultravioleta, de soluções do extrato de *Psidium guajava* L., foi realizado para que fosse possível observar se este extrato tem a capacidade de absorver nos comprimentos de onda referentes à radiação UVA (320 a 400 nm) e UVB (290 a 320 nm), o que seria um indício da capacidade deste extrato proporcionar proteção solar quando incorporado a uma formulação cosmética.

Em um estudo desenvolvido por VIOLANTE et al. (2009) foram utilizadas soluções a 50 e 100 mg/L de extratos secos de plantas do cerrado do Mato Grosso. Entretanto, com estas concentrações não foi possível verificar o perfil de absorção do extrato etanólico de *Psidium guajava* L. Sendo assim, foram preparadas soluções a 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/mL do extrato e, ao ser realizada a varredura espectrofotométrica, foi verificada uma maior absorção do extrato na região UVB (Figura 45), sugerindo a capacidade fotoprotetora do extrato de goiaba. Além disso, esta capacidade de absorção da radiação UVB se demonstra dependente da dose, ou seja, quanto maior é a concentração da solução, maior é a absorção verificada.

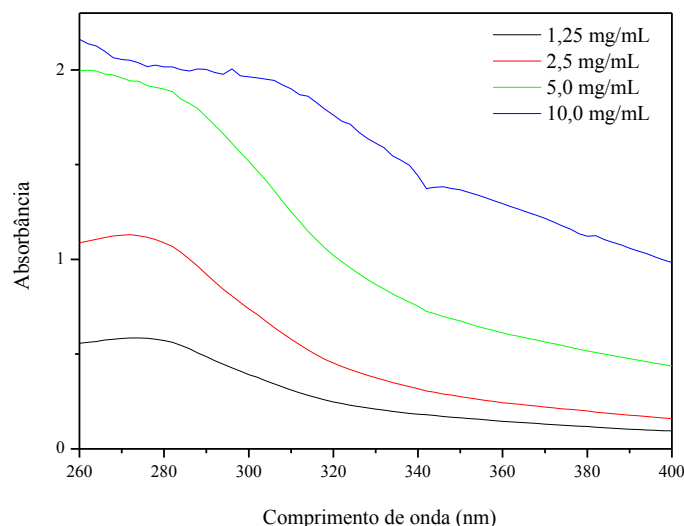


Figura 45. Perfil de absorção espectrofotométrica de soluções do extrato de *Psidium guajava* L. em diferentes concentrações.

Em seguida, foi realizada a determinação do fator de proteção solar (FPS) do creme base (CB), do fitocosmético (F), do creme base adicionado de filtro solar sintético (FS) – metoxicinamato de octila a 7,5%, e do creme base adicionado de filtro solar sintético e do extrato de *Psidium guajava* L. (FFS).

Desta forma, foi possível avaliar se o creme base, ou seja, se o excipiente não absorve nos comprimentos de onda correspondentes à radiação UVA e UVB, o que resultaria em um valor de FPS. O creme base adicionado de filtro solar sintético (FS) foi avaliado para comprovar a eficiência do método e para que fosse possível comparar este resultado com o da formulação contendo filtro solar sintético e extrato de *Psidium guajava* L. (FFS), permitindo a avaliação de um possível efeito sinérgico do filtro sintético com o extrato, ou de uma potencialização do efeito fotoprotetor do filtro sintético, pelo extrato.

A determinação do FPS foi realizada por duas metodologias: utilizando o equipamento Optometrics SPF 290, que emprega espectrofotometria de reflectância e através da metodologia descrita por MANSUR et al. (1986), que emprega espectrofotometria clássica.

O equipamento Optometrics SPF 290 fornece dados que indicam o fator de proteção máximo (FPM) da formulação analisada, em relação à faixa de comprimento de onda correspondente à radiação UVA e UVB, ou seja, de 290 a 400 nm, como

mostrado na Figura 46. Através destes valores, o equipamento calcula o valor de FPS da formulação, através das equações 1 e 2.

$$FPM = \frac{1}{T} \quad (\text{Equação 1})$$

$$FPS = \frac{\sum_{290}^{400} E\lambda.B\lambda}{\sum_{290}^{400} \frac{E\lambda.B\lambda}{FPM\lambda}} \quad (\text{Equação 2})$$

As formulações sem filtro solar sintético (CB e F) não foram capazes de absorver a radiação ultravioleta, diferentemente do ocorrido com as formulações contendo filtro solar sintético (FS e FFS) (Figura 46).

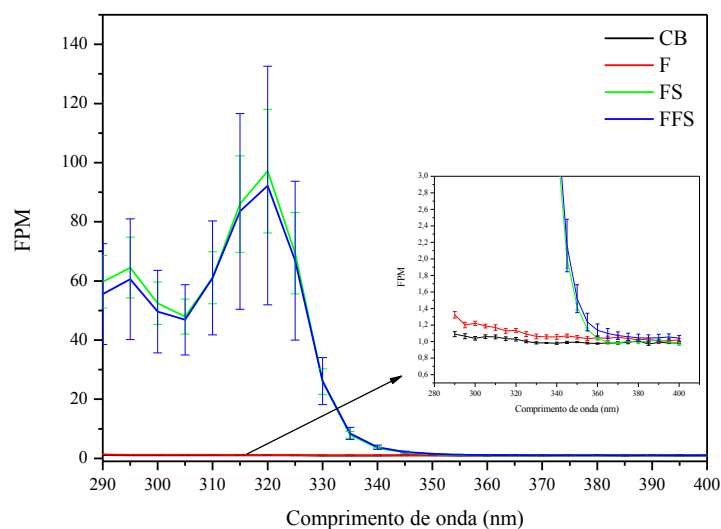


Figura 46. Fator de proteção máximo (FPM) exibido pelas formulações CB, F, FS e FFS nos comprimentos de onda de 290 a 400 nm.

Este comportamento evidenciado na Figura 46 é comprovado pelos valores de FPS obtidos pelas duas metodologias utilizadas (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de FPS das formulações mensurados por espectrofotometria clássica e de reflectância.

	Espectrofotometria clássica		Espectrofotometria de reflectância	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
CB	0,003 ^a	0,001	1,033 ^a	0,052
F	0,125 ^a	0,134	1,150 ^a	0,055
FS	13,640 ^b	1,153	13,400 ^b	0,559
FFS	13,696 ^b	1,355	13,950 ^b	1,749

^{a,b} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Foi verificado que não houve diferença estatisticamente significativa entre o CB e o F, e entre o FS e o FFS. Isso demonstra que a concentração (5%) de extrato de *Psidium guajava* L. utilizada nas formulações não foi capaz de promover fotoproteção e, também, não apresentou efeito sinérgico com o filtro solar sintético, uma vez que não aumentou o FPS da formulação contendo apenas o filtro sintético (FS). Este resultado deve ser devido à concentração do extrato utilizada, pois como mostrado no perfil espectrofotométrico do extrato (Figura 45), ele apresenta a capacidade de absorver a radiação UV, principalmente a UVB. Entretanto, a intensidade da proteção à radiação oferecida é dependente da concentração de extrato utilizada.

Apesar de não ter sido verificado efeito fotoprotetor, não se pode descartar o efeito benéfico da utilização deste extrato em preparações cosméticas, inclusive preparações fotoprotetoras, devido à atividade antioxidante que apresenta, atuando não apenas na absorção da radiação ultravioleta, mas também evitando danos oxidativos induzidos pelos radicais livres formados pela incidência desta radiação.

Além disso, este estudo contribuiu para a verificação da compatibilidade entre os resultados obtidos com a metodologia descrita por MANSUR et al. (1986) e pela metodologia empregada no equipamento Optometrics SPF 290, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos em ambas as técnicas.

6.2.1.3. Avaliação do potencial quimioprotetor

O efeito quimioprotetor do extrato de *Psidium guajava* L. foi avaliado verificando seus efeitos contra danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio. Esta forma de estudo já foi descrita previamente em células HepG2 e em outras

linhagens celulares (YANG et al., 1999; KANNO et al., 2003; BENEDÍ et al., 2004). Neste estudo, além de avaliar os efeitos em células HepG2, reconhecidamente metabolizadoras, os efeitos do extrato de *Psidium guajava* L. contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio foram avaliados em células HaCat e HDFa. As células HaCat foram mais uma vez escolhidas por serem queratinócitos e, portanto, um dos tipos celulares mais abundantes na pele e que entrariam em contato com o fitocosmético. Da mesma forma, a linhagem HDFa de fibroblastos foi escolhida por representar a linhagem celular em maior proporção na derme.

Os queratinócitos são também a primeira linhagem celular atingida pela radiação ultravioleta, pois compõem a camada mais externa da pele, a epiderme. Seria bastante válido que o extrato de *Psidium guajava* L. fosse capaz de prevenir danos oxidativos nesta linhagem celular.

Os fibroblastos, apesar de estarem localizados em uma camada mais profunda da pele, também sofrem os efeitos da radiação, reduzindo sua taxa de proliferação e reduzindo a produção de proteínas da matriz extracelular (WIROHADIDJOJO et al., 2012).

Para a avaliação do efeito protetor produzido pelo extrato de *Psidium guajava* L. aos danos oxidativos promovidos pelo peróxido de hidrogênio, foi necessário, inicialmente, avaliar o comportamento celular frente ao tratamento com diferentes concentrações desta substância (Figuras 47, 48 e 49).

Estes testes preliminares foram fundamentais para que, então, as células fossem tratadas com diferentes concentrações do extrato juntamente com uma única concentração de peróxido de hidrogênio (IC_{50}), para a avaliação do efeito quimioprotetor.

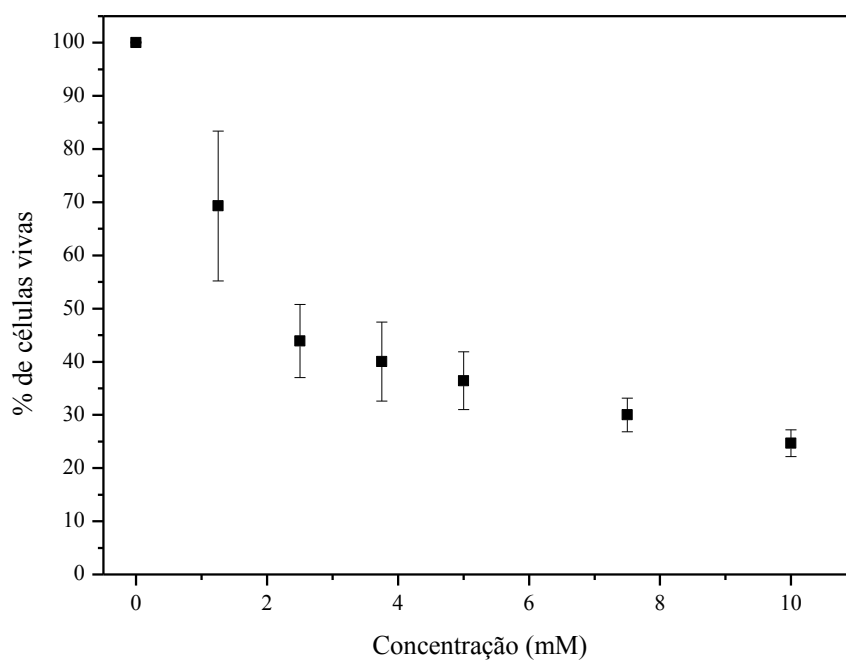


Figura 47. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HepG2.

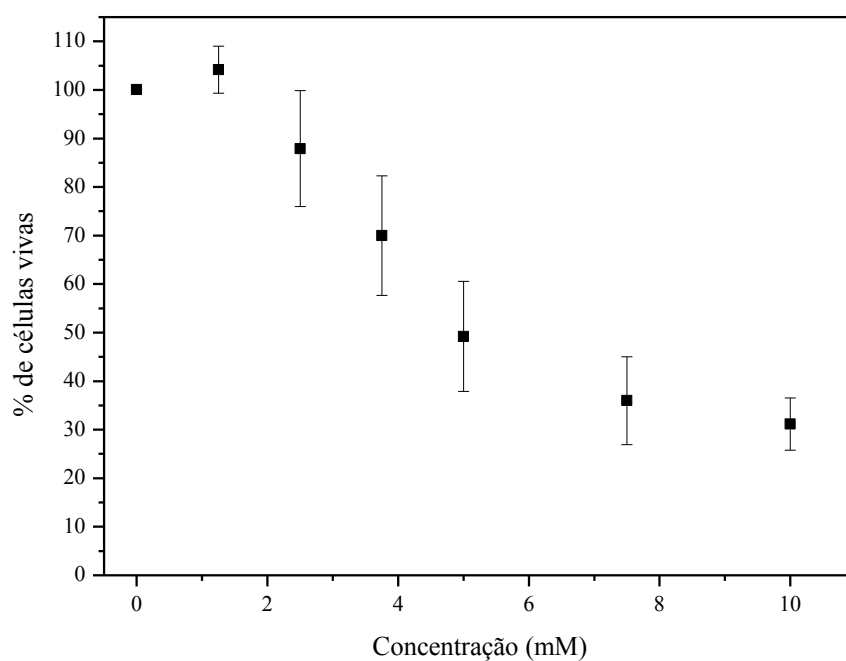


Figura 48. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HaCat.

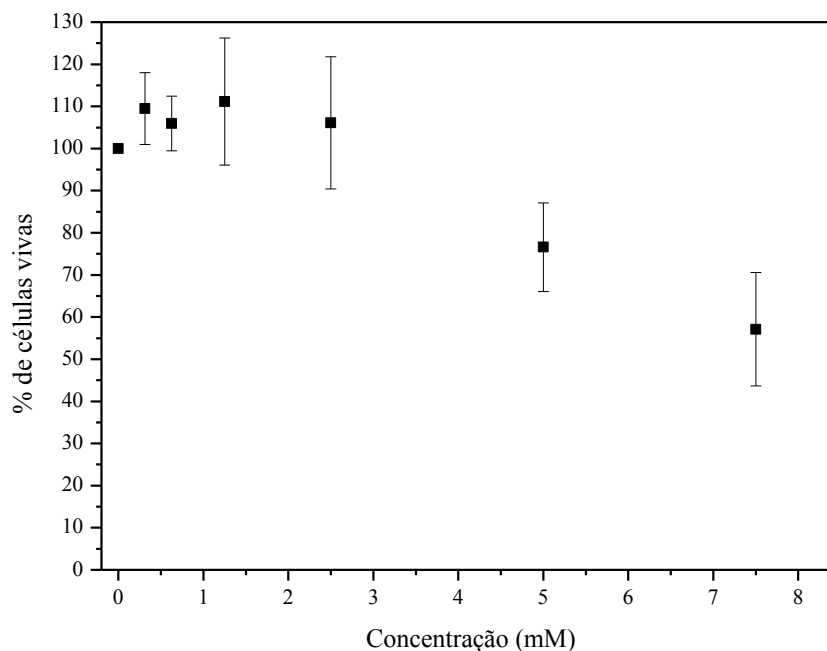


Figura 49. Avaliação da citotoxicidade promovida pelo peróxido de hidrogênio em células HDFa.

Utilizando as curvas dose *versus* resposta dos três experimentos independentes, foi realizada a regressão da porção linear da curva, sendo obtida a equação da reta. No caso dos fibroblastos, a curva precisou ser ajustada ao modelo polinomial. Em seguida, foi calculado o IC₅₀, ou seja, a concentração de peróxido de hidrogênio capaz de promover redução de 50% da viabilidade celular (Tabela 8). A concentração do IC₅₀ foi utilizada para a continuidade dos experimentos, pois é a concentração propícia para análise, que permite todos os tipos de respostas, como a prevenção do dano oxidativo, causando o aumento da viabilidade celular; a não observação de nenhum efeito, sendo mantida a viabilidade celular em torno de 50%; ou, então, um efeito oxidativo sinérgico, em que a viabilidade seria, ainda, mais reduzida.

Tabela 8. Valores de IC₅₀ dos tratamentos com peróxido de hidrogênio em cada linhagem celular.

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Média	Desvio padrão
HepG2	H ₂ O ₂ (mM)	3,14	1,53	2,14	2,27	0,81
HaCat	H ₂ O ₂ (mM)	4,51	5,36	6,71	5,52	1,11
HDFa	H ₂ O ₂ (mM)	8,69	7,44	8,65	8,26	0,71

Exp.: Experimento.

Para facilitar a continuidade dos experimentos, a concentração fixa de peróxido de hidrogênio utilizada foi de 2,5 mM para células HepG2, 5,0 mM para as células HaCat e 7,5 mM para as células HDFa, cujos valores foram aproximados a partir da Tabela 8.

A avaliação do efeito quimioprotetor foi realizada tanto no co-tratamento; ou seja, tratando as células concomitantemente com diferentes concentrações do extrato, quanto no pré-tratamento, em que as células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do extrato e, após remoção deste tratamento, foi adicionada a concentração do IC₅₀ do peróxido de hidrogênio.

Os resultados deste experimento estão apresentados nas Figuras 50 a 59. Na análise estatística destes resultados, as porcentagens de viabilidade celular obtidas foram comparadas apenas ao controle positivo. A comparação entre as concentrações não foi realizada. Com estes resultados, seria possível inferir se o extrato de *Psidium guajava* L. seria ou não capaz de prevenir o dano oxidativo promovido pelo peróxido de hidrogênio.

Além do extrato de *Psidium guajava* L. simplesmente solubilizado no meio de cultura, também foi avaliado o efeito do extrato neutralizado. Este procedimento foi realizado porque, na formulação cosmética utilizada, o extrato precisava ser neutralizado antes de ser incorporado, devido à utilização de Carbomer (Carbopol® 940), um polímero sensível a variações de pH.

O co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações do extrato não promoveu resultados satisfatórios, uma vez que nas maiores concentrações testadas a viabilidade celular foi estatisticamente igual à viabilidade celular verificada no controle positivo (Figura 50).

Entretanto, um comportamento interessante foi verificado: a menor e as duas maiores concentrações testadas resultaram em viabilidades celulares estatisticamente

iguais ao controle positivo, enquanto que concentrações intermediárias promoveram redução na viabilidade celular, em relação ao controle positivo. Isto mostra um efeito aditivo à citotoxicidade, promovida pelo peróxido de hidrogênio, provavelmente pelo fato de serem concentrações de extrato muito próximas à concentração de extrato de *Psidium guajava* L. que causa redução de 50% da viabilidade celular das células HepG2 (16,34 mg/mL).

