

**GUSTAVO DE CAMPOS DIEAMANT**

---

**“RESPOSTA NEURO-IMUNO-ENDOCRINOLÓGICA DA  
PELE RELACIONADA AO FOTOENVELHECIMENTO:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E CLÍNICA DE UM NOVO  
COMPOSTO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA EM  
DERMATOLOGIA”**

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ



**Universidade Estadual de Campinas**

**Campinas  
2008**

**“RESPOSTA NEURO-IMUNO-ENDOCRINOLÓGICA DA  
PELE RELACIONADA AO FOTOENVELHECIMENTO:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* E CLÍNICA DE UM NOVO  
COMPOSTO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA EM  
DERMATOLOGIA”**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-  
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.*

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ



UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas**

**Campinas  
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D562r	<p>Dieamant, Gustavo de Campos “Resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele relacionada ao fotoenvelhecimento: avaliação in vitro e clínica de um novo composto como alternativa terapêutica em dermatologia” / Gustavo de Campos Dieamant. Campinas, SP : [s.n.], 2008.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz Tese (Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Radiação ultravioleta. 2. Endorfinas. 3. Citocinas. 4. Cosméticos. 5. Envelhecimento. I. Queiroz, Mary Luci de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	---

**Título em inglês: “Skin neuro-immuno-endocrinology response related to photoaging: in vitro and clinical assessment of a new compound as therapeutical alternative in dermatology”**

**Keywords:** • Ultraviolet Radiation  
• Endorphins  
• Cytokines  
• Cosmetics  
• Aging

**Titulação: Doutor em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo

Profa. Dra. Débora Colombi

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi

**Data da defesa: 21 - 08 - 2008**



---

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

---

---

### Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

---

---

### Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Handwritten signature of Mary Luci de Souza Queiroz in blue ink.

Profa. Dra. Débora Colombi

Handwritten signature of Débora Colombi in blue ink.

Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

Handwritten signature of Albetiza Lôbo de Araújo in blue ink.

Prof. Dr. Luiz Claudio DI Stasi

Handwritten signature of Luiz Claudio DI Stasi in blue ink.

Prof. Dr. Stephen Hyslop

---

Handwritten signature of Stephen Hyslop in blue ink.

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 21/08/2008

---

## **DEDICATÓRIA**

---

*À minha esposa Carina, eterna alma gêmea, pela dedicação e pelo amor  
que é demonstrado em cada gesto, palavra e olhar.*

*Aos meus filhos, Enzo, Pietro e Benício, por fazerem da minha vida um  
tesouro de valor inestimável.*

*À minha mãe, por me mostrar o caminho, sempre de maneira a desviar  
das pedras, o máximo possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus, por todas as maravilhas que todos os dias acontecem na minha vida.

À minha esposa Carina, por abdicar, neste momento, da sua vida profissional e mesmo assim ter a capacidade de saber, nos momentos mais importantes, demonstrar todo seu amor, carinho, compreensão, inteligência e eterno incentivo.

Aos meus filhos Enzo, Pietro e Benício, razões da minha vida, que fizeram despertar em mim um amor capaz de superar todos os obstáculos com um enorme sorriso no rosto.

À minha mãe, uma das pessoas mais inteligentes que conheço, pelo amor incondicional e pela capacidade de perseverança, por quem atribuirei sempre todas as conquistas e alegrias da minha vida.

Aos meus irmãos, Débora e Felipe, pela união na infância e adolescência, que hoje serve de alicerce para suportar o tempo que passamos sem nos ver.

Ao meu pai, por saber, mesmo em silêncio, compreender os momentos mais difíceis e pelo orgulho dos filhos, que sempre é demonstrado.

Às minhas tias Silvana, Carminha e Mirtes, por cada uma do seu jeito e com seu valor, contribuírem para o meu sucesso pessoal e profissional.

Aos meus queridos da família Araújo Jordão – Alaor, Bete, Camili, Conceição e Corino – pela cooperação e compreensão, especialmente nos momentos fundamentais para o meu crescimento profissional.

À Samara Eberlin, amiga de todas as horas e companheira de trabalho, com quem aprendo a cada dia ser um ser humano melhor.

À Maria Del Carmen Velazquez Pereda, pela inteligência, pelo empreendedorismo, pela capacidade de doação e pelo alto grau de espiritualidade, a quem agradeço diariamente pelas oportunidades diárias de crescimento.