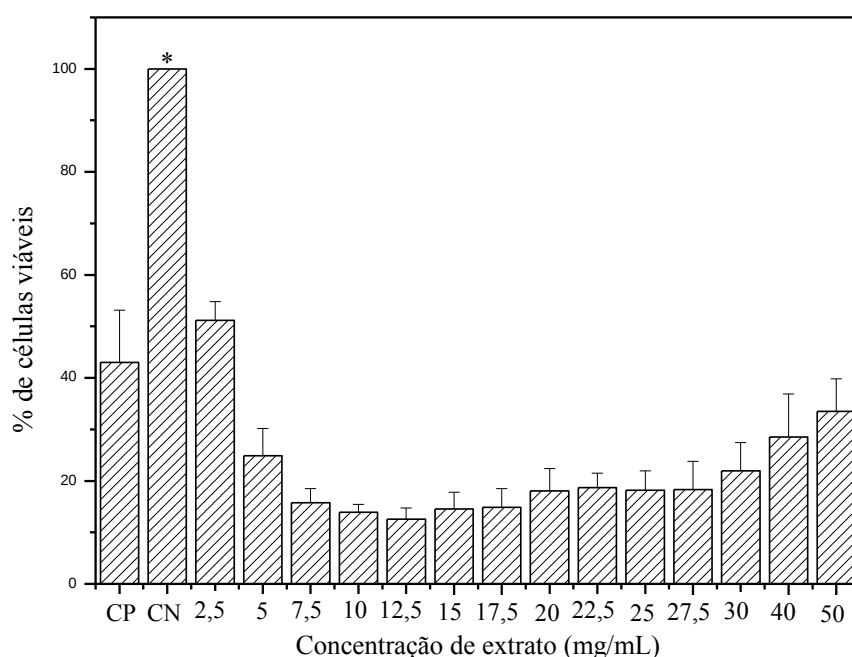


Figura 50. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

O co-tratamento com o extrato neutralizado de *Psidium guajava* L. promoveu perfil de viabilidade celular bastante semelhante ao verificado com o extrato não-neutralizado (Figura 51). Isto demonstra que, neste tratamento, a neutralização ou não do extrato não altera o perfil de proteção celular, assim como verificado na avaliação da citotoxicidade às células HepG2 e HaCat.

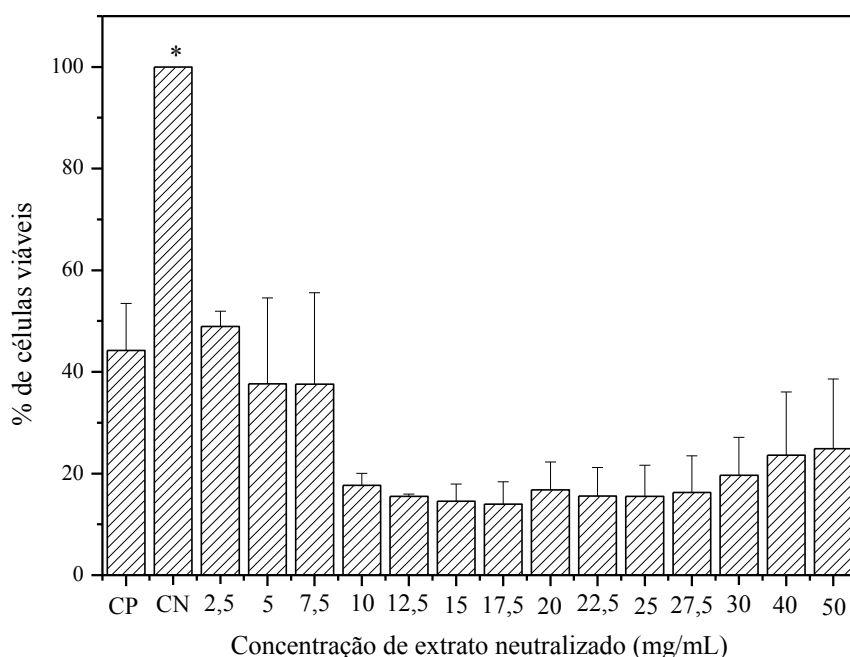


Figura 51. Co-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

De maneira surpreendente, quando as células foram tratadas inicialmente com o extrato de *Psidium guajava* L. para, após 24 horas receberem o tratamento com a concentração de peróxido de hidrogênio que promove redução de 50% da viabilidade celular, foi verificado que as quatro menores concentrações testadas (de 2,5 a 10 mg/mL) promoveram significativo aumento na viabilidade celular em relação ao controle positivo, indicando o efeito quimioprotetor do extrato de *Psidium guajava* L (Figura 52). A não ocorrência do efeito quimioprotetor a partir da concentração de 10 mg/mL também pode ser explicada pela proximidade às concentrações tóxicas do extrato frente às células HepG2.

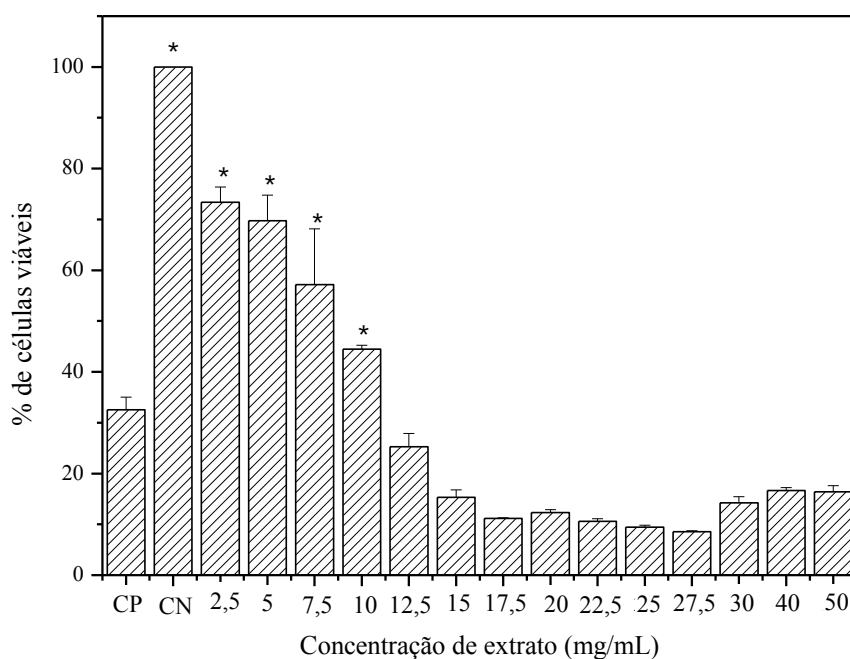


Figura 52. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

Mais uma vez, o efeito verificado pelo pré-tratamento com a solução neutralizada do extrato de *Psidium guajava* L. apresentou efeito bastante semelhante ao verificado com a solução não-neutralizada (ácida) do extrato (Figura 53). Entretanto, o efeito quimioprotetor foi verificado até a concentração de 5 mg/mL.

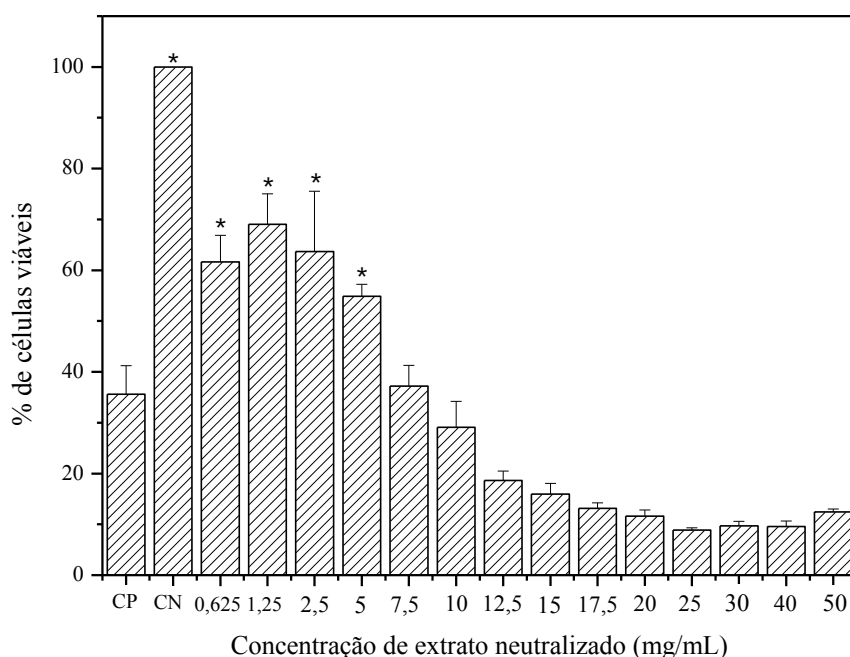


Figura 53. Pré-tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 2,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

Em seguida, as mesmas análises foram repetidas para as células HaCat e, para esta linhagem celular, os resultados mais expressivos foram verificados no co-tratamento e nas concentrações mais elevadas, inclusive consideradas citotóxicas no tratamento independente com o extrato de *Psidium guajava* L.

Além disso, apesar da Figura 54 mostrar apenas os resultados da análise estatística realizada entre o controle positivo e os outros tratamentos, uma análise mais detalhada foi realizada, comprovando que, entre a concentração de 50 mg/mL e o CN não há diferença estatística, demonstrando que esta concentração foi capaz de inibir 100% dos efeitos deletérios, promovidos pelo tratamento com peróxido de hidrogênio, às células HaCat.

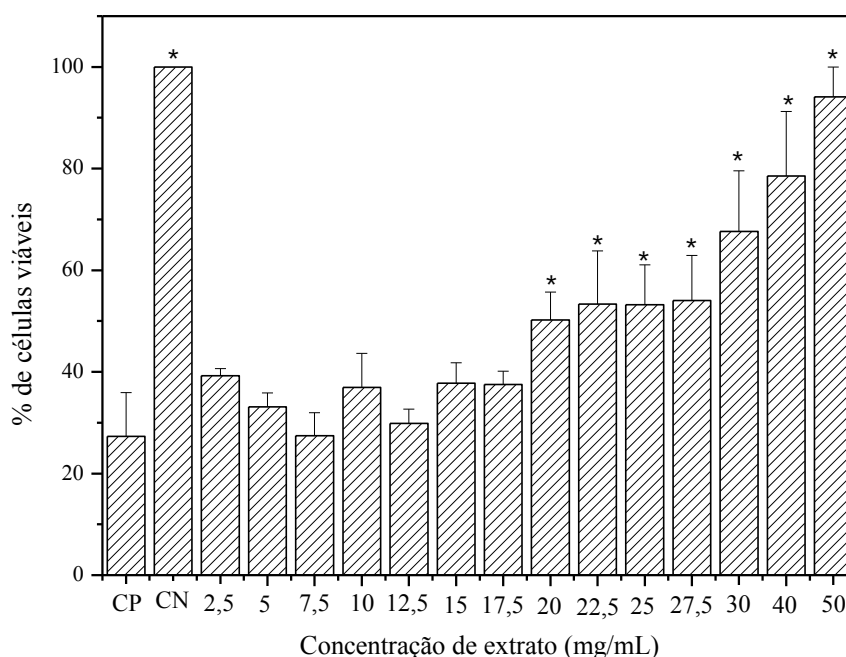


Figura 54. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

Outro fato observado foi que, no tratamento dos queratinócitos, o extrato neutralizado perdeu seu efeito quimioprotetor verificado no extrato não-neutralizado (Figura 55).

Isto pode ter ocorrido devido à neutralização de algum componente do extrato de *Psidium guajava* L. que, provavelmente, perdeu sua eficácia quando o pH foi alterado.

De acordo com a análise estatística realizada para o co-tratamento das células HaCat, com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L., apenas as concentrações 20; 22,5 e 27,5 mg/mL apresentaram valores estatisticamente diferentes do CP, indicando efeito quimioprotetor. Entretanto, este efeito é bastante discreto, se comparado ao resultado observado para o tratamento com o extrato não neutralizado; e, estatisticamente, os resultados de todos os tratamentos são diferentes do CN.

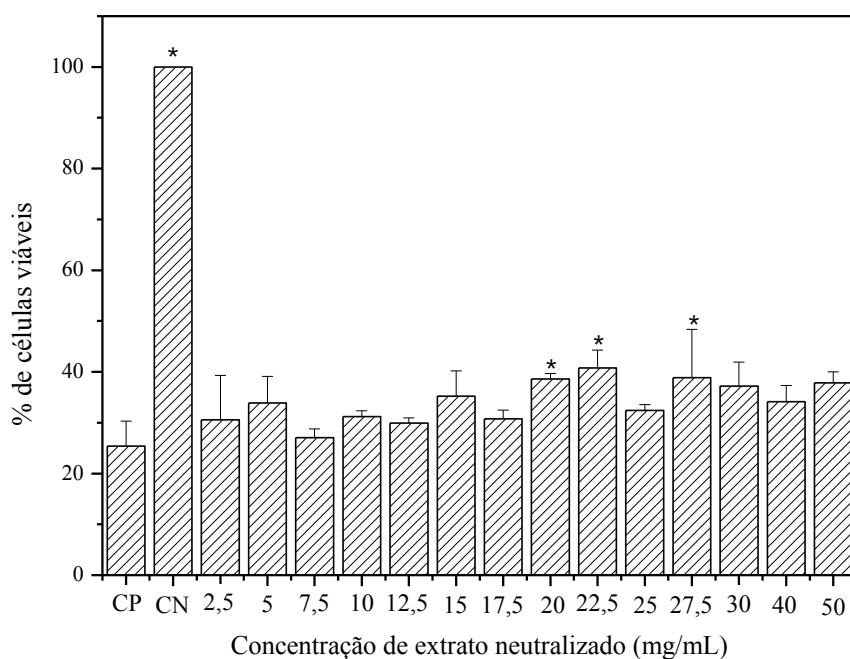


Figura 55. Co-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

No pré-tratamento com o extrato, foi obtido resultado significativo apenas na maior concentração testada, 50 mg/mL, que ofereceu resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores ao CP, porém diferente do CN (Figura 56).

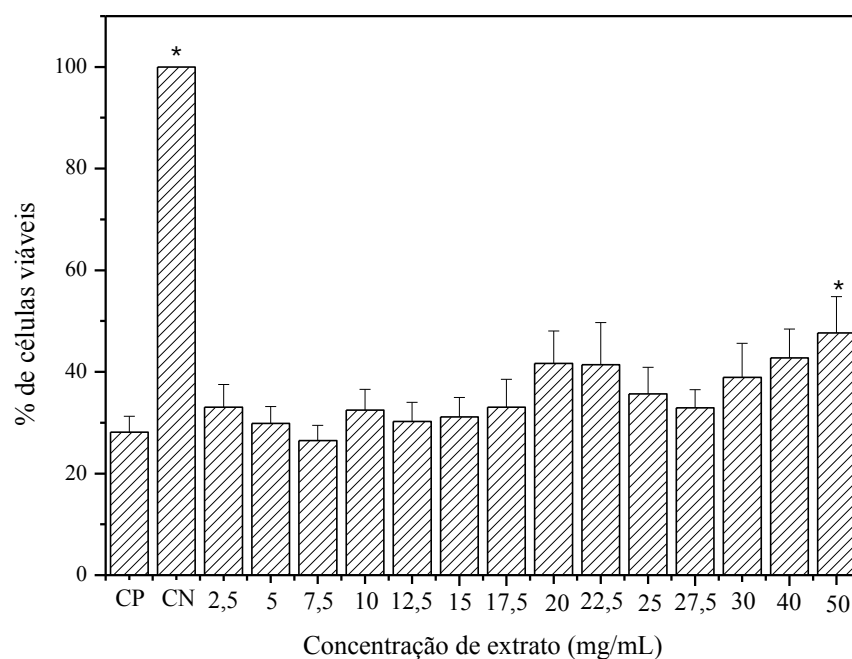


Figura 56. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

Finalmente, o pré-tratamento com o extrato neutralizado não promoveu efeitos significativos no aumento da viabilidade celular, quando comparados ao CP (Figura 57).

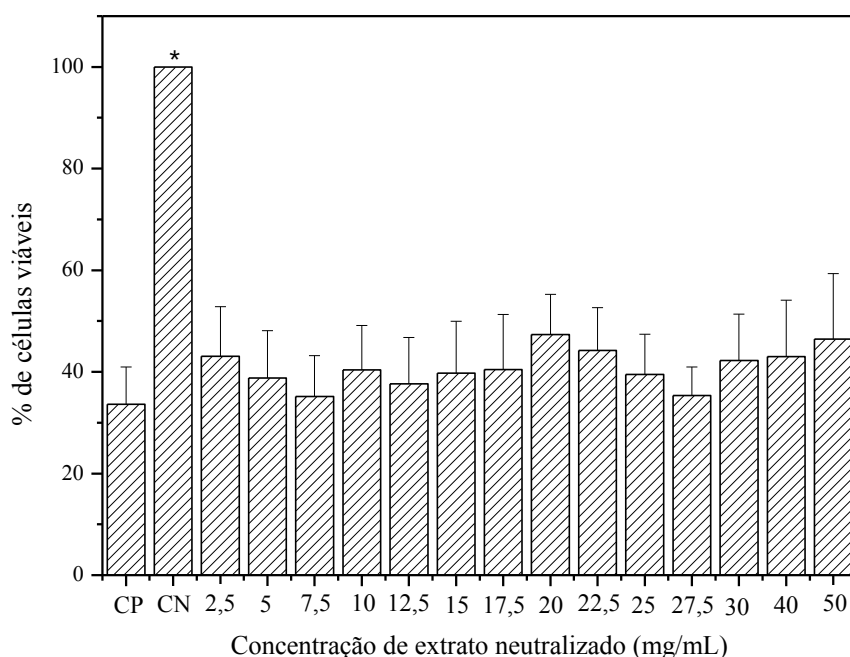


Figura 57. Pré-tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 2,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 5,0 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

O mesmo procedimento foi realizado com as células HDFa (Figuras 58 e 59) e os resultados demonstraram que, tanto o tratamento com o extrato não neutralizado quanto com o extrato neutralizado, promoveram discretos efeitos de prevenção da morte celular ocasionada pelo tratamento com o peróxido de hidrogênio. Entretanto, no caso do tratamento com o extrato não neutralizado, este efeito foi verificado nas duas maiores concentrações testadas (40 e 50 mg/mL), enquanto que, para o extrato neutralizado, isto foi verificado na menor concentração utilizada (2,5 mg/mL).