À Cecília Nogueira, a quem tenho enorme gratidão e admiração, pelos momentos iniciais da minha vida em Sorocaba e pelas boas conversas nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho e de muitas outras lições, por esta oportunidade que jamais será esquecida.

Aos meus amigos Vanessa e Luiz Eduardo, pela grande amizade e pela cooperação na reta final deste trabalho.

À Chemyunion Química, por proporcionar as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Jéssica, atual companheira de trabalho, pela especial ajuda na interpretação de parte dos testes clínicos apresentados neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de CFU, em especial aqueles que tornaram os dias de convívio mais agradáveis.

À Sueli Cristina de Oliveira e Raphael Marcos Pereira, exemplos de luta, esforço e recompensa.

À equipe de Pesquisa e Desenvolvimento da Chemyunion Química, pela assistência técnica, pela paciência e pela oportunidade de crescimento contínuo.

À EVIC Brasil, pelo apoio na condução dos testes clínicos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, possibilitaram a perfeita realização deste trabalho.

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.*

**(Leonardo da Vinci, século XV)**

	<u>Página</u>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xxxix
<b>RESUMO</b> .....	xil
<b>ABSTRACT</b> .....	liii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	57
1.1. Contexto Histórico e Dados Epidemiológicos.....	59
1.2. A Pele como Órgão Neuro-imuno-endocrinológico.....	61
1.3. Envelhecimento Cutâneo.....	68
1.4. Radiação Ultravioleta (RUV), Estresse Oxidativo e Senescência Celular.....	73
1.5. Matriz Extracelular e Regulação do Tecido Conectivo.....	81
1.6. Evolução do Mercado e Relevância da Utilização de Produtos Dermocosméticos na Prática Dermatológica Atual.....	84
1.7. <i>Rhodiola rosea</i> e L-carnosina.....	86
1.7.1. <i>Rhodiola rosea</i> .....	86
1.7.2. L-carnosina.....	91
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	97
<b>3. MATERIAL e MÉTODOS</b> .....	103
3.1. Amostras-Teste.....	105
3.1.1. Extrato de <i>Rhodiola rosea</i> .....	105
3.1.2. L-carnosina.....	105

3.1.3. Associação entre o Extrato de <i>Rhodiola rosea</i> e o di-peptídeo L-carnosina.....	105
3.2. Estudos <i>In vitro</i> .....	107
3.2.1. Linhagem de queratinócitos humanos.....	107
3.2.2. Linhagem de fibroblastos humanos.....	108
3.2.3. Radiação Ultravioleta.....	109
3.2.4. Protocolo de irradiação e incubação das culturas celulares com as amostras-teste.....	110
3.2.5. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular.....	112
3.2.6. Quantificação de citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ .....	113
3.2.7. Mensuração da produção dos componentes da matriz extracelular.....	114
3.2.7.1. Colágeno.....	114
3.2.7.2. Elastina.....	114
3.2.8. Mensuração da produção e/ou atividade de MMP-1, MMP-9, MMP-13 e TIMP-1.....	115
3.2.9. Mensuração da produção $\beta$ -endorfina e Encefalina.....	116
3.2.10. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	118
3.2.10.1. DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina).....	118
3.2.10.2. Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD).....	119
3.3. Análise Estatística.....	121
3.4. Avaliação Histológica.....	121
3.4.1. Coleta do material e Preparo das amostras para tratamento com as amostras-teste.....	121

3.4.3. Realização dos Cortes Histológicos.....	123
3.5. Estudos Clínicos.....	124
3.5.1. Avaliação da Eficácia.....	124
3.5.1.1. Eficácia Subjetiva.....	124
3.5.1.1.1. Objetivo do Estudo.....	124
3.5.1.1.2. Relevância do Estudo e Aspectos Éticos...	125
3.5.1.1.3. Princípio Metodológico.....	126
3.5.1.1.4. Tipo de Estudo.....	127
3.5.1.1.5. Formulação e Aplicação do Produto.....	127
3.5.1.1.6. Voluntários.....	128
3.5.1.1.7. Benefícios do Estudo.....	132
3.5.1.1.8. Exigências Requeridas pelo Estudo.....	132
3.5.1.1.9. Controle de Observação e Modalidades de Protocolo.....	133
3.5.1.1.10. Apreciabilidade Cosmética e Eficácia Subjetiva.....	133
3.5.1.2. Eficácia Instrumental.....	135
3.5.1.2.1. Objetivo do Estudo.....	135
3.5.1.2.2. Relevância do Estudo e Aspectos Éticos...	135
3.5.1.2.3. Princípio Metodológico.....	137
3.5.1.2.4. Tipo de Estudo.....	137
3.5.1.2.5. Formulação e Aplicação do Produto.....	138