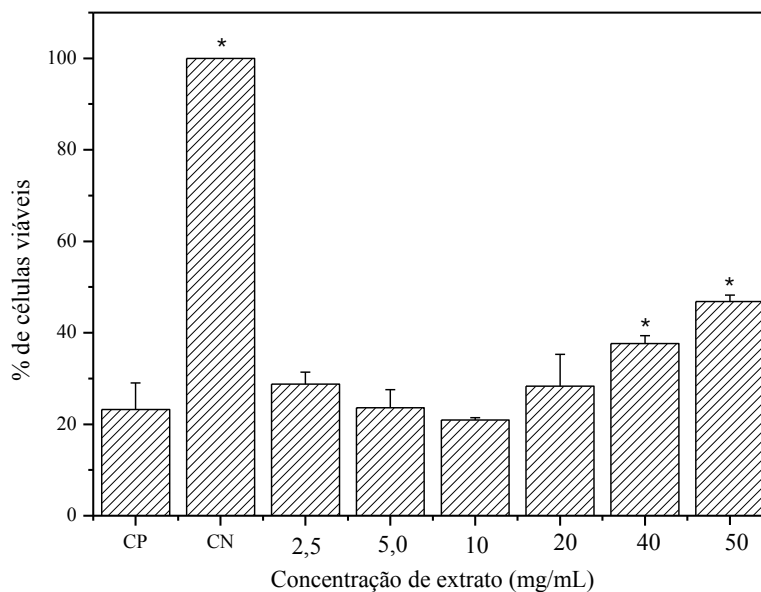


Figura 58. Co-tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de extrato de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 7,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 7,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

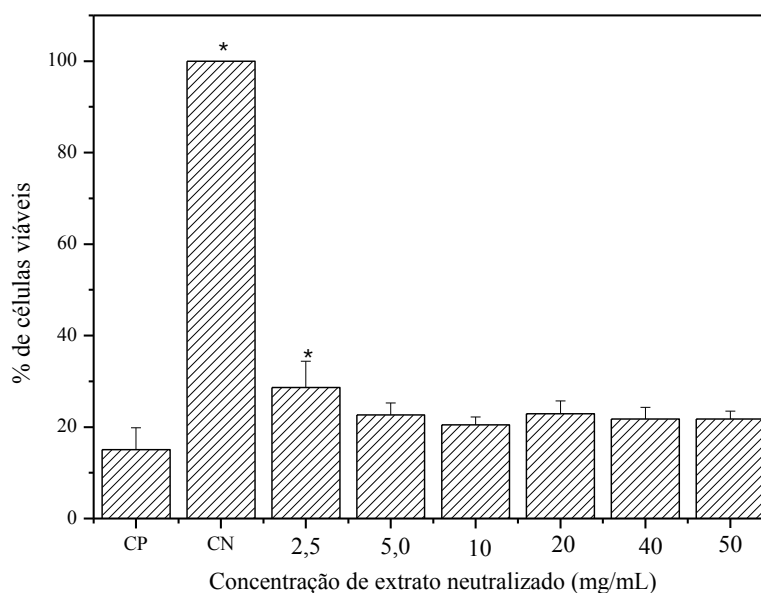


Figura 59. Co-tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de extrato neutralizado de *P. guajava* L. e peróxido de hidrogênio a 7,5 mM (CN: tratamento com meio de cultura, CP: tratamento com peróxido de hidrogênio a 7,5 mM) (* valores estatisticamente superiores ao controle positivo - CP ($p < 0,05$)).

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de promover efeitos quimioprotetores nas três linhagens celulares testadas, HepG2, HaCat e HDFa. Entretanto, no caso das células HepG2, o tratamento com concentrações baixas realizado previamente ao contato com o agente indutor de danos oxidativos (peróxido de hidrogênio) foi mais significativo do que o tratamento concomitante e com concentrações elevadas. Por outro lado, para as células HaCat, o resultado mais expressivo foi verificado no tratamento concomitante e em elevadas concentrações, que foi capaz de inibir 100% dos danos oxidativos, causados pelo peróxido de hidrogênio, que promovem redução na viabilidade celular.

No caso das células HDFa só foi avaliado o co-tratamento, sendo que o tratamento com o extrato promoveu efeito quimioprotetor nas maiores concentrações testadas, enquanto que o extrato neutralizado promoveu efeito de quimioprevenção na menor concentração avaliada.

Apenas com estes resultados não é possível inferir o motivo destas diferenças e nem a forma como o extrato promove este efeito quimioprotetor; porém, de maneira simplista, este efeito deve ser atribuído à atividade antioxidante exibida por este extrato, capaz, portanto, de neutralizar os efeitos oxidativos lesivos do peróxido de hidrogênio.

Como continuidade destes estudos, os efeitos do extrato de *Psidium guajava* L. na indução e prevenção da apoptose celular foram avaliados como uma tentativa de auxiliarem na elucidação do mecanismo de ação deste extrato no efeito quimioprotetor. Estes resultados estão descritos a seguir.

6.2.1.4. Avaliação do potencial antimutagênico

Além da avaliação do efeito quimioprotetor, o potencial de inibição de efeitos mutagênicos também foi avaliado. Este ensaio teve por objetivo verificar se o extrato de *Psidium guajava* L. seria capaz de evitar a ocorrência de mutações no material genético celular, quando células são expostas a agentes ambientais mutagênicos.

O ensaio foi realizado de maneira bastante semelhante ao teste de Ames para estudo da mutagenicidade diferindo, apenas, na adição do agente mutagênico concomitantemente ao tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.

A porcentagem de inibição da mutagenicidade foi calculada através da seguinte equação:

$$\%InM = \left[\frac{n^{\circ} \text{ revertentes } CP - n^{\circ} \text{ revertentes } AMOSTRA}{n^{\circ} \text{ revertentes } CP} \right] * 100$$

Em que *n° revertentes CP* é número de colônias revertentes obtidas com o tratamento do controle positivo (agente mutagênico); *n° revertentes AMOSTRA* é número de colônias revertentes obtidas com o tratamento da amostra.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Considerando que porcentagens de inibição da mutagenicidade inferiores a 25% de inibição não devem ser consideradas como efeito antimutagênico; entre 25 e 45%, o efeito antimutagênico é considerado moderado e, acima de 40%, o efeito antimutagênico é considerado forte (NEGI et al., 2003; LIRA et al., 2008), foi possível constatar que o extrato promoveu efeito antimutagênico moderado apenas para o tratamento da cepa TA100.

Tabela 9. Atividade antimutagênica, sem ativação metabólica, expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e a porcentagem de inibição da mutagenicidade (%InM) promovida pelo controle positivo.

TA 97a			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	%InM
CN	117,33	28,04	-
1,595 + CP	830,00	226,12	5,68
3,19 + CP	949,33	164,21	-
6,38 + CP	737,33	186,60	16,21
12,76 + CP	753,33	44,06	14,39
25,52 + CP	954,66	255,36	-
CP	880,00	176,51	-
TA 98			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	%InM
CN	20,33	2,31	-
15,66 + CP	1925,33	324,40	-
31,325 + CP	1532,67	87,00	-
62,65 + CP	1509,33	340,57	1,22
125,3 + CP	1416,00	159,80	7,33
250,6 + CP	1421,33	140,07	6,98
CP	1528,00	237,72	-
TA 100			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	%InM
CN	129,00	17,10	-
7,83125 + CP	2024,00	11,31	5,24
15,6625 + CP	2296,00	441,23	-
31,325 + CP	1626,67	339,16	23,84
62,65 + CP	1781,33	275,43	16,60
125,3 + CP	1525,33	245,32	28,59
CP	2136,00	298,15	-
TA 102			
Tratamentos (mg/placa)	Média	Desvio padrão	%InM
CN	518,67	43,47	-
7,83125 + CP	2469,33	74,33	-
15,6625 + CP	2914,67	256,66	-
31,325 + CP	2761,33	212,58	-
62,65 + CP	2349,33	325,78	-
125,3 + CP	2557,33	1063,08	-
CP	1765,33	560,59	-

CN: controle negativo

CP: controle positivo

Apesar de em muitos tratamentos a porcentagem de inibição da mutagenicidade ter sido inferior a 25%, se associado ao efeito quimioprotetor verificado na prevenção dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio às células HepG2, HaCat e HDFa é possível que, em usos prolongados do extrato de *Psidium guajava* L., como na

utilização preventiva de um fitocosmético, resultados ainda mais promissores sejam obtidos.

KITTIWANNACHOT et al. (2008) avaliaram o efeito antimutagênico, induzido por radiação UVA e UVB, de extratos vegetais hidroetanólicos. Dentre os extratos avaliados, estava o extrato das folhas de goiaba. Para isto, uma adaptação do teste de Ames foi empregada. Os resultados demonstraram que o extrato foi capaz de inibir a mutação produzida por estas radiações. Considerando que, como citado por KITTIWANNACHOT et al. (2008), a penetração de radiação através da pele pode ser capaz de causar mutações gênicas, o que se acredita ser um primeiro passo para o desenvolvimento de câncer, o extrato das folhas de goiabeira poderia agir como quimioprotetor.

Este resultado, unido aos resultados obtidos no presente estudo, incentiva a realização de novos ensaios, visando à avaliação da prevenção da mutagenicidade promovida pela radiação ultravioleta com o uso do extrato da fruta de *Psidium guajava* L.

Apesar de ter sido verificado efeito antimutagênico fraco (<25%) em algumas dos tratamentos e moderado (>25%) com um dos tratamentos, resultados mais promissores eram esperados. Esta expectativa foi baseada nos resultados de quimioprevenção e de atividade antioxidante satisfatórios obtidos, que foram correlacionados com informações da literatura, que sugerem que compostos antioxidantes são capazes de inibir mutações e câncer, justamente devido à capacidade de sequestrar radicais livres ou de induzir enzimas antioxidantes (HOCHSTEIN e ATALLAH, 1988).

Contudo, em outros estudos, como o realizado por NEGI et al. (2003) esta correlação não foi verificada. Estes autores avaliaram a atividade antioxidante e antimutagênica de extratos vegetais de romã e notaram que o extrato mais antioxidante exibiu o menor potencial antimutagênico, enquanto que o extrato menos antioxidante apresentou maior potencial antimutagênico. Esta comparação de atividades demonstra que, não apenas a atividade antioxidante é suficiente para verificação de efeitos antimutagênicos. NEGI et al. (2003) sugere que os diferentes efeitos antimutagênicos foram devidos à variação na composição de polifenóis e outros compostos bioativos.

Outro dado interessante encontrado na literatura é proveniente do trabalho de BALA e GROVER (1989). Estes autores avaliaram o potencial antimutagênico de extratos cítricos, assim como dos ácidos cítrico e ascórbico, em cepas de TA100, tendo

a azida sódica como mutágeno. Verificaram que, na concentração máxima testada, o ácido ascórbico foi capaz de inibir apenas 13,58% da mutagenicidade, enquanto que, quando testado na mesma concentração, porém com pré-incubação do mutágeno com o ácido ascórbico, esta porcentagem de inibição foi elevada para 73,08%. Possivelmente, o resultado observado no presente estudo poderia ser melhorado realizando pré-incubações dos mutágenos com as diferentes massas do extrato de *P. guajava* L.

O ácido ascórbico já foi descrito em outros trabalhos como uma substância antimutagênica (SHAMBERGER, 1984; KADA et al., 1986). Talvez, esta seja uma das substâncias que compõem o extrato da goiaba capaz de oferecer o efeito antimutagênico. KADA et al. (1986) ainda descreve o ácido ascórbico como um desmutágeno, ou seja, uma substância capaz de inibir a ação de mutágenos oxidantes, como epóxidos e compostos nitro.

Não são encontrados estudos na literatura sobre o efeito antimutagênico de extratos da fruta de *Psidium guajava* L. São encontrados estudos realizados com outras partes da planta, como folhas e galhos. O efeito antimutagênico em cepas de TA100 foi, em 2013, descrito por KANG et al., que avaliou o extrato dos galhos de *Psidium guajava* L. Estes autores verificaram o máximo de 78% de inibição da mutagenicidade em cepas de TA100, promovidas pela 2-antramina, com ativação metabólica.

6.2.1.5. Análise da atividade antioxidante pelo método da enzima superóxido dismutase (SOD-like activity)

Este ensaio é utilizado para determinação da atividade antioxidante de substâncias. Primordialmente, é um método empregado para a determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), uma das mais importantes enzimas antioxidantes, capaz de transformar os íons superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que é convertido pela enzima catalase em oxigênio e água (UKEDA et al., 1999).

Desta forma, este ensaio permite a determinação da atividade também de materiais semelhantes à SOD (*SOD-like materials*), ou seja, capazes de sequestrarem o ânion superóxido e de impedir a formação dos cristais de formazana de WST-1, reduzindo a coloração observada e, portanto, a absorbância da reação colorimétrica (UKEDA et al., 1999).

Através dos valores de absorvância mensurados após a reação entre as diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L., solução de xantina oxidase (capaz de gerar a formação de ânions superóxido) e WST (sal transformado em cristal de formazana colorido, solúvel em água, após reação com ânions superóxido), foram calculadas as porcentagens de inibição da formação do cristal de formazana em relação às diferentes concentrações do extrato.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 60. Como pode ser notado, concentrações crescentes do extrato promoveram porcentagens de inibição maiores do cristal de formazana. Isto demonstra que o extrato de *P. guajava* L. é capaz de agir como a importante enzima antioxidante, superóxido dismutase.

Além disso, foi possível calcular, através do ajuste da curva a um modelo polinomial, o valor do IC₅₀. Foi constatado que a concentração de extrato de *P. guajava* L. necessária para inibir a formação de 50% dos cristais de formazana de WST-1, ou seja, para inibir a formação de 50% dos ânions superóxido é de $0,1904 \pm 0,0039$ mg/mL.

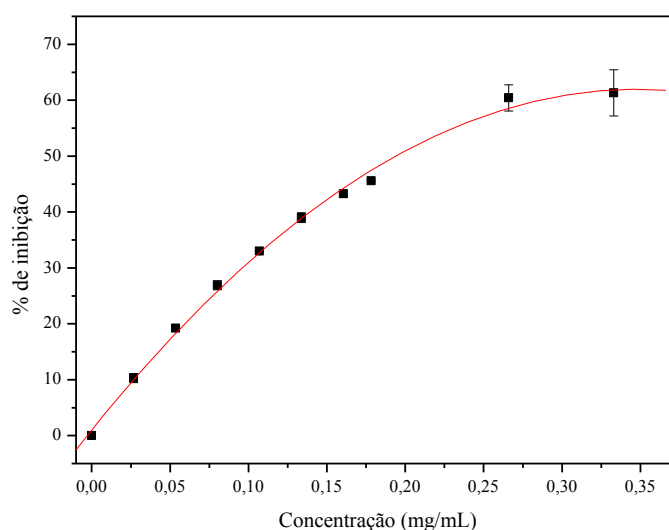


Figura 600. Porcentagem de inibição da formação dos cristais de formazana de WST-1 por diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava* L.

Este valor é ainda menor que o obtido para o ensaio com o radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), em que 0,29056 mg/mL do extrato de *Psidium guajava* L. foram requeridos para inibir 50% destes radicais livres em solução (CHIARI et al., 2012b).

6.2.1.6. Análise da produção de colágeno em células HDFa

Os fibroblastos são uma linhagem celular que se encontra na derme, capazes de produzir diferentes proteínas da matriz extracelular, como é o caso do colágeno. Estas proteínas apresentam função de oferecer sustentação e elasticidade à pele e estão em menor quantidade na pele envelhecida e danificada por fatores exógenos, como o sol.

É sabido que a radiação proveniente do sol é capaz de inibir a proliferação normal dos fibroblastos, além de estimular a expressão de metaloproteinases de matriz, o que estimula a degradação do colágeno. Estes efeitos têm sido considerados como os responsáveis pela indução do envelhecimento precoce da pele pela radiação UVB (YAMAUCHI et al., 1988; CHUNG et al., 2001; MENTER et al., 2003; WIROHADIDJOJO et al., 2012).

Desta forma, fibroblastos da linhagem HDFa foram escolhidos para este estudo, com o intuito de verificar o efeito do tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L. na indução da produção de colágeno, como uma alternativa à melhoria do aspecto da pele envelhecida, inclusive pelo sol, em que há carência destas fibras.

A curva analítica utilizada para a determinação das concentrações de colágeno tipo I produzidas pelos fibroblastos está apresentada na Figura 61.

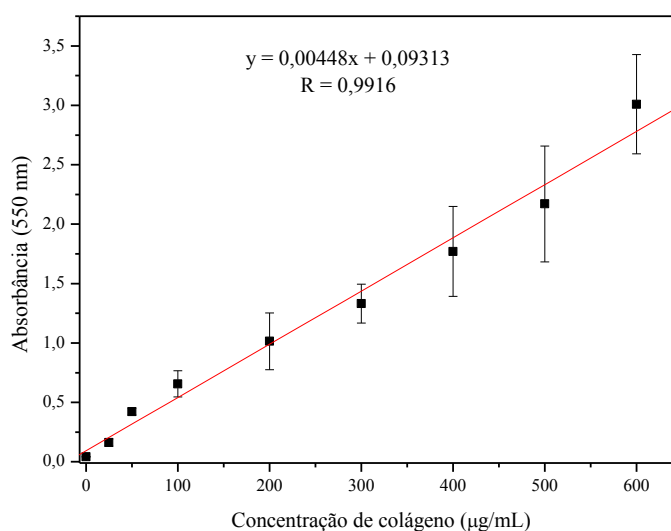


Figura 611. Curva analítica da concentração de colágeno (µg/mL) *versus* a absorbância (550 nm).