3.5.1.2.6. Voluntários.....	139
3.5.1.2.7. Benefícios do Estudo.....	140
3.5.1.2.8. Exigências Requeridas pelo Estudo.....	141
3.5.1.2.9. Controle de Observação e Modalidades de Protocolo.....	142
3.5.1.2.10. Áreas de Aplicação e Condições Experimentais.....	142
3.5.1.2.11. Avaliação Instrumental da Perda de Água Transepidérmica (TEWL).....	143
3.5.1.2.12. Avaliação Instrumental da Redução de Rugas (Melhora do Relevo cutâneo).....	144
3.5.2. Análise Estatística.....	146
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>149</b>
4.1. Resultados <i>In vitro</i> .....	151
4.1.1. Avaliação da citotoxicidade celular do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC).....	151
4.1.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) através da capacidade de seqüestrar radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e da capacidade biológica de estimular a produção das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos.....	153
4.1.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	153
4.1.2.2. SOD (Superóxido dismutase).....	155
4.1.2.3. CAT (Catalase).....	161

4.1.3. Avaliação dos efeitos da RUV, do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção dos neuropeptídeos proopiomelanocortina-derivados (POMCs) $\beta$ -endorfina e encefalina em cultura de queratinócitos humanos.....	168
4.1.3.1. $\beta$ -endorfina.....	168
4.1.3.2. Encefalina.....	174
4.1.4. Avaliação dos efeitos da RUV do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em cultura de queratinócitos humanos.....	180
4.1.4.1. IL-1 $\alpha$ (Interleucina-1 $\alpha$ ).....	180
4.1.4.2. TNF- $\alpha$ (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ).....	185
4.1.4.3. IFN- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ ).....	190
4.1.5. Avaliação dos efeitos da RUV, do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de matriz metaloproteinases (MMPs).....	195
4.1.5.1. MMP-1 (metaloproteinase-1).....	195
4.1.5.2. MMP-9 (metaloproteinase-9).....	200
4.1.5.3. MMP-13 (metaloproteinase 13).....	205
4.1.6. Avaliação dos efeitos da RUV, do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de inibidor de metaloproteinase tecidual-1 (TIMP-1) em cultura de fibroblastos humanos.....	212
4.1.6.1. TIMP-1 (Inibidor tecidual de metaloproteinase-1)	212

4.1.7. Avaliação dos efeitos da RUV, do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de colágeno e elastina.....	219
4.1.7.1. Colágeno.....	219
4.1.7.2. Elastina.....	225
4.2. Avaliação Histológica.....	232
4.2.1. Efeitos da associação entre o extrato de <i>Rhodiola rosea</i> e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC) em fragmentos de pele humana em condição basal e mediante exposição à RUVA/B.....	232
4.3. Avaliação Clínica.....	235
4.3.1. Eficácia Subjetiva.....	235
4.3.1.1. Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% (p/p) da associação entre o extrato de <i>Rhodiola rosea</i> e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC).....	235
4.3.1.1.1. Nível de Conforto da Pele.....	235
4.3.1.1.2. Nível de Ressecamento da Pele.....	236
4.3.1.1.3. Nível de Desconforto após Stinging-Test...	238
4.3.2. Eficácia Instrumental.....	241
4.3.2.1. Avaliação Instrumental da Perda de Água Transepidérmica (TEWL).....	241
4.3.2.2. Avaliação Instrumental do Efeito na Redução de Linhas Finas (Melhora do Relevo Cutâneo).....	244
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>247</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>289</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>297</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>323</b>