O tratamento, mais uma vez, foi realizado com o extrato e com o extrato neutralizado de *Psidium guajava* L., na tentativa de identificar algum prejuízo às atividades do extrato devido ao processo de neutralização.

Tanto o tratamento com o extrato quanto com o extrato neutralizado promoveram incremento na concentração de colágeno produzido pelas células HDFa (Figuras 62 e 63), o que indica o extrato de *Psidium guajava* L. como uma alternativa para indução da biossíntese de colágeno na derme. Para ambos os tratamentos, a indução foi marcante em concentrações superiores a 10 mg/mL, mas, no caso do extrato não neutralizado, diferença estatisticamente significativa já foi observada desde o tratamento a 5 mg/mL.

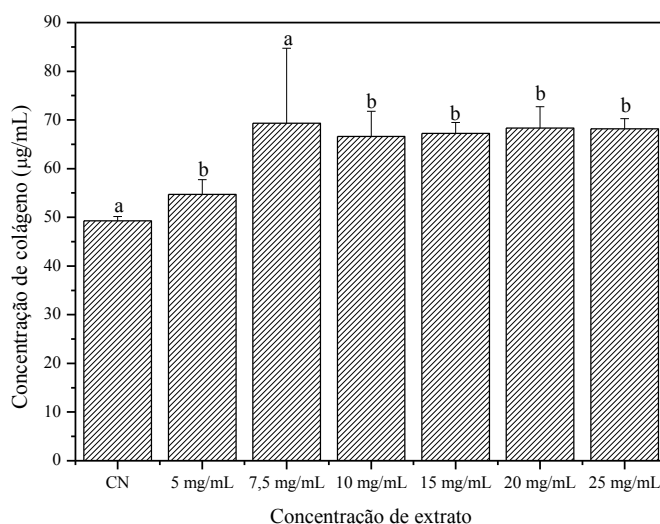


Figura 62. Produção de colágeno em células HDFa após tratamento com extrato de *Psidium guajava* L. (análise estatística dos tratamentos em relação ao controle negativo - CN) (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

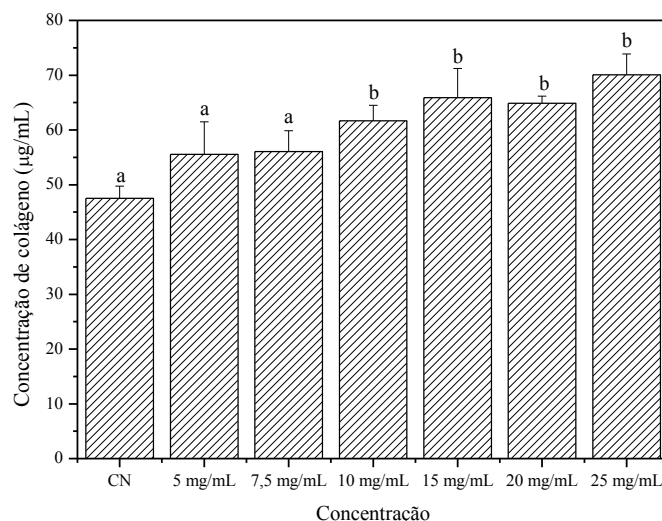


Figura 63. Produção de colágeno em células HDFa após tratamento com extrato neutralizado de *Psidium guajava* L. (análise estatística dos tratamentos em relação ao controle negativo - CN) (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Também foi avaliado o perfil de produção de colágeno por estes fibroblastos tratados com diferentes concentrações do peróxido de hidrogênio (Figura 64). Apesar de ter sido notada redução na concentração de colágeno produzida em relação ao controle negativo, os valores não se mostraram significativamente diferentes, de acordo com a análise estatística. Isto provavelmente ocorreu devido ao desvio padrão elevado observado entre as repetições do experimento.

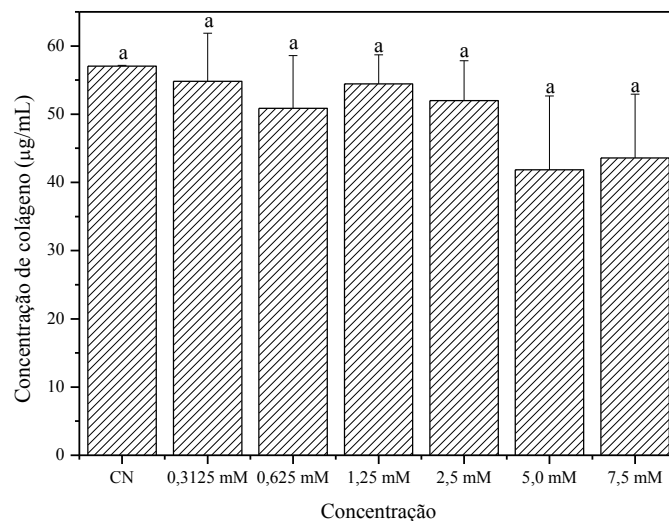


Figura 64. Produção de colágeno em células HDFa após tratamento com peróxido de hidrogênio (análise estatística dos tratamentos em relação ao controle negativo - CN) (^a letras iguais indicam valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$)).

6.2.2. Estudos de eficácia *in vivo*

6.2.2.1 Análises histopatológicas

As Figuras de 65 a 69 são imagens representativas das biópsias coradas com Tricrômio de Masson.

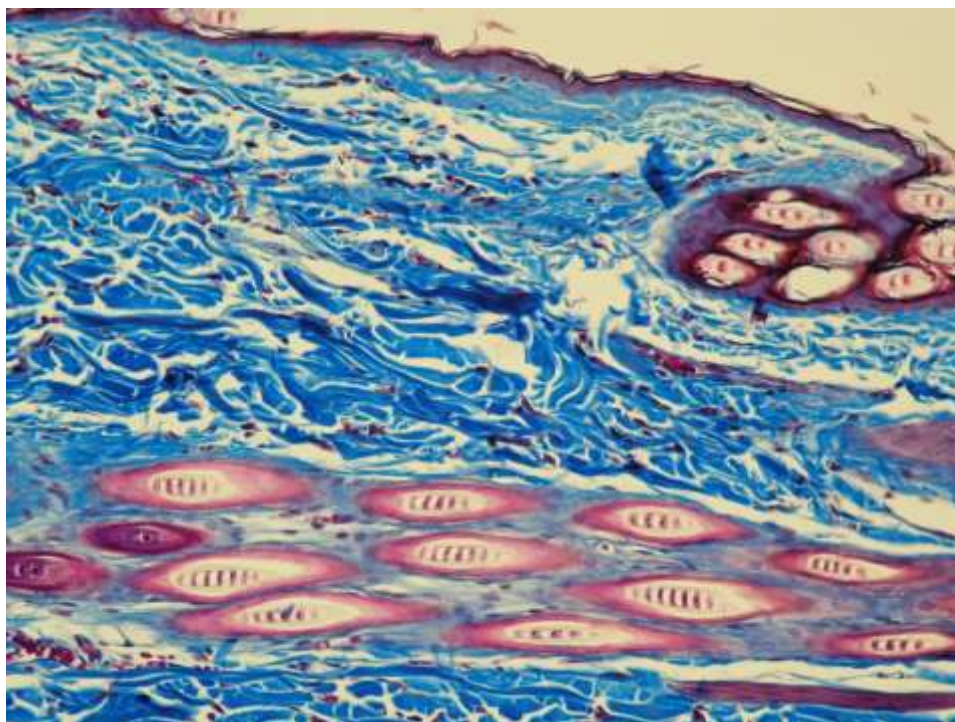


Figura 65. Fotomicrografia de corte histológico corado com tricrômio de Masson de biópsia de pele sem tratamento (controle negativo) (aumento de 200 vezes).

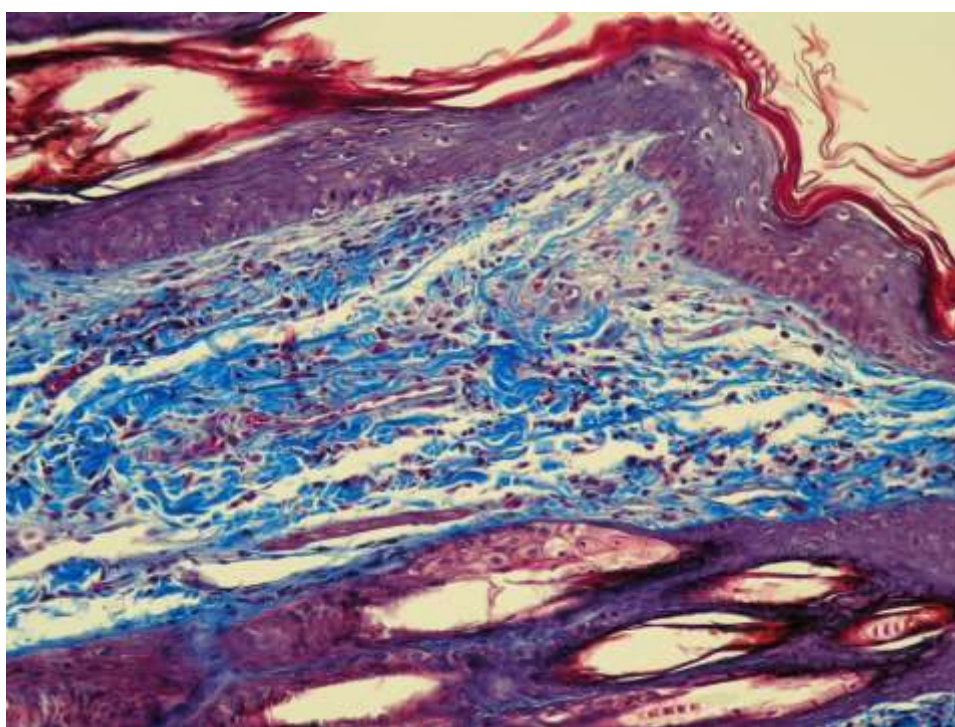


Figura 66. Fotomicrografia de corte histológico corado com tricrômio de Masson de biópsia de pele tratada com o creme base (aumento de 200 vezes).

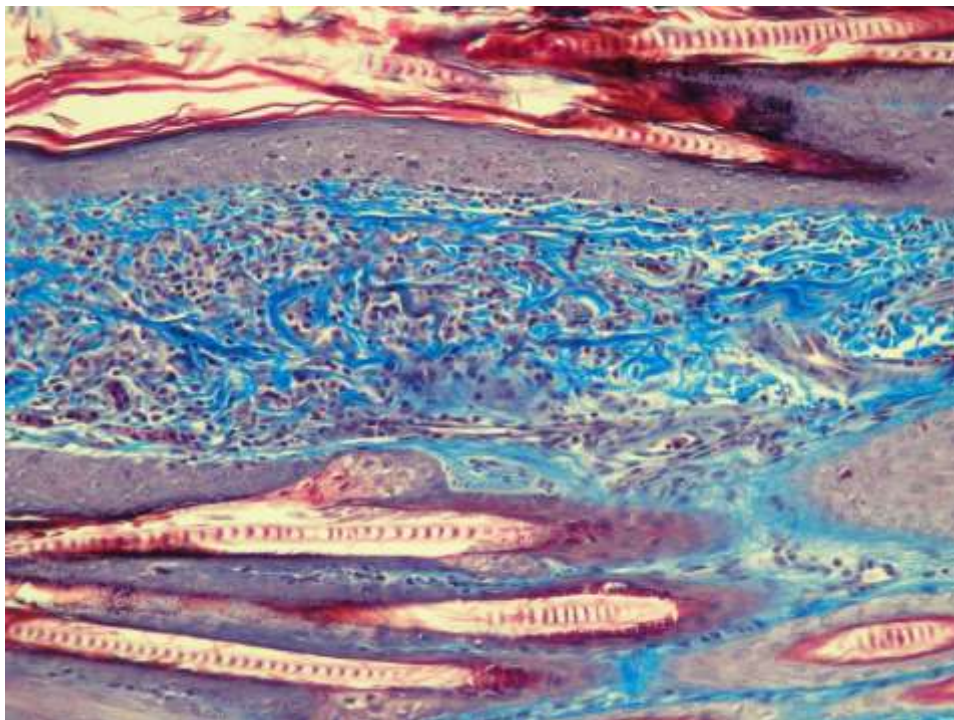


Figura 67. Fotomicrografia de corte histológico corado com tricrômio de Masson de biópsia de pele tratada com o fitocosmético (aumento de 200 vezes).

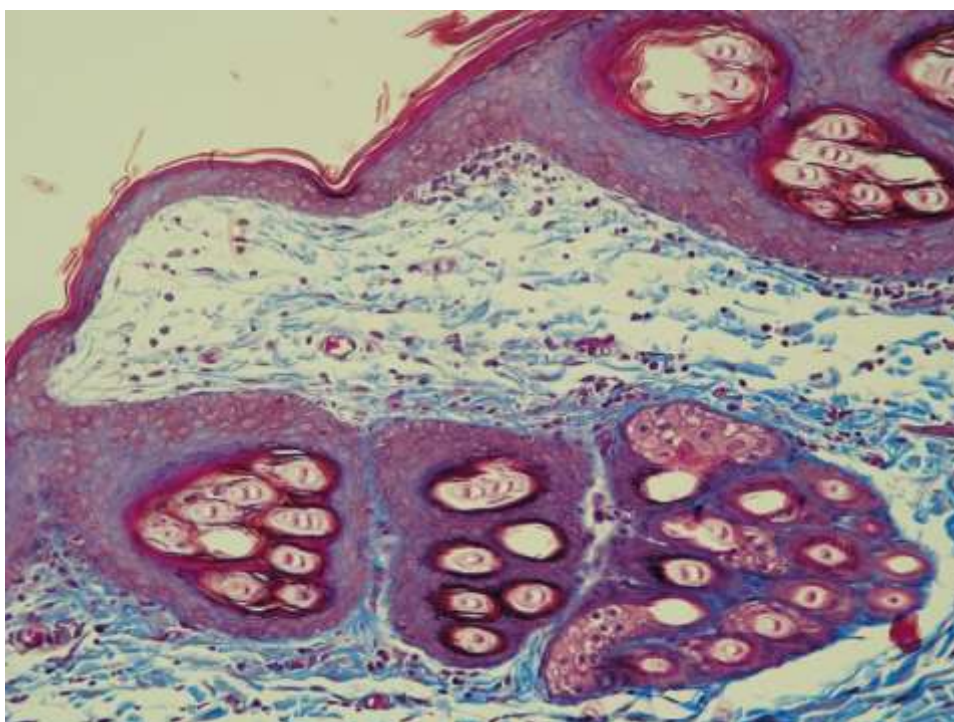


Figura 68. Fotomicrografia de corte histológico corado com tricrômio de Masson de biópsia de pele tratada com creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio (aumento de 200 vezes).

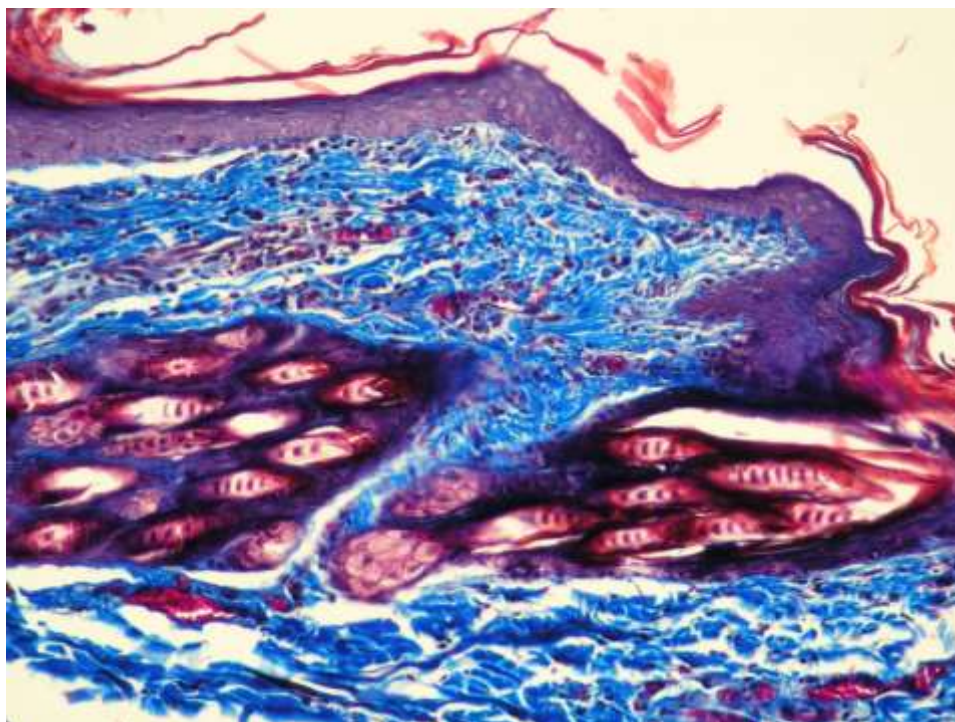


Figura 69. Fotomicrografia de corte histológico corado com tricrômio de Masson de biópsia de pele tratada alternadamente com fitocosmético e creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio (aumento de 200 vezes).

A análise das fotomicrografias revelam resultados bastante semelhantes aos verificados na coloração com hematoxilina-eosina, em relação à espessura da epiderme, presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos, confirmando os resultados anteriormente descritos. Contudo, o interesse na análise com este tipo de coloração é a verificação das fibras colágenas, identificadas nas biópsias pela coloração azul intenso.

O resultado mais marcante observado é a rarefação das fibras colágenas no tratamento com o creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio (Figura 68) e a redução desta rarefação, quando o tratamento com o creme contendo peróxido de hidrogênio é alternado com o tratamento com o fitocosmético (Figura 69). Isto demonstra a capacidade de prevenção dos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio, nas fibras colágenas da derme, por meio da ação do extrato.

Nesse sentido, também pode ser notado que entre o controle negativo (biópsias sem tratamento), o tratamento com o creme base e com o fitocosmético, há pouca diferença em relação à densidade de fibras colágenas. Visualmente, é possível inferir que, talvez, o fitocosmético tenha promovido estímulo à biossíntese destas fibras devido

à presença de menos espaços vazios na biópsia, o que indicaria maior densidade de fibras; contudo, na análise estereométrica, este resultado não se confirmou.