## LISTA DE TABELAS

---

	<u>Página</u>
<b>Tabela 1.</b> Citocinas expressas por células epidérmica.....	65
<b>Tabela 2.</b> Principais alterações sofridas pela pele durante o processo de envelhecimento decorrente de fatores intrínsecos (pele cronologicamente envelhecida) e extrínsecos (pele fotoenvelhecida)..	69
<b>Tabela 3.</b> Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus respectivos símbolos.....	79
<b>Tabela 4.</b> Principais Matrizes Metaloproteinases (MMPs) e seus respectivos substratos.....	83
<b>Tabela 5.</b> Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia subjetiva.....	127
<b>Tabela 6.</b> Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia subjetiva.....	128
<b>Tabela 7.</b> Critério de classificação para intensidade de pinicamento no Stinging-Test.....	129
<b>Tabela 8.</b> Classificação dos fototipos de pele de acordo com Fitzpatrick.....	131
<b>Tabela 9.</b> Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia instrumental.....	138
<b>Tabela 10.</b> Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia instrumental.....	139
<b>Tabela 11.</b> Porcentagens estimadas de respostas por produto e tempo – Nível de conforto da pele.....	235
<b>Tabela 12.</b> Porcentagens estimadas de respostas por produto e tempo – Nível de ressecamento da pele.....	236
<b>Tabela 13.</b> Contrastes entre placebo e ARRLC – Nível de ressecamento da pele.....	238

<b>Tabela 14.</b> Porcetagens estimadas de respostas por produto – Nível de desconforto da pele após Stinging-Test.....	238
<b>Tabela 15.</b> Média e desvio padrão da perda de água transepidérmica (TEWL) em cada tempo experimental.....	242
<b>Tabela 16.</b> Médias e desvios padrões dos valores de rugosidades (parâmetros Rm, Rz e Ra) em cada tempo experimental.....	244
<b>Tabela 17.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de IL-1 $\alpha$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	325
<b>Tabela 18.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de IL-1 $\alpha$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	325
<b>Tabela 19.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de TNF- $\alpha$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	326
<b>Tabela 20.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de TNF- $\alpha$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	326
<b>Tabela 21.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de IFN- $\gamma$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	327
<b>Tabela 22.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de IFN- $\gamma$ (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	327
<b>Tabela 23.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de $\beta$ -endorfina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	328
<b>Tabela 24.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de $\beta$ -endorfina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	328

<b>Tabela 25.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de encefalina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	329
<b>Tabela 26.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de encefalina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	329
<b>Tabela 27.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de colágeno (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	330
<b>Tabela 28.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de colágeno (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	330
<b>Tabela 29.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de elastina (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	331
<b>Tabela 30.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de elastina (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	331
<b>Tabela 31.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de catalase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	332
<b>Tabela 32.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de catalase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	332
<b>Tabela 33.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de superóxido dismutase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos.....	333
<b>Tabela 34.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de superóxido dismutase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC...	333
<b>Tabela 35.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 1 (MMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	334

<b>Tabela 36.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 1 (MMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	334
<b>Tabela 37.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	335
<b>Tabela 38.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	335
<b>Tabela 39.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 13 (MMP-13) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	336
<b>Tabela 40.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 13 (MMP-13) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	336
<b>Tabela 41.</b> Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.....	337
<b>Tabela 42.</b> Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.....	337
<b>Tabela 43.</b> Características Tipológicas das Voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidermica).....	338
<b>Tabela 44.</b> Controles de Observação-Modalidades de Aplicação das voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidermica).....	341

<b>Tabela 45.</b> Controles de Observação-Restrições das voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).....	342
<b>Tabela 46.</b> Tabela de Aleatorização para aplicação das formulações placebo e ARRLC 1% pelas voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).....	343
<b>Tabela 47.</b> Avaliação Instrumental da Redução da Perda de Água Transepidérmica (TEWL) de uma formulação contendo ARRLC 1% em comparação com o respectivo placebo em voluntárias humanas sadias.....	345
<b>Tabela 48.</b> Avaliação Instrumental do Efeito na Redução de Linhas Finas (Melhora do Relevo Cutâneo) de uma formulação contendo ARRLC 1% em comparação com o respectivo placebo em voluntárias humanas sadias.....	347
<b>Tabela 49.</b> Características Tipológicas das Voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).....	349
<b>Tabela 50.</b> Controles de Observação-Modalidades de Aplicação das voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).....	353
<b>Tabela 51.</b> Controles de Observação-Restrições das voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).....	354