Mais uma vez, a análise foi realizada com o auxílio da régua quadriculada, com a contagem das estruturas existentes sob os 100 pontos de intersecção da régua (estereometria) e os resultados desta contagem estão apresentados nas Figuras 70 e 71.

A estereometria das lâminas coradas com tricrômio de Masson revelou que, apesar das variações existentes entre os animais, de maneira geral, não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de fibras colágenas verificadas nas áreas de pele que não receberam tratamento, nas tratadas com o creme base e tratadas com o fitocosmético (Figura 69). Entretanto, é possível notar uma tendência de aumento na porcentagem de fibras colágenas nas áreas tratadas com o fitocosmético, o que fica claro no animal 1.

Contudo, o resultado mais expressivo e de grande importância verificado foi que, claramente, o peróxido de hidrogênio promoveu rarefação das fibras colágenas e este efeito foi evitado no tratamento alternado com o fitocosmético.

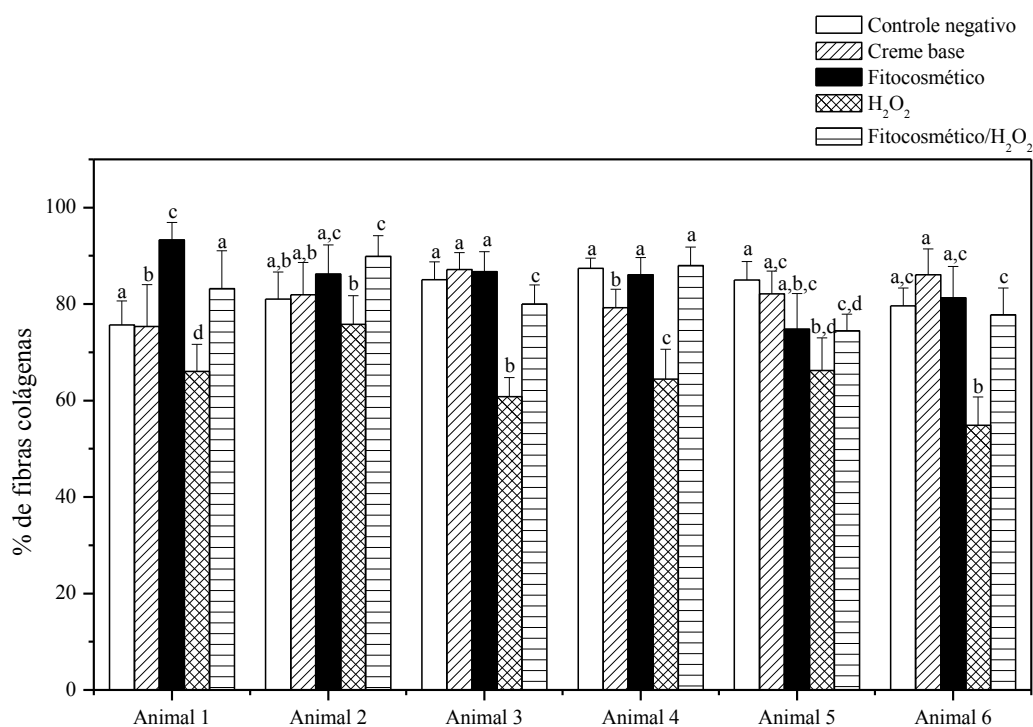


Figura 70. Porcentagem de fibras colágenas verificadas nas biópsias de pele sem tratamento (Controle negativo), tratadas com o creme base, com o fitocosmético, com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e alternadas entre o fitocosmético e o peróxido de hidrogênio, em cada um dos animais avaliados (^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Este resultado fica ainda mais claro quando se observa o gráfico da Figura 71, em que está apresentada a média de todos os animais para cada tratamento.

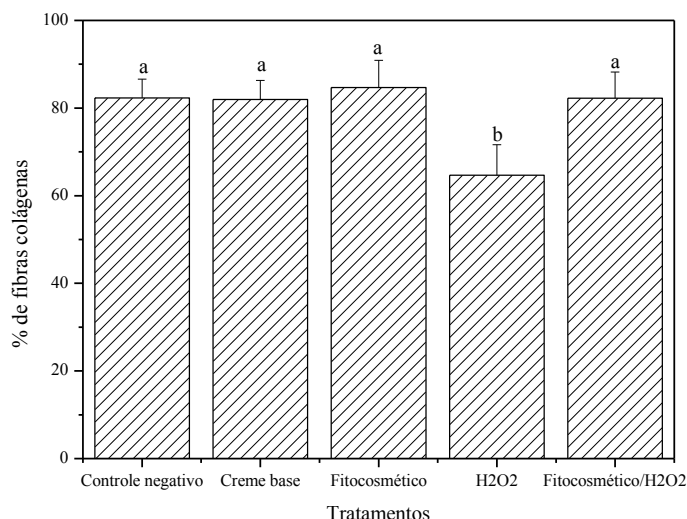


Figura 71. Porcentagem média de fibras colágenas verificadas nas biópsias de pele sem tratamento (Controle negativo), tratadas com o creme base, com o fitocosmético, com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e alternadas entre o fitocosmético e o peróxido de hidrogênio (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Diversas hipóteses podem ser sugeridas para explicar o efeito de redução da rarefação das fibras colágenas, causado pelo peróxido de hidrogênio. Uma delas poderia ser o fato de o extrato de *Psidium guajava* L., por ser antioxidante, ter neutralizado o efeito oxidativo do peróxido de hidrogênio, impedindo a degradação das fibras de colágeno já existentes na derme (HAWKINS e DAVIES, 1997). Outra possibilidade seria o fato de o extrato de *Psidium guajava* L. ser capaz de estimular a biossíntese de colágeno, como sugerido através dos resultados do animal 1 e das fotomicrografias, verificado nos resultados da quantificação da biossíntese de colágeno em células HDFa tratadas com o extrato e quantificado na estereometria das lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Neste caso, apesar de ocorrer a degradação do colágeno pelo peróxido de hidrogênio, simultaneamente pode ter havido estímulo à sua biossíntese, fazendo com que a rarefação das fibras não fosse observada. Ainda é possível que os dois mecanismos tenham ocorrido simultaneamente.

Unindo os resultados da análise histopatológica das biópsias de pele tratadas com creme contendo 5% de peróxido de hidrogênio com os resultados do tratamento das células HDFa, é possível sugerir que o peróxido de hidrogênio não promova influências diretas na produção do colágeno mas, sim, na sua degradação após sua

biossíntese. Estudos demonstram que espécies oxidantes são capazes de degradar o colágeno (HAWKINS e DAVIES, 1997). Desta forma, provavelmente, o tratamento de apenas 24 horas realizado nas células HDFa não tenha sido suficiente para promover este efeito de degradação das fibras.

6.3. Estudos das respostas celulares frente ao tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.

6.3.1. Avaliação do perfil de produção de TGF- β 1

“Citocinas são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância” (VARELLA e FORTE, 2001).

Neste trabalho foi avaliada a expressão de citocinas TGF- β 1 em células HepG2 e HaCat.

O TGF- β ou *Transforming Growth Factor* β é uma citocina com diversas funções, capaz de regular uma variedade de eventos em células e tecidos. Dentre os eventos regulados por TGF- β podem ser citados: proliferação, diferenciação e migração celular, angiogênese, inflamação e resposta imune, eventos estes que são regulados de maneiras diferenciadas dependendo das células alvo que estão sob seu controle (DERYNCK, 1994; HAN et al., 2013).

Esta citocina apresenta três isoformas, sendo que o TGF- β 1 é a predominante na maioria dos tecidos, inclusive na pele (HAN et al., 2013).

Nas células predominantes na pele, queratinócitos e fibroblastos, o TGF- β exibe efeitos diversos. Nos queratinócitos promove inibição da proliferação, enquanto que, nos fibroblastos, o efeito promovido é o estímulo à proliferação (DERYNCK, 1994; HAN et al., 2013).

Nas células epiteliais, portanto em queratinócitos, o TGF- β promove o bloqueio na fase G1 do ciclo celular, promovendo inibição do crescimento, como foi comprovado por HANNON e BEACH (1994) em células HaCat (DERYNCK, 1994).

Em fibroblastos, o TGF- β induz a expressão de fatores de crescimento endógenos, como o PDGF (*platelet-derived growth factor*) e o EGF (*epidermal growth*

factor). Desta forma, induz a síntese de proteínas de matriz celular, como é o caso do colágeno (DERYNCK, 1994).

É sabido também que o TGF- β promove influências sobre células do sistema imunológico, como linfócitos, macrófagos e células dendríticas, sendo que este fato tem recebido atenção por ser uma forma de permitir o estudo de doenças em modelos experimentais (LETTERIO e ROBERTS, 1998).

No presente estudo, uma curva analítica foi preparada, a partir do mesmo procedimento realizado no tratamento das células, para verificação da absorbância emitida por diferentes concentrações de TGF- β 1 (Figura 72).

A regressão linear da curva obtida demonstrou que o valor de R foi superior a 0,99 e que, através da equação $y = 0,0002x + 0,0906$ é possível calcular a concentração de TGF- β 1 produzida pelas células HepG2 e HaCat após tratamento com o extrato de *P. guajava* L.

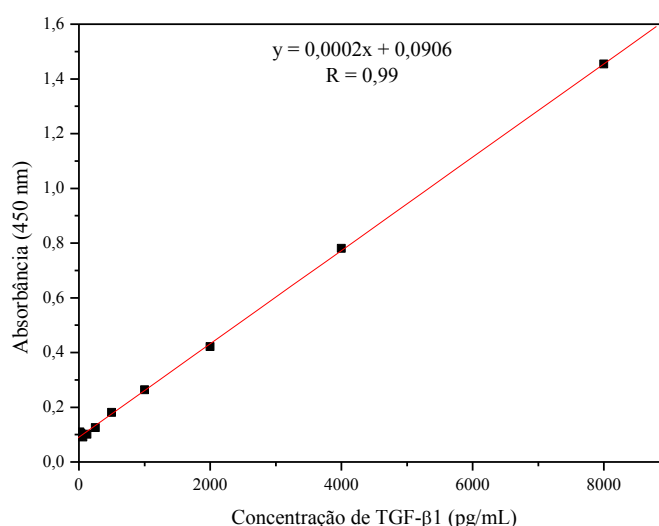


Figura 622. Curva analítica da absorbância a 450 nm *versus* a concentração de TGF- β 1 (pg/mL).

Os resultados obtidos demonstraram que, no tratamento das células HepG2, em concentrações não citotóxicas (5 mg/mL) do extrato de *Psidium guajava* L., a expressão da citocina foi estatisticamente igual à expressão basal (CN- controle negativo), mas que, quando houve o aumento destas concentrações, atingindo concentrações que promovem de 50% ou mais de redução da viabilidade celular, a concentração de TGF-

$\beta 1$ diminuiu, igualando-se à concentração produzida no tratamento com concentrações citotóxicas (IC_{50}) de peróxido de hidrogênio (CP) (Figura 73).

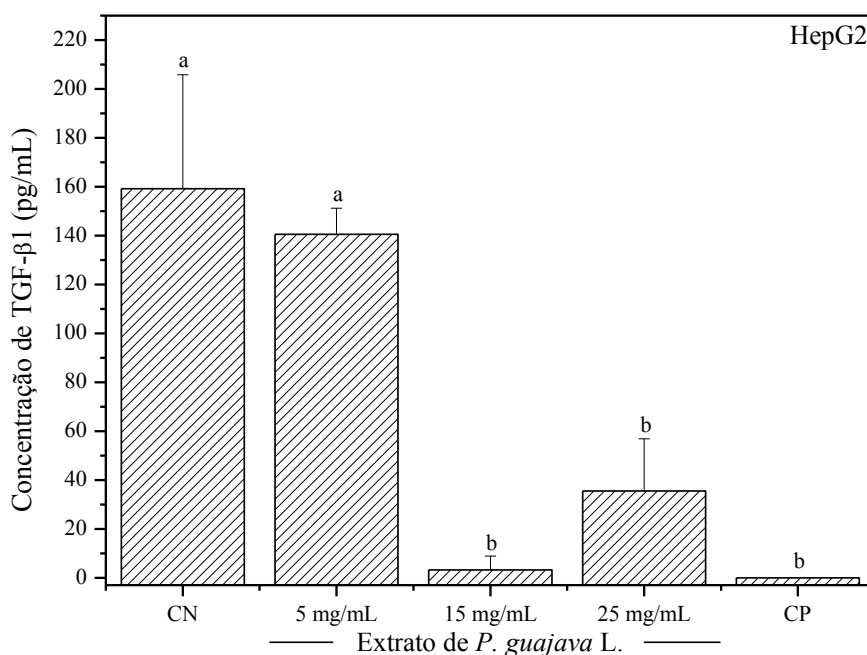


Figura 633. Expressão de TGF- $\beta 1$ em células HepG2 tratadas com o extrato de *P. guajava* L (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

De maneira interessante, quando o tratamento foi realizado com o extrato neutralizado, os resultados foram divergentes do anterior. No tratamento das células HepG2, em concentrações não citotóxicas (5 mg/mL) do extrato neutralizado de *Psidium guajava* L. a expressão da citocina foi estatisticamente inferior à expressão basal (CN- controle negativo) e igual ao CP mas, quando houve o aumento destas concentrações, atingindo concentrações que promovem de 50% ou mais de redução da viabilidade celular, a concentração de TGF- $\beta 1$ aumentou, igualando-se novamente à concentração produzida no CN (Figura 74).

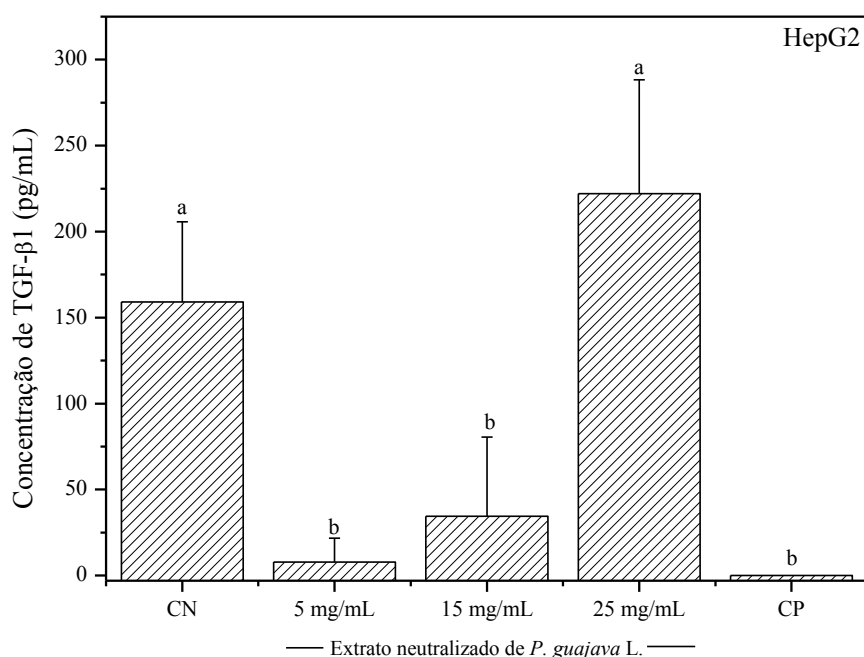


Figura 644. Expressão de TGF-β1 em células HepG2 tratadas com o extrato neutralizado de *P. guajava* L. (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

No caso do tratamento das células HaCat (Figuras 75 e 76), os resultados foram muito semelhantes aos obtidos nos tratamentos das células HepG2. A concentração não citotóxica do extrato (5 mg/mL) manteve a expressão basal da citocina, que diminuiu com o aumento da concentração de extrato (25 e 30 mg/mL), tornando-se citotóxica, assim como no tratamento com o peróxido de hidrogênio (CP) e reduzindo os níveis de expressão desta citocina.

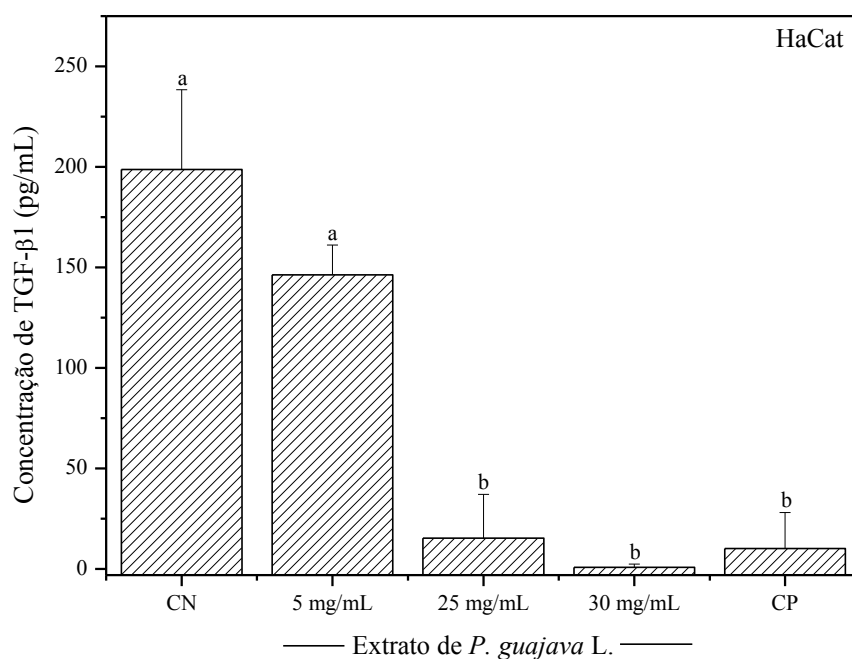


Figura 75. Expressão de TGF-β1 em células HaCat tratadas com o extrato de *P. guajava* L (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Contudo, no tratamento das células HaCat com o extrato neutralizado (Figura 76), o perfil foi diferenciado, demonstrando que a neutralização do extrato promoveu alterações em seu comportamento, em relação à expressão de citocinas.

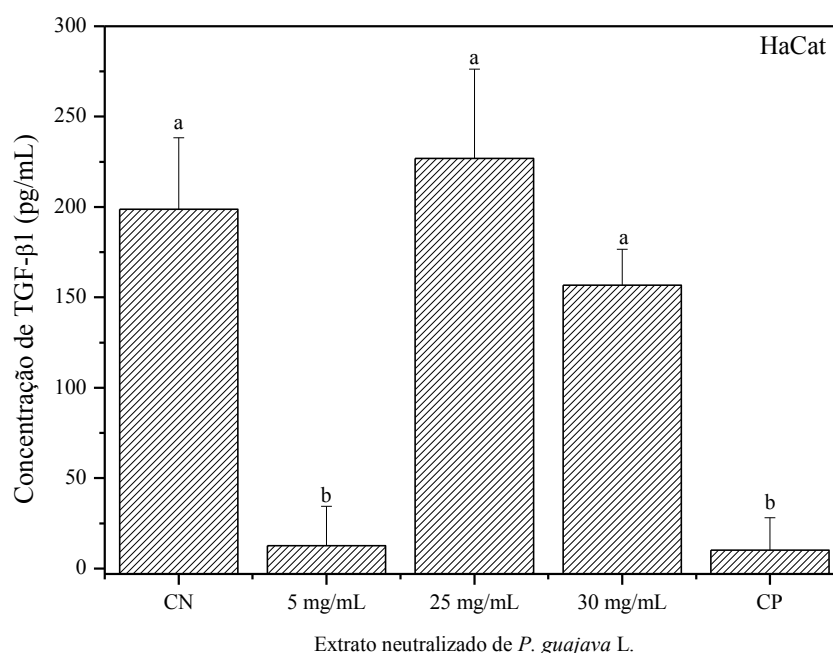


Figura 76. Expressão de TGF-β1 em células HaCat tratadas com o extrato neutralizado de *P. guajava* L. (^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)).

Apesar de dados da literatura demonstrarem que o TGF-β1 está correlacionado com a proliferação de queratinócitos (inibição) e de fibroblastos (estimulação), no presente estudo não foi possível encontrar uma correlação entre a expressão de TGF- β1 e o estímulo causado à produção de colágeno promovido pelo extrato de *Psidium guajava* L., que foi verificado no tratamento das células HDFa seguida de coloração com o corante vermelho Sirius, porque a produção basal (CN) de TGF- β1 não foi ultrapassada (superexpressão) com nenhum dos tratamentos realizados neste estudo, ou seja, foram mantidas em concentração igual ou menor ao controle negativo e, portanto, não promoveriam diferença significativa à proliferação de fibroblastos ou síntese de colágeno, em relação ao controle negativo.

Além disso, neste mesmo experimento realizado com as células HDFa para verificação do estímulo à produção de colágeno, não foi notada diferença significativa entre efeito promovido pelo tratamento com o extrato neutralizado e com o extrato não neutralizado. Já no estudo da expressão de TGF- β1, os tratamentos com o extrato neutralizado e não neutralizado promoveram respostas diferenciadas; portanto, mais um indicativo de que a expressão de TGF- β1 não está correlacionada ao estímulo à produção de colágeno pelo extrato de *P. guajava* L.

Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

O que se pode inferir com estes resultados é que a subexpressão de TGF- β 1, verificada no CP (tratamento com peróxido de hidrogênio), pode ter promovido a redução na proliferação dos fibroblastos e, portanto, da biossíntese de colágeno, verificado nos tratamentos *in vivo*, porque, como já afirmado, esta citocina estimula a proliferação de fibroblastos e, estando em concentrações inferiores às basais, este estímulo seria prejudicado.

Entretanto, o mesmo aconteceu com o tratamento com concentrações não-citotóxicas do extrato neutralizado, ou seja, houve redução na expressão de TGF- β 1 com concentrações deste extrato que não promovem morte celular (5 mg/mL) e que, portanto, são concentrações próximas à concentração utilizada no fitocosmético. Desta forma, estes resultados permitem sugerir que, o efeito de redução da rarefação das fibras colágenas, verificadas no tratamento alternado com o creme contendo o peróxido de hidrogênio e o fitocosmético, pode ter ocorrido devido à reação química de neutralização desta substância oxidante (peróxido de hidrogênio) com o composto antioxidante (extrato de *Psidium guajava* L.) e não devido a um estímulo de proliferação dos fibroblastos, já que a concentração de TGF- β 1 não foi aumentada com o tratamento com extrato.

Ainda, comparando os resultados obtidos nos ensaios realizados neste trabalho entre os tratamentos com o extrato e com o extrato neutralizado, na maioria das vezes, não foi verificada diferença significativa entre eles. Entretanto, o perfil de expressão de TGF- β 1 apresenta uma vantagem do extrato não neutralizado, que não promove redução na expressão desta citocina em concentrações não citotóxicas, sugerindo que, talvez seja mais promissor o uso do extrato não-neutralizado do que do extrato neutralizado.

Em relação à utilização destes dados como parâmetro de análise de irritação *in vitro*, os resultados não puderam ser correlacionados com os resultados obtidos *in vivo*. Para obter resultados mais claros a este respeito, seria interessante unir dados de expressão de outras citocinas, como o INF- γ , uma citocina pró-inflamatória, diferentemente da TGF- β 1 que exibe efeitos anti-inflamatórios.

6.3.2. Análise do perfil de despolarização de membrana mitocondrial (indicativo de apoptose)

A apoptose é uma forma altamente regulada de morte celular programada, observada em resposta a numerosos estímulos (BRAS et al., 2005). É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (YASUHARA et al., 2003). Pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula (por exemplo, estresse oxidativo, erros no DNA, desbalanço iônico e presença de citocinas). A primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes (efetora e de degradação) (SUN et al., 2005). A fase efetora é constituída da ativação de proteases, nucleases e de outros intermediários participantes. As características ultraestruturais típicas da apoptose, tais como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, cariorrexe e eventuais brotamentos nas membranas formando corpos apoptóticos, são resultantes dos eventos ocorridos nas fases efetora e de degradação (HAIL et al., 2006).

Assim, quando ocorrem danos no DNA, mecanismos bioquímicos capazes de reparar tais lesões são desencadeados nas células. Para que tal processo ocorra, é necessário que a célula pare o ciclo celular, a fim de não perpetuar a mutação, acione o sistema de reparo e, caso ocorram falhas nesses processos, promova a morte da célula (MARTINEZ et al., 2006).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: 1) apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) apoptose mediada pela mitocôndria e denominada via intrínseca (HAJRA e LIU, 2004; HAIL et al., 2006). Ambas as vias são reguladas por caspases, que pertencem à família de diversas proteínas com função de cisteíno-proteases. As caspases estão presentes constitutivamente na maioria das células de mamíferos e se localizam no citosol como proenzimas e, quando ativadas, sofrem clivagem em cisteínas localizadas próximas aos resíduos de ácido aspártico (GARRIDO e KROEMER, 2004; LAUNA et al., 2005; HAIL et al., 2006). Já foram caracterizadas mais de doze isoformas de caspases e, aproximadamente, dois terços destas enzimas apresentam função no processo de apoptose. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose e são denominadas de iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998).

Estudos relatados na literatura demonstram que fármacos e compostos naturais podem inibir sinais de apoptose induzidos por peróxido de hidrogênio (CHANG et al., 2003), bem como diminuir a expressão de marcadores de apoptose como p53, bcl-2 e caspases em tecido epitelial submetido à irradiação ultravioleta (KIM et al., 2005) ou do estresse oxidativo promovido pelo tabaco (BAGCHI et al., 2002). O tratamento de queratinócitos com fármacos suprime a apoptose induzida por radiação ultravioleta, impedindo a diferenciação, aumentando a viabilidade celular ou aumentando o potencial proliferativo de queratinócitos (LEWIS et al., 2003).

Dessa forma, no presente estudo, foi avaliada a capacidade do extrato de *P. guajava* L. proteger as células dos processos apoptóticos frente à indução de apoptose pelo tratamento com peróxido de hidrogênio. Como concentração indutora da apoptose, pelo peróxido de hidrogênio, foram utilizadas as concentrações determinadas no estudo de citotoxicidade, sendo então utilizada a concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade celular de cada uma das linhagens (IC_{50}). As concentrações escolhidas do extrato foram: uma não citotóxica para todas as linhagens celulares avaliadas (5 mg/mL) e a concentração do IC_{50} também determinada pelo estudo de citotoxicidade. A capacidade destas concentrações do extrato em induzirem a apoptose foi avaliada, além destas concentrações combinadas ao peróxido de hidrogênio, para verificar se há algum efeito de prevenção da apoptose induzida por esta substância.

Para este estudo, foi considerada uma característica apoptótica dos vertebrados superiores, que é a redução do potencial transmembrana mitocondrial (KROEMER et al., 1997), que pode ser avaliado através da citometria de fluxo, com a utilização de sondas fluorescentes, como sondas 5,5',6,6'-tetraclorol,1',3,3'-iodeto de tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1) (COSSARIZZA et al., 1993; KULKARNI et al., 1998).

O JC-1 é um fluorocromo lipofílico usado para avaliar o estado do potencial de membrana. A emissão do espectro de fluorescência do JC-1 é dependente de sua concentração que, por sua vez, é determinada pelo estado do potencial de membrana. JC-1 pode existir em dois estados, na forma de agregados ou monômeros, cada qual com um diferente espectro de emissão. JC-1 forma monômeros em baixas concentrações do corante e forma agregados em altas concentrações. Quando células vivas são incubadas com JC-1, há penetração na membrana plasmática das células como monômeros. A entrada do JC-1 na mitocôndria é controlada pelo potencial de membrana. O potencial de membrana da mitocôndria saudável é polarizado e JC-1

rapidamente ocupa essa mitocôndria. Isso aumenta o gradiente de concentração de JC-1 levando à formação de agregados dentro da mitocôndria. Agregados JC-1 apresentam um espectro vermelho, resultando em maiores níveis de emissão de fluorescência vermelha (BD™ MitoScreen, BD Biosciences).

JC-1 não se acumula na mitocôndria com potencial de membrana despolarizado e permanece no citoplasma como monômero. Estes monômeros não têm o espectro vermelho e, conseqüentemente, tem baixa fluorescência. A formação dos agregados de JC-1 é reversível. Portanto, na mitocôndria sofrendo uma transição do potencial de membrana polarizado para despolarizado (devido à apoptose ou outros eventos fisiológicos), o JC-1 sai da mitocôndria para o citoplasma como monômero, resultando em diminuição da fluorescência vermelha (BD™ MitoScreen, BD Biosciences).

Desta forma, foram obtidos os seguintes resultados:

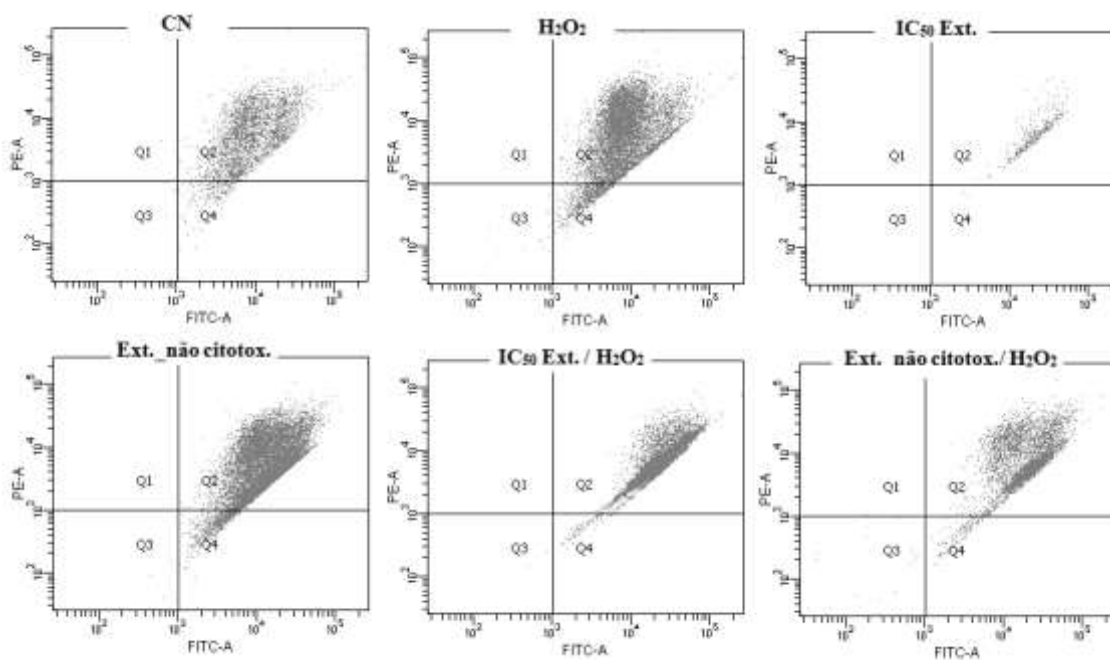


Figura 77. Perfil de emissão de fluorescência por células HepG2 tratadas com o corante JC-1.

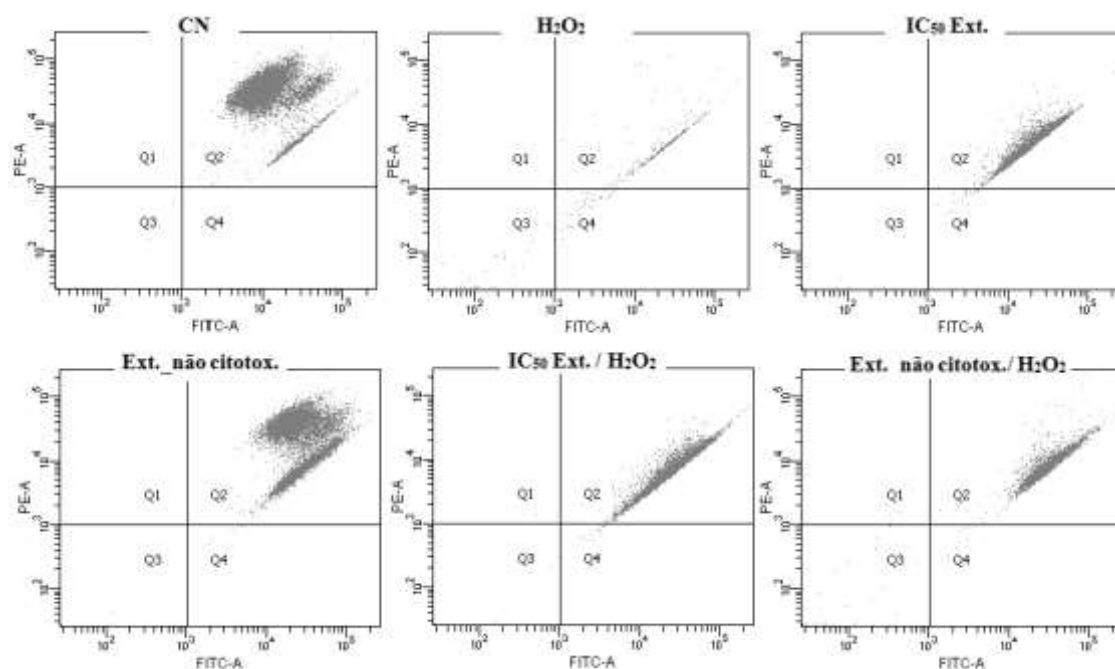


Figura 78. Perfil de emissão de fluorescência por células HaCat tratadas com o corante JC-1.

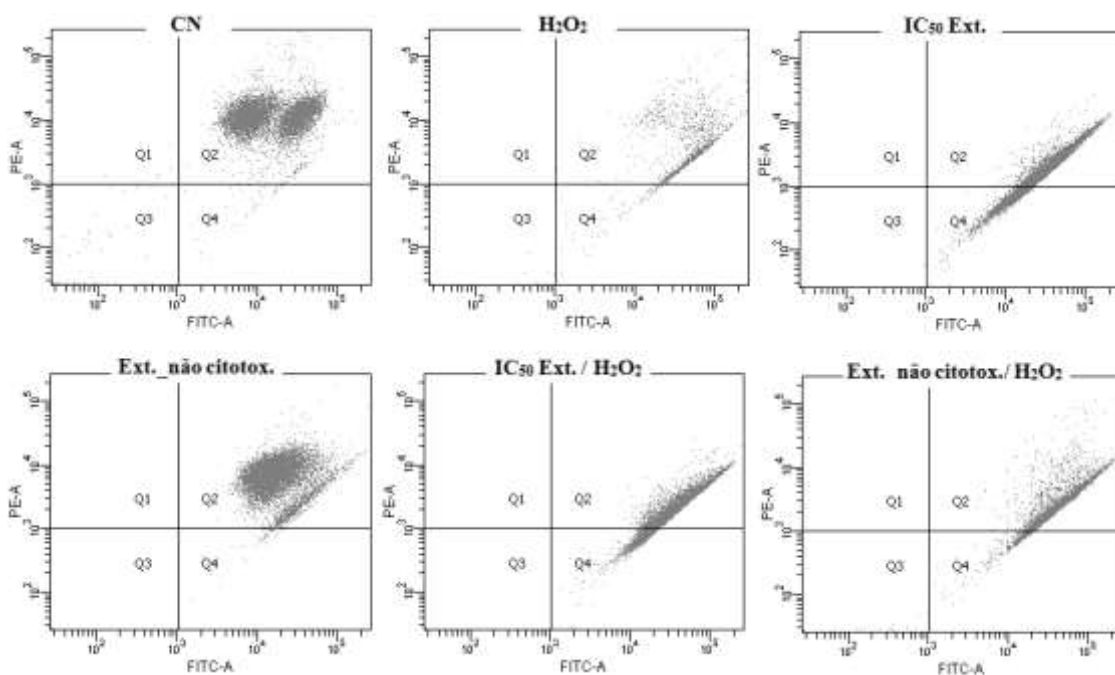


Figura 79. Perfil de emissão de fluorescência por células HDFa tratadas com o corante JC-1.