## LISTA DE FIGURAS

---

	<u>Página</u>
<b>Figura 1.</b> Princípios da resposta do sistema neuro-imuno-endocrinológico frente ao estresse.....	67
<b>Figura 2.</b> Área foto-exposta.....	71
<b>Figura 3.</b> Área não foto-exposta.....	71
<b>Figura 4.</b> Espectro de ação solar e possíveis efeitos sobre a superfície da terra.....	75
<b>Figura 5.</b> Papel do estresse oxidativo no envelhecimento e em resposta à radiação ultravioleta (RUV).....	77
<b>Figura 6.</b> Mecanismos da Homeostase Redox: balanço entre a produção de ROS e os diferentes mecanismos anti-radicalares endógenos.....	80
<b>Figura 7.</b> Flor da espécie <i>Rhodiola rosea</i> .....	87
<b>Figura 8.</b> <i>Rhodiola rosea</i> em solo arenoso e seco na região da Sibéria.....	87
<b>Figura 9.</b> Raiz da espécie <i>Rhodiola rosea</i> .....	87
<b>Figura 10.</b> Rosavin.....	90
<b>Figura 11.</b> Rosin.....	90
<b>Figura 12.</b> Rosarin.....	90
<b>Figura 13.</b> Salirosídeo.....	90
<b>Figura 14.</b> L-carnosina.....	93
<b>Figura 15.</b> Metabolismo da carnosina nos tecidos.....	94
<b>Figura 16.</b> Simulador de radiação ultravioleta.....	110

<b>Figura 17.</b> Efeitos do extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina e da associação de ambos (ARRCG) sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos.....	151
<b>Figura 18.</b> Atividade do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC). A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade das amostras em seqüestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	153
<b>Figura 19.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Superóxido dismutase (SOD) em cultura de queratinócitos humanos.....	155
<b>Figura 20.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de superóxido dismutase (SOD) em cultura de queratinócitos humanos.....	157
<b>Figura 21.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos...	161
<b>Figura 22.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção da enzima catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos.....	163
<b>Figura 23.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de beta-endorfina em cultura de queratinócitos humanos.....	168
<b>Figura 24.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de beta-endorfina em cultura de queratinócitos humanos..	170
<b>Figura 25.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Leu-encefalina em cultura de queratinócitos humanos....	174
<b>Figura 26.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de Leu-encefalina em cultura de queratinócitos humanos.....	176

<b>Figura 27.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de IL-1 $\alpha$ em cultura de queratinócitos humanos.....	181
<b>Figura 28.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de IL-1 $\alpha$ em cultura de queratinócitos humanos.....	182
<b>Figura 29.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de TNF- $\alpha$ em cultura de queratinócitos humanos.....	185
<b>Figura 30.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de TNF- $\alpha$ em cultura de queratinócitos humanos.....	187
<b>Figura 31.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de IFN- $\gamma$ em cultura de queratinócitos humanos.....	190
<b>Figura 32.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de IFN- $\gamma$ em cultura de queratinócitos humanos.....	192
<b>Figura 33.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.....	196
<b>Figura 34.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.....	197
<b>Figura 35.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de MMP-9 em cultura de fibroblastos humanos.....	200
<b>Figura 36.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-9 em cultura de fibroblastos humanos.....	202
<b>Figura 37.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de MMP-13 em cultura de fibroblastos humanos.....	206
<b>Figura 38.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do dipeptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-13 em cultura de fibroblastos humanos.....	208

<b>Figura 39.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de TIMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.....	213
<b>Figura 40.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de TIMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.....	214
<b>Figura 41.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Colágeno total em cultura de fibroblastos humanos.....	220
<b>Figura 42.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de Colágeno total em cultura de fibroblastos humanos.....	221
<b>Figura 43.</b> Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos.....	226
<b>Figura 44.</b> Efeitos do extrato seco de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos.....	227
<b>Figura 45a e 45b.</b> Fragmentos de pele humana em condição basal – Controle Basal.....	232
<b>Figura 46a e 46b.</b> Efeitos da associação entre o extrato de <i>Rhodiola rosea</i> e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC) em fragmentos de pele humana em condição basal – ARRLC 1 mg/mL.....	233
<b>Figura 47a e 47b.</b> Fragmentos de pele humana mediante exposição à RUVA/B – RUVA/B 100 mJ/cm <sup>2</sup> /dia, 3 dias consecutivos.....	233
<b>Figura 48a e 48b.</b> Efeitos da associação entre o extrato de <i>Rhodiola rosea</i> e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC) em fragmentos de pele mediante exposição à RUVA/B – RUVA/B 100 mJ/cm <sup>2</sup> /dia, 3 dias consecutivos + ARRLC 1 mg/mL.....	233
<b>Figura 49.</b> Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre <i>Rhodiola rosea</i> e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo, sob condições normais de uso – Teste em uso sobre controle clínico.....	235

<b>Figura 50.</b> Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre <i>Rhodiola rosea</i> e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo, sob condições normais de uso – Teste em uso sobre controle clínico.....	237
<b>Figura 51.</b> Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre <i>Rhodiola rosea</i> e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo após <i>Stinging-Test</i> .....	238
<b>Figura 52.</b> Avaliação instrumental da perda de água transepidermica (Média dos valores de TEWL em cada tempo experimental).....	242
<b>Figura 53.</b> Laudo de análise do Extrato de <i>Rhodiola rosea</i> (ERR).....	355
<b>Figura 54.</b> Laudo de análise da L-carnosina.....	356
<b>Figura 55.</b> Avaliação da concentração total de rosavins em ARRLC...	357



# ***Resumo***

O envelhecimento cutâneo é resultado de dois processos independentes, clínica e biologicamente distintos, que afetam a pele simultaneamente. Ao primeiro, conhecido como “relógio biológico”, damos o nome de envelhecimento intrínseco, o qual afeta a pele na mesma proporção em que órgãos internos são afetados, como por exemplo, a lenta e irreversível degeneração tecidual. O segundo, denominado fotoenvelhecimento, é resultado da exposição da pele a agentes agressores ambientais, primeiramente radiação ultravioleta (RUV). Sobre o impacto da RUV, especialmente RUV A e RUV B, a pele passa por inúmeras alterações, incluindo hiperpigmentação, fotodano, alterações histológicas e imunológicas. Tendo em vista a complexidade do fotoenvelhecimento, podemos dividir este trabalho em duas partes, onde avaliamos em uma primeira etapa os efeitos da RUV sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele através da mensuração de parâmetros específicos em culturas de fibroblastos e queratinócitos humanos. Após a realização dos experimentos propostos para a primeira parte deste trabalho, passamos a considerar para a segunda etapa, a possível ação *in vitro* e *in vivo* do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) em associação com o dipeptídeo L-carnosina (LC) sobre a reversão ou controle dos efeitos deletérios da RUV sobre a pele. Nossos resultados demonstram que durante a foto-exposição, culturas celulares *in vitro* apresentaram importantes alterações nos parâmetros avaliados, especialmente após a exposição crônica, dentre elas: redução na produção de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , redução nos níveis de  $\beta$ -endorfina e encefalina, aumento na atividade de metaloproteinases (MMPs), inibição na atividade do inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1), redução nos níveis de colágeno e elastina e redução na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). No perfil de resposta das células tratadas com ERR, pudemos observar uma importante função adaptógena do extrato, onde na maioria dos parâmetros, constatamos uma modulação da resposta celular de forma dose dependente. Os resultados obtidos com L-carnosina foram

importantes, especialmente no que diz respeito aos níveis de colágeno, elastina e atividade das enzimas antioxidantes. Quando o perfil de resposta da associação entre ambos (ARRLC) é observado, pode-se perceber que, em alguns parâmetros, não houve uma potencialização dos efeitos. No entanto, dada a complexidade da resposta neuro-imuno-endócrina da pele relacionada ao fotoenvelhecimento, pode-se concluir que a utilização de compostos com mecanismos de ação distintos é imprescindível, uma vez que diferentes processos metabólicos levam ao dano tecidual e à aparência estética comprometida da pele fotoenvelhecida. Para a realização dos estudos clínicos, uma emulsão placebo ou emulsão contendo 1% de ARRLC foi utilizada pelas voluntárias em dois estudos independentes, sendo que o primeiro foi realizado durante 28 dias para avaliação dos parâmetros subjetivos – conforto da pele, redução da sensação de desconforto após Stinging-Test (ST) e melhora do ressecamento da pele. O segundo estudo foi realizado durante 56 dias, onde avaliou-se em D1, D28 e D56, a melhora do relevo cutâneo e a redução da perda de água transepidérmica. Os resultados obtidos demonstram que aproximadamente 90% das voluntárias reportaram uma melhora do conforto da pele e 75% reportaram redução do ressecamento. Além disso, a utilização da emulsão contendo 1% de ARRLC apresentou uma redução de aproximadamente 36% na sensação de desconforto após ST. Além disso, o tratamento com a emulsão contendo 1% de ARRLC resultou em redução considerável da perda de água transepidérmica e na melhora do relevo cutâneo. Estes resultados clínicos, associados aos resultados obtidos *in vitro*, nos encorajam a sugerir o uso de ARRLC como alternativa terapêutica no tratamento tópico do fotoenvelhecimento.



# ***Abstract***

## **ABSTRACT**

---

Cutaneous ageing is a complex biological phenomenon consisting of two components; intrinsic ageing, which is largely genetically determined and extrinsic ageing caused by environmental exposure, primarily UV light. Under the impact of ultraviolet radiation (UVR), skin undergoes several changes, including enhanced pigmentation, photodamage and immunosuppression. Because photoaging culminates in important alterations in skin function and appearance, we can separate this work in two different phases. In the first phase, we evaluated the effects of ultraviolet radiation (UVR) on skin neuro-immune-endocrinological response through the measurement of specific parameters in fibroblasts and keratinocytes human cell cultures. After the conclusion of experiments proposed for the first phase of this work, the possible *in vitro* and *in vivo* effects of *Rhodiola rosea* extract (ERR) in combination to di-peptide L-carnosine (LC) in the control of deleterious effects of UVR exposure on the skin were evaluated. Our results demonstrated that during the UVR, the cell cultures promoted crucial alterations in the parameters evaluated, mainly after chronic exposure. The alterations observed were: the reduction in the production of IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,  $\beta$ -endorphin and enkephalin, reduction in the levels of matrix metalloproteinase tissue inhibitor-1, increase of metalloproteinase activity, reduction of collagen and elastin production and inhibition of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. In the cell groups that received ERR, we observed an important adaptogenic function of the extract, because in the majority of the parameters, it was able to modulate the cell response in a dose-dependent manner. The results obtained in the LC treated groups, we could also observe important effects, mainly in collagen and elastin synthesis and in the antioxidant enzymes activities. When we consider the response obtained with the association of both ERR and LC (ARRLC), we could see that it is not able to enhance the effects obtained with ERR or LC separately. Therefore, due to the complexity of the neuro-immune-endocrinological response during the photoaging, we can conclude that the use of compounds with different

mechanisms of action is crucial, because distinct metabolic process lead to tissue damage and terrible appearance of photodamaged skin. For the clinical trials, a placebo emulsion or a emulsion containing 1% of ARRLC were used by the volunteers in two independent studies, in which the first one was performed during 28 days for evaluation of subjective parameters, including skin comfort, reduction of skin dryness sensation and reduction of skin discomfort sensation after Stinging-Test (ST). The second study was performed during 56-days and the evaluations were carried out on D1, D28 and D56. The parameters evaluated were the improvement of cutaneous relief and the reduction of transepidermal water loss. The obtained results demonstrated that approximately 90% of the volunteers perceived an increase in skin comfort and 75% reported reduction of skin dryness sensation. In addition, the emulsion containing 1% of ARRLC was able to reduce in approximately 36% the sensation of discomfort after ST. These clinical results and the *in vitro* findings, encourage us to suggest the use of ARRLC as alternative ingredient in the topical treatment of skin photoaging.



# ***Introdução***

## 1.1. Contexto Histórico e Dados Epidemiológicos

Historicamente, a busca pela manutenção da aparência jovem e saudável é desde a antiguidade uma das maiores preocupações da humanidade (Rocquet e Bonté, 2002).

A influência e o poder da beleza nas relações humanas têm sido evidenciados desde o advento da escrita, onde influentes personalidades da época mencionaram a sua importância. Para Platão (século V a. C), beleza era uma das maiores preocupações da humanidade, seguida de boa saúde e riqueza. Aristóteles (século IV a. C), por sua vez, afirmava que “a beleza é para o homem tão importante quanto algumas letras de seu nome”.

Dados mais antigos, que relatam hábitos de alguns povos, mostram que nem mesmo condições desfavoráveis e catastróficas eram capazes de evitar a busca por ferramentas que evidenciassem a beleza. Regiões continentais onde a fome prevalece e a miséria é intensa, como no continente sul africano, a população aplicava gordura animal, muitas vezes única fonte alimentar, como hidratante para a pele (Berneburg et al., 2000).

Similarmente, a nobreza francesa do século XVIII usava farinha em pó como forma de corrigir pequenas imperfeições e aparentar-se mais jovem e imponente (Farage et al., 2008). No início da civilização grega surgiram os primeiros termos numéricos