Através dos gráficos apresentados nas Figuras 77, 78 e 79 e com o auxílio do software do equipamento FACSDiva, as populações presentes em cada quadrante de interesse foram determinadas (Tabelas 10 a 12). Células que emitiram fluorescência

com comprimento de onda detectado no quadrante Q2 foram consideradas células viáveis, células que emitiram fluorescência detectada no quadrante Q4 foram consideradas células apoptóticas e células que emitiram fluorescência detectada nos quadrantes Q1 e Q3 foram denominadas de células de população distinta, sendo que podem representar células necrosadas ou debris celulares.

Nos tratamentos realizados em culturas de células HepG2 (Tabela 10), foi possível notar que o tratamento concomitante com peróxido de hidrogênio e a concentração do IC₅₀ de extrato de *Psidium guajava* L. (IC₅₀ Ext./ H₂O₂) promoveu discreto aumento na porcentagem de células normais em relação ao tratamento apenas com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (de 40 para 47,9%) reduzindo, também, a porcentagem de células em apoptose (47,3 para 43,8).

No caso do tratamento com concentração não citotóxica de extrato de *Psidium guajava* L., juntamente com o peróxido de hidrogênio (Ext._não citotox./H₂O₂), este efeito não foi observado, havendo, inclusive, aumento de 5% na população de células em apoptose.

Estes resultados estão de acordo com os resultados de quimioprevenção, em que os tratamentos das células HepG2 com extrato de *Psidium guajava* L. concomitantemente com o peróxido de hidrogênio não promoveram prevenção da apoptose. Resultados expressivos de quimioprevenção foram verificados no pré-tratamento das células HepG2, sendo que, provavelmente, se a taxa de apoptose destas células fosse verificada após tratamento prévio com o extrato de *P. guajava* L., poderia ser observada a redução na população apoptótica.

Tabela 10. Porcentagem de células HepG2 (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de *Psidium guajava* L.

HepG2	Células normais	Células em apoptose	População distinta
CN	74,3	17,1	8,6
H ₂ O ₂	40	47,3	12,7
IC ₅₀ Ext.	35,7	31,6	32,7
IC ₅₀ Ext./ H ₂ O ₂	47,9	43,8	8,3
Ext._não citotox.	50,6	32,6	16,8
Ext._não citotox./H ₂ O ₂	32,3	52,3	15,4

No tratamento das células HaCat (Tabela 11), o tratamento concomitante da concentração de IC₅₀ do extrato associada com o peróxido de hidrogênio (IC₅₀ Ext. / H₂O₂) nitidamente promoveu prevenção da morte celular mediada por dano produzido por peróxido de hidrogênio. Isto porque, após o tratamento apenas com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foi detectada uma população com 25,7% de células normais (viáveis) que passou a ser de 56,1% com o tratamento concomitante com o extrato, demonstrando redução de, aproximadamente, 50% na morte celular. A população de células distintas, que pode ser representada por debris celulares e células necróticas, foi alterada de 48,3% para 6,2%. Entretanto, a população de células em apoptose foi maior no tratamento concomitante do peróxido com o extrato (37,7%) do que só com o peróxido de hidrogênio (26%).

Este dado pode auxiliar a elucidar o mecanismo de morte celular provocada pelo peróxido de hidrogênio em células HepG2 e HaCat. Nas células HepG2 pode ser verificado que, a concentração de peróxido de hidrogênio que deveria reduzir 50% da viabilidade celular, promove a determinação de uma população de 47,3% de células apoptóticas, sugerindo que o mecanismo principal de morte celular seja a apoptose. No caso das células HaCat, pode ser verificado que uma população em torno de 50% (48,3%) de uma população celular distinta, que pode ser representada por células necróticas ou debris celulares, indicando, provavelmente, que o peróxido de hidrogênio, em células HaCat, não provoca a morte celular por apoptose mas, sim, por necrose.

No caso do tratamento concomitante das células HaCat com concentrações não citotóxicas de extrato e com o peróxido de hidrogênio, não foi verificado aumento na viabilidade celular em relação ao tratamento com o peróxido de hidrogênio apenas.

Mais uma vez estes resultados corroboram com o estudo de quimioprevenção. Na avaliação da quimioprevenção, a concentração de 25 mg/mL (definida como a concentração do IC₅₀ nos estudos de citotoxicidade) promoveram duplicação da viabilidade celular em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), assim como verificado nos estudos de apoptose.

Tabela 11. Porcentagem de células HaCat (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de *Psidium guajava* L.

HaCat	Células normais	Células em apoptose	População distinta
CN	75,2	22,6	2,2
H₂O₂	25,7	26	48,3
IC₅₀ Ext.	50,4	35,1	14,5
IC₅₀ Ext. / H₂O₂	56,1	37,7	6,2
Ext._não citotox.	60,1	31,7	8,2
Ext._não citotox./ H₂O₂	31,5	23,1	45,4

No caso do tratamento das células HDFa (Tabela 12), como era de se esperar, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) promoveu aumento na porcentagem de células em apoptose em relação ao controle negativo (CN), mas os tratamentos concomitantes com o extrato não foram capazes de reduzir esta porcentagem. Contudo, o que pode ser verificado é uma redução da população distinta de células, indicando que o extrato, em concentrações elevadas (IC₅₀ do estudo de citotoxicidade = 25 mg/mL), pode reduzir a população de células necróticas. Comparando com os resultados de quimioprevenção, as concentrações mais elevadas testadas (40 e 50 mg/mL) foram capazes de reduzir a porcentagem de células mortas com o tratamento concomitante com o extrato de *Psidium guajava* L.

Estes resultados também auxiliam na elucidação do estímulo de morte produzido pelo peróxido de hidrogênio nas células HDFa. A concentração de peróxido de hidrogênio que promove redução de 50% da viabilidade destas células (IC₅₀ = 7,5 mM) promoveu a indução do estímulo apoptótico em 51,5% das células tratadas.

Tabela 12. Porcentagem de células HDFa (normais, em apoptose ou população distinta) após tratamentos com peróxido de hidrogênio e extrato de *Psidium guajava* L.

HDFa	Células normais	Células em apoptose	População distinta
CN	39,2	23,7	37,1
H ₂ O ₂	33,4	51,5	15,1
IC ₅₀ Ext.	16,1	70,7	13,2
IC ₅₀ Ext./ H ₂ O ₂	11,3	83,6	5,1
Ext. não citotox.	50,5	40,3	9,2
Ext. não citotox./H ₂ O ₂	28,6	58,1	13,3

Diversos efeitos benéficos do uso do extrato de *Psidium guajava* L. para a prevenção do envelhecimento cutâneo e, até mesmo, para a melhoria do aspecto das peles fotoenvelhecidas foram descritos neste trabalho. Em diversos momentos, este composto ativo foi comparado aos derivados da vitamina A, cujos efeitos benéficos para a pele são indiscutíveis. Assim, a vantagem em utilizar este extrato vegetal em substituição ao uso dos derivados da vitamina A está, principalmente, na maior segurança oferecida pelo extrato de *Psidium guajava* L.

De acordo com os estudos realizados, o extrato de *Psidium guajava* L. só é citotóxico em concentrações bastante elevadas, com uma margem de segurança satisfatória se comparado à sua concentração ativa. Nas concentrações sugeridas para efeito cosmético, o extrato vegetal não é mutagênico e não causou irritação dérmica, ocular e nem mesmo comedogenicidade, quando aplicado em coelhos. Em contrapartida, a vitamina A e seus derivados é reconhecidamente teratogênica, podendo causar malformações fetais se gestantes utilizarem estas substâncias (NAU et al., 1994).

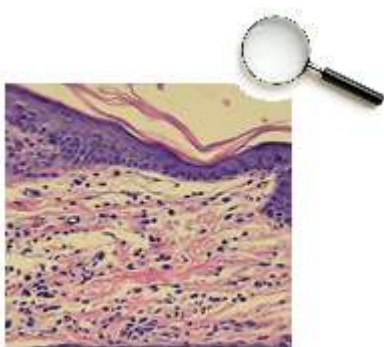
Reconhecendo os efeitos benéficos dos derivados da vitamina A e, considerando que seu uso deve ser realizado com cautela, a ANVISA emitiu parecer técnico indicando as regras para uso destas substâncias e classificando os produtos que os contêm como grau de risco 2 (PARECER TÉCNICO nº 4, 2010).

Considerando os efeitos benéficos que podem ser obtidos com o uso tópico do extrato de *Psidium guajava* L. incorporado a um fitocosmético, nosso grupo de pesquisa pretende continuar o estudo deste composto ativo por meio do estudo clínico a ser realizado em voluntários. Estes estudos, além de serem úteis para a comprovação do potencial não-irritante do fitocosmético, auxiliarão na comprovação de efeitos como a melhoria no aspecto da pele envelhecida, o aumento na elasticidade e no preenchimento

de rugas, o clareamento de máculas formadas devido ao processo de fotoenvelhecimento. Outra opção seria, ainda, um estudo de longa duração, comparando a progressão no envelhecimento da pele de indivíduos tratados apenas com cosméticos hidratantes com a pele de indivíduos tratados com o fitocosmético proposto neste trabalho.

As análises serão realizadas por metodologias não-invasivas, utilizando equipamentos como o Cutometer[®], além de estudos subjetivos, baseados na opinião dos próprios voluntários.

Além deste estudo em humanos, que já está previsto, estão em andamento outras análises de atividade antioxidante, como o estudo que utiliza eritrócitos humanos, e a identificação da composição fitoquímica do extrato de *Psidium guajava* L. em parceria com a Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência, Espanha.



Conclusão

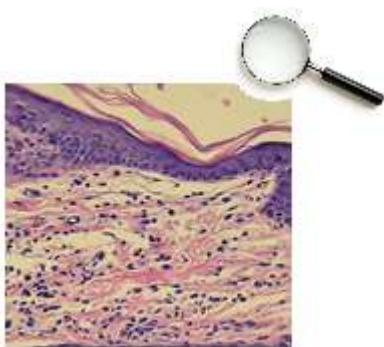
7. CONCLUSÃO

Este trabalho sugeriu o uso do extrato de *Psidium guajava* L. como uma alternativa segura e efetiva, com grande parte de seus efeitos fisiológicos, celulares e moleculares descritos, para a prevenção e amenização dos efeitos do envelhecimento da pele.

O extrato de *Psidium guajava* L. apresenta elevada margem de segurança quando sua concentração ativa é comparada à citotóxica. Nas concentrações sugeridas para efeito cosmético, o extrato vegetal não é mutagênico e não causou irritação dérmica, ocular e nem mesmo comedogenicidade, nas condições em que foi avaliado.

Além disso, os resultados obtidos demonstram que o extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de promover efeitos quimioprotetores, principalmente em células HaCat, em que aproximadamente 100% dos danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio foram prevenidos. Também, é capaz de estimular a síntese de colágeno e prevenir a rarefação destas fibras causada pelo peróxido de hidrogênio.

Esta pesquisa também estimula o uso da goiaba para usos diversos do convencional, no setor alimentício, visando à exploração dos seus benefícios à saúde da população, baseados, principalmente, no seu potencial antioxidante. Também contribui, de alguma forma, para o desenvolvimento econômico de agricultores que atuam no cultivo da goiaba, oferecendo uma alternativa ao uso alimentício desta fruta, possibilitando o aumento no valor agregado do produto obtido a partir dela.



Referências

8. REFERÊNCIAS

ABU-YOUSIF, A.O.; SMITH, K.A.; GETSIOS, S.; GREEN, K.J.; VAN DROSS, R.T.; PELLING, J.C. Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. **Cancer Res.**, v.68, n.8, 2008.

ADLER, S. et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetic testing: current status and future prospects – 2010. **Arch. Toxicol.**, v.85, p.367-485, 2010.

AIKENS, P. Nanomateriais proporcionam proteção solar de amplo espectro. **Cosmet. Toiletries**, v.18, p. 60-64, 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>. Acessado em: Fevereiro de 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, Brasília, 2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES. Acessado em: Julho de 2014.

ARCT, J.; PYTKOWSKA, K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. **Clin. Dermatol.**, v.26, p.347–357, 2008.

AUGUSTIN, C.; FREI, V.; PERRIER, E.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Cellular engineering for cosmetology trials: dermal equivalent for determining cutaneous irritation and efficiency. 18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Amsterdam 1996 7.7.1: Cellular Engineering.

BAGCHI, D.; RAY, S.D.; BAGCHI, M.; PREUSS, H.G.; STOHS, S.J. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. **Indian. J. Exp. Biol.**, v.40, n.6, p.717-26, 2002.

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

BALA, S.; GROVER, I.S. Antimutagenicity of some citrus fruits in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Res.**, v.222, p.141 – 148, 1989.

BALIGA, M.S. KATYAR, S.K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.5, p.243–253, 2006.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, Q.T.D., BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.82, p.155-158, 2002.

BD™ MitoScreen, BD Biosciences, Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit, Instruction Manual.

BEDONI, M.; SFORZA, C.; DOLCI, C.; DONETTI, E. Proliferation and differentiation biomarkers in normal human breast skin organotypic cultures. **J. Derm. Sci.**, v.46, n.2, p.139-142, 2007.

BENEDÍ, J.; ARROYO, R.; ROMERO, C.; MARTÍN-ARAGÓN, S.; VILLAR, A.M. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. **Life Sci.**, v.75, p.1263–1276, 2004.

BERNARD, P.; BERTHON, J.Y. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. **Int. J. Cosmetic Sci.**, v. 22, p.219-226, 2000.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat. Res.**, v. 97, p. 267–281, 1982.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, n.6, p.1340-1344, 2006.

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

BOTHAM, P. A.; EARL, L. K.; FENTEM, J. H.; ROGUET, R.; VAN DE SANDT, J. J. M. Alternative methods for skin irritation testing: The current status. **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, n.26, p.195-211, 1998.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R.T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J. Cell Biol.**, v.106, p.761-771, 1988.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v.70, n.2, p.231-239, 2005.

BRIET, L.S.; SCORISA, J.M.; GUIMARÃES, G.N.; PRESTES, P.S.; LEONARDI, G.R.; POLACOW, M.L.O.; PIRES-DE-CAMPO, M.S.M. Avaliação da escala de Draize comparada com a análise histopatológica na irritação cutânea. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.3, p. 325-30, 2009.

BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, p. 445-448, 2002.

CARIÑO-CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; TORRES-VALENCIA, J.M.; GONZÁLEZAVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; MADRIGAL-BUJADAR, E. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. **Toxicol. Vitro**, v.21, p.691-697, 2007.

CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; PAI-SILVA, M.D.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, n.3, p.490-497, 2007.

CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpene against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food Chem. Toxicol.**, v.39, p.549-556, 2001.

CHANG, H.; OEHLER, W.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. **Free Radic. Res.**, v.37, n.6, p.655-63, 2003.

CHEN, C.Y.; KUO, P.L.; CHENG, Y.H.; HUANG, J.C.; HO, M.L.; LIN, R.J.; CHANG, J.S.; WANG, H.M. Tyrosinase inhibition, free radical scavenging, antimicroorganism and anticancer proliferation activities of *Sapindus mukorossi* extracts. **J. Taiwan Inst. Chem. E.**, v.41, p.129–135, 2010.

CHIARI, B.G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2011, 137p.

CHIARI, B.G.; MARTINI, P.C.; MORAES, J.D.D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; ISAAC, V.L.B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **Int. J. Res. Cosm. Sci.**, v.2, n.2, p.8-14, 2012a.

CHIARI, B.G.; SEVERI, J.A.; PAULI-CREDENDIO, P.A.; SYLOS, C.M.; VILEGAS, W.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **Int. J. Pharm. Pharmac. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 331-336, 2012b.

CHUNG, J.H.; SEO, J.Y.; CHOI, H.R.; LEE, M.K.; YOUN, C.S.; RHIE, G.; CHO, K.H.; KIM, K.H.; PARK, K.C.; EUN, H.C. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, v.117, p.1218-1224, 2001.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cationic 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 197, p. 40-45, 1993.

COZZI, R., RICORDY, R., AGLITTI, T., GATTA, V., PERTICONE, P., DE SALVIA, R. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, v.18, p.223-228, 1997.

CUZZOCREA, S.; RILEY, P.D.; CAPUTI, P.A.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharm. Rev.**, v.53, p.135-159, 2001.

DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. **Eur. J. Nutr.**, v.47 Suppl, n.2, p.51-9, 2008.

DE RIGAL, J.; ESCOFFIER, C.; QUERLEUX, B.; FAIVRE, B.; AGACHE, P.; LÉVÊQUE, J. Assessment of aging of the human skin by *in vivo* ultrasonic imaging. **J. Investigative Dermatol.**, v. 93, n.5, p. 621-625, 1989.

DERYNCK, R. TGF- β -receptor-mediated signaling. **Trends Biochem. Sci.**, v.19, n.12, p.548-553, 1994.

DHIR, H.; KUMAR, A.; SHARMA, A. Relative efficiency of *Phyllanthus emblica* fruit extract and ascorbic acid in modifying lead and aluminium-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow. **Environ. Mol. Mutag.**, v.21, p.229-236, 1993.

DOSP, 2014. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 24 de janeiro de 2014. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/65160887/dosp-executivo-caderno-2-24-01-2014-pg-iv/pdfView>. Acesso em julho de 2014.

Bruna Galdorfini Chíari Andréo

DRAELOS, Z.D. Cosméticos em dermatologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

DRAELOS, Z.D.; DINARDO, J.C. A re-evaluation of the comedogenicity concept. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.54, p.507-12, 2006.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; GALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 82, p. 377-390, 1944.

DUARTE, M.R.; PAULA, F.M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L., Myrtaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.6, n.2, 2005.

DURASAMY, A.; NARAYANASWAMY, N.; SEBASTIAN, A.; BALAKRISHNAN, K.P. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. **Int. J. Res. Cosm. Sci.**, v.1, n.1, p. 13-16, 2011.

ESCOBAR, A.P.; SYLOS, C.M. Efeito do processo de obtenção de polpa de goiaba e goiabada sobre os teores de licopeno e de beta-caroteno. 2006. Dissertação (Mestrado em Análise de alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

ETCHEVERRY, S.B.; FERRER, E.G.; NASO, L.; RIVADENEIRA, J.; SALINAS, V.; WILLIAMS, P.A. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v.13, n.3, p.435-47, 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª edição, 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf. Acesso em junho de 2014.

FENECH, M. Citokinesis-block micronucleous cytome assay. **Nat. Protoc.**, v.2, n.5, p.1084-1104, 2007.

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch. Dermatol.**, v. 138, p. 1462- 1470, 2002.

FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Arch. Dermatol.**, v. 144, n. 5, p. 666-672, 2008.

FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.848-873, 1998.

FULTON Jr, J.E.; PAY, S.R.; FULTON, J.E. Comedogenicity of current therapeutic products, cosmetics, and ingredients in the rabbit ear. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.10, n.1, p.96-105, 1984.

GARRIDO, C.; KROEMER, G. Life's smile, death's grin: Vital functions of apoptosis-executing proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.16, p.639-646, 2004.

HAIL JR, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v.11, p.889-904, 2006.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v.9, p.691-704, 2004.

HAKURA, A.; SUZUKI, S.; SATOH, T. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. **Mutat. Res.**, v.438, p.29–36, 1999.

HAN, G.; HAN, Z. WANG, X. TGF- β in skin cancer and fibrosis. In: MOUSTAKAS, A.; MIYAZAWA, K. TGF- β in human disease. Springer Japan: Tokyo, 2013.

HANNON, G.J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, v.371, p.257–261, 1994.

*Bruna Galdorfini Chiari Andréo*_____

HANSON, K.M.; SIMON, J.D. Epidermal trans-urocanic acid and the UVA induced photoaging of the skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10576–10578, 1998.

HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide system: random attack or site-specific damage? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1360, n.1, p.84-96, 1997.

HEISE, R.; MEY, J.; NEIS, M.M.; MARQUARDT, Y.; JOUSSEN, S.; OTT, H.; WIEDERHOLT, T.; KURSCHAT, P.; MEGAHED, M.; BICKERS, D.R.; MERK, H.F.; BARON, J.M. Skin retinoid concentrations are modulated by CYP26A1 expression restricted to basal keratinocytes in normal human skin and differentiated 3D skin models. **J. Invest. Dermatol.**, v.126, n.11, p.2473-80, 2006.

HOCHSTEIN, P.; ATALLAH, A.S. The nature of oxidant and antioxidant systems in inhibition of mutation and cancer. **Mutat. Res.**, v.202, p.363–375, 1988.

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n.3, p. 387-393, 2008.

IKUMA, N.E.M.; PASSONI, H.M.; BISO, I.F.; LONGO, C.M.; CARDOSO, P.R.C.; CAMPANER, S.L.; VARANDA, E.A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxic. in Vitro**, v.20, p.361-366, 2006.

JEONG, T.J.; MOON, J.-H.; PARK, K.H.; SHIN, S.CH. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.2123-2128, 2006.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutat. Res.**, v.53, p.351-353, 1978.

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

KALE, S.; GHOGHE, P.; ANSARI, A.; WAJE, A.; SONAWANE, A. Formulation and *in-vitro* determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. seed oil sunscreen cream. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, n.4, p. 2194-2197, 2010.

KANG, Z.; YEN, M.; CHIU, C.; WU, H.; HUANG, S.; TAI, S.; WANG, B. The inhibitory effects of aqueous extract from guava twigs, *Psidium guajava* L., on mutation and oxidative damages. **J. Chem.**, v. 2013, p.1-7, 2013.

KANNO, S.; SHOUJI, A.; ASOU, K.; ISHIKAWA, M. Effects of Naringin on Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in P388 Cells. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 92, p.166 – 170, 2003.

KATAGIRI, T.; OKUBO, T.; OYOBIKAWA, M. FUTAKI, K.; SHAKU, M.; KAWAI, M. Novel melanogenic enzymes inhibitor for controlling hyperpigmentation. Paper n.7, 20 th IFSCC Congress, Cannes, 1998.

KHAZAELI, P.; GOLDOOZIAN, R.; SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.31, p.375–381, 2009.

KIM, S.Y.; KIM, D.S.; KWON, S.B.; PARK, E.S.; HUH, C.H.; YOUN, S.W.; KIM, S.W.; PARK, K.C. Protective effects of EGCG on UVB-induced damage in living skin equivalents. **Arch. Pharm. Res.**, v.28, n.7, p.784-90, 2005.

KIM, Y.J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 1707-1723, 2005.

KITTIWANNACHOT, P.; BORISUT, P.; WANASAWAS, P.; PONPANICH, L.; RATTANASUK, O.; CHULASIRI, M. Antimutagenic potentials of hydroalcoholic herbal extracts towards UV-induced mutation. **Thai. J. Toxicology**, v.23, n.1, p.27-34, 2008.

Bruna Galdorfini Chiari Andréo

KLEIN-SZANTO, A.J.P.; SLAGA, T.J. Effects of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. **J. Invest. Dermatol.**, v.79, n.1, p.30-34, 1982.

KLIGMAN, A.M.; MILLS, O.H. Acne cosmetica. **Arch. Dermatol.**, v.106, p.893-897, 1972.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Med.**, v. 3, p. 614–620, 1997.

KULKARNI, G. V.; LEE, W.; SETH, A.; McCulloch, C. A. G. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, v. 245, p 170-178, 1998.

KUNDU, K.J.; SURH, J-Y. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with antiinflammatory phytochemicals. **Mutat. Res.**, v.591, p.123-146, 2005.

KUROKAWA, Y.; TAKAMURA, N.; MATSUSHIMA, Y.; IMAZAWA, T.; HAYASHI, Y. Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v.24, p. 299-304, 1984.

LARROSA, P.N.F.; CROCI, D.O.; RIVA, D.A.; BIBINI, M.; LUZZI, R.; SARACCO, M.; MERSICH, S.E.; RABINOVICH, G.A.; PERALTA, L.M. Apoptosis resistance in HIV-1 persistently-infected cells is independent of active viral replication and involves modulation of the apoptotic mitochondrial pathway. **Retrovirology**, v.5, n.19, p.1-12, 2008.

LAUNA, Y.S.; HERMINE, O.; FONTENAY, M.; KROEMER, G.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Vital functions for lethal caspases. **Oncogene**, v.24, p.5137-5148, 2005.

LAVKER, R.M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.73, p.59-66, 1979.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

LAVKER, R.M.; VERES, D.A.; IRWIN, C.J.; KAIDBEY, K.H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.62, p.348–352, 1995.

LEE, K.T.; KIM, B.J.; KIM, J.H.; HEO, M.Y.; KIM, H.P. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.19, n.6, p. 291-298, 1997.

LEE, Y-L.; LEE, M-H.; CHANG, H-J.; HUANG, P-Y.; HUANG, I-J.; CHENG, K-T.; LEU, S.J. Taiwanese native plants inhibit matrix metalloproteinase-9 activity after ultraviolet B irradiation. **Molecules**, v.14, p.1062-1071, 2009.

LEWIS, D.A.; HURWITZ, S.A.; SPANDAU, D.F. UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes: role of the erbB receptor family. **Exp. Cell Res.**, v.284, n.2, p.316-27, 2003.

LIMA, M.A.C.; ASSIS, J.S.; NETO, L.G. Caracterização dos frutos de goiabeira e seleção de cultivares na região do submédio São Francisco. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 1, p. 273-276, 2002.

LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J. Med. Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LIU, J.; BURDETTE, J.E.; XU, H.; GU, C.; VAN BREEMEN, R.B.; BHAT, K.P.L.; BOOTH, N.; CONSTANTINOU, A.I.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; BOLTON, J.L. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.2472–2479, 2001.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, suppl, p.517S–20S, 2003.

LIVNY, O.; KAPLAN, I.; REIFEN, R.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Oral cancer cells differ from normal oral epithelial cells in tissue like organization and in response to lycopene treatment: an organotypic cell culture study. **Nutr. Cancer.**, v.47, n.2, p.195-209, 2003.

LÖLIGER, J. The use of antioxidants in food. In: Free radicals and food additives; ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B., Eds.; Taylor and Francis: London, 1991; pp 129-150.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M.A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, M.C.; SOTO-GONZÁLEZ, Y.; DOUBOVA, S.V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, n. 1–2, p. 19–24, 2002.

LUTTERODT, G.D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. **J. Ethnopharmacol.**, v. 25, n. 3, p. 235–247, 1989.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.D.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.**, v.61, n.3, p.121-124, 1986.

MANTLE, D.; GOK, M.A.; LENNARD, T.W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. **Adverse Drug React. Toxicol. Rev.**, v.20, n.2, p.89-103, 2001.

MARONA, H.R.N. Princípios éticos na experimentação animal. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, n.2, p.97- 105, 2003.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.113, n.3-4, p. 173-215, 1983.

MARTINEZ, M.A.R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L.S.; GARCIA RUIZ, I.R.G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An. Bras. Dermatol.**, v.81, n.5, p.405-19, 2006.

MCCULLOUGH, J.L.; KELLY, K.M. Prevention and treatment of skin aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1067, p.323–331, 2006.

MEDINA, J.; BRUGEROLLE DE FRAISSINETTE, A.; CHIBOUT, S.; KOLOPP, M.; KAMMERMANN, R.; BURTIN, P.; EBELIN, M.; CORDIER, A. Use of human skin equivalent apligraf for *in vitro* assessment of cumulative skin irritation potential of topical products. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 164, n.38-45, 2000.

MENDELSON, R.; BALICK, M.J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Econ. Bot.**, v.49, p.223–228, 1995.

MENTER JM, CORNELISON LM, CANNICK L, PATTA AM, DOWDY JC, SAYRE RM, ABUKHALAF IK, SILVESTROV NS, WILLIS I. Effect of UV on the susceptibility of acid-soluble Skh-1 hairless mouse collagen to collagenase. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.19, p.28-34, 2003.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutat. Res.**, v.512, p.135-153, 2002.

MIYAMURA, Y.; COELHO, S.G.; WOLBER, R.; MILLER, S.A.; WAKAMATSU, K.; ZMUDZKA, B.Z.; ITO, S.; SMUDA, C.; PASSERON, T.; CHOI, W.; BATZER, J.; YAMAGUCHI, Y.; BEER, J.Z.; HEARING, V.J. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. **Pigment. Cell Res.**, v.20, n.1, p.2-13, 2007.

MONTEIRO, S. Esperança das goiabas. **Rev. Frutas Derivados**, n. 03. p. 27–30, 2006.
Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

MORRIS, W.E.; KWAN, S.C. Use of the rabbit ear model in evaluating the comedogenic potential of cosmetic ingredients. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.54, p.215-225, 1983.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER-DECKER, K.; FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F. Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as *in vitro* parameters of irritancy: a possible alternative to Draize skin irritation test. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 127, p.99-108, 1994.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.247-256, 2000.

NAU, H.; CHAHOUD, I.; DENCKER, L.; LAMMER, E.J.; SCOTT, W.J. Teratogenicity of vitamin A and retinoids. In: BLOMHOFF, R. Vitamin A in health and disease, 1994.

NEFIC, H.; HANDZIC, I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. **Mutat. Res.**, v. 753, p. 1 – 11, 2013.

NEGI, P.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chem.**, v. 80, p. 393 – 397, 2003.

PADULA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of brasilian guavas (*Psidium guajava* L.). **Food Chem.**, v.20, p.11-19, 1986.

PARECER TÉCNICO Nº4 DE 21 DE DEZEMBRO DE 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b7ee140047f8ce26bcd7be9f306e0947/Paracer_n_4_etinoides.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em dezembro de 2013.

PHILLIPS II, L.; STEINBERG, M.; MAIBACH, H.I.; AKERS, W.A. A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.21, p.369-382, 1972.

PUSPANINGTYAS, A.R. Evaluation of the effect of red guava (*Psidium guajava*) fruit extract on tyrosinase (EC 1.14.18.1) activity by spectrophotometry. **Int. Curr. Pharm. J.**, v.1, n.5, p. 92-97, 2012.

QA'DAN, F.; THEWAINI, A.; ALI, D.A.; AFIFI, R.; ELKHAWAD, A.; MATAKA. K.Z. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. **Am. J. Chin. Med.**, v. 33, p.197-204, 2005.

RABACHINI, T. Efeito da ripamicina em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam oncoproteínas de papilomavírus humano tipo 16. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. 2007. 148p. [Tese de doutorado].

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnol.**, v.20, n.12, p.522-531, 2002.

RAI, P.K.; JAISWAL, D.; MEHTA, S.; WATAL, G. Anti-hyperglycemic potential of *Psidium guajava* raw fruit peel. **Indian J. Med. Res.**, v.129, p. 561-565, 2009.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 3, p.315-320, 2003.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.C. The principles of human experimental technique. London: Methuen; 1959.

SATO, R.; DANG, K.M.; MCPHERSON, B.G.; BROWN, A.C. Anticancer activity of guava (*Psidium guajava*) extracts. **J. Complement. Integr. Med.**, v.7, n.1, 2010.

SCARANO, F.R., Perspectives on biodiversity science in Brazil, Piracicaba, **Scientia Agricola**, v.64, n.4, 2007.

SCHAUDER, S.; IPPEN, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. **Contact Dermatitis**, v.37, p. 221-232, 1997.

SHARNBERGER, R.J. Genetic toxicology of ascorbic acid. **Mutat. Res.**, v.133, p.135-149, 1984.

SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. **Nutrition**, v. 17, p.839-844, 2001.

SHELLEY, W.B.; ARTHUR, R.P. The physiology of the skin. **Annu. Rev. Physiol.**, v.20, p.179-206, 1958.

SHIMIZU, K.; KONDO, R.; SAKAI, K.; SHOYAMA, Y.; SATO, H.; UENO, T. Steroid 5 α -reductase inhibitory activity and hair regrowth effects of an extract from *Boehmeria nippononivea*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n.4, p. 875-877, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; Farmacognosia da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007.p. 595, 596, 600, 601, 634.

Bruna Galdorfini Chiarí Andréo

SOD determination kit, Sigma-Aldrich. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>. Acesso em julho de 2014.

SUFFUDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N., Cytotoxic molecules from natural sources tapping the Brazilian biodiversity, **Anticancer Agents Med. Chem.**, v.6, n.4, p.367-75, 2006.

SUGAI, S.; MURATA, K.; KITAGAKI, T.; TOMITA, I. Studies on eye irritation caused by chemicals in rabbits – 1. A quantitative structure-activity relationships approach to primary eye irritation of chemicals in rabbits. **J. Toxicol. Sci.**, v. 15, p. 245-262, 1990.

SUN, S.; LI, X.; LI, X.; YANG, W. Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MCG-803 gastric cancer cell lines. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v.20, n.2, p.173-180, 2005.

THIELE, J.J.; TRABER, M.G.; TSANG, K.G. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and incudes lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. **Free Rad. Biol. Med.**, v.23, p. 385 -391, 1997.

TUR, E.; BOLTON, L.; CONSTANTINE, B.E. Topical hydrogen peroxide treatment of ischemic ulcers in the guinea pig: Blood recruitment in multiple skin sites. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.33, p. 217-221, 1995.

UKEDA, H.; KAWANA, D.; MAEDA, S.; SAWAMURA, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.63, n.3, p.485-488, 1999.

ULIASZ, A.; SPENCER, J.M. Chemoprevention of skin cancer and photoaging. **Clin. Dermatol.**, v.22, p.178–182, 2004.

*Bruna Galdorfini Chiarí Andréo*_____

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v.24, n.4, p.146-154, 2001.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VINKEN, M.; PAUWELS, M.; ATES, G.; VIVIER, M.; VANHAECKE, T.; ROGIER, V. Screening of repeated dose toxicity data present in SCC(NF)P/SCCS safety evaluations of cosmetic ingredients. **Arch. Toxicol.**, v.86, p. 405–412, 2012.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S., SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.19, n.2a, p. 452-457, 2009.

VIRAVADIA, K.; SIN, A.; SHULER, M.L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. **Biotechnol. Prog.**, v.20, p.316-323, 2004.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. Cosmetología de Harry. Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WIROHADIDJOJO, Y.W.; TRISNOWATI, N.; BUDIYANTO, A. Collagen deposition and cellular viability among UVB irradiated human dermal fibroblasts treated by platelets. **J. Clin. Med. Res.**, v.4, n.2, p. 29-33, 2012.

WOLLIN, K.; GÖRLITZ, B. Comparison of genotoxicity of textile dyestuffs in *Salmonella* mutagenicity assay, *in vitro* micronucleus assay, and single cell gel/comet assay. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.23, n.4, p.267–278, 2004.

YAAR, M.; ELLER, M.; GILCHREST, B. Fifty years of skin aging. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2002.

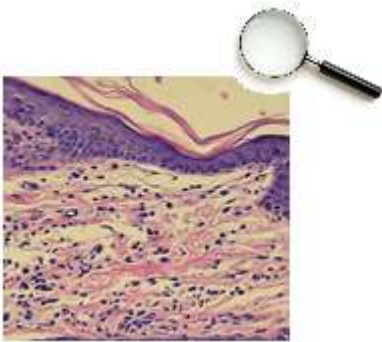
YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. **Clin. Geriatr. Med.**, v.17, p.617-630, 2001.

YAMAUCHI, M.; WOODLEY, D.T.; MECHANIC, G.L. Aging and cross-linking of skin collagen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.152, p. 898-903, 1988.

YANG, C.; SHEN, H.; ONG, C. Protective Effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 273–279, 1999.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, v.51, p.873–885, 2003.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharm.**, v.25, p. 83-89, 2004.



_____ *Anexos*

ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 08/2012

Pesquisador: BRUNA GALDORFINI CHIARI

Orientador: ProfªDrª Vera Lucia Borges Isaac

Projeto: Avaliação de efeitos fisiológicos, celulares e moleculares de ativo cosmético vegetal e formulação

Experimento: Estudo de efeitos fisiológicos causados por fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.

Parecer nº 17/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião do dia 18 de maio de 2012, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Avaliação de efeitos fisiológicos, celulares e moleculares de ativo cosmético vegetal e formulação”, apresentado pela pós-graduanda Bruna Galdorfini Chiari, sob orientação da ProfªDrª Vera Lucia Borges Isaac, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em DEZEMBRO de 2012, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 06 de junho de 2012.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Bruna Galdorfini Chiari _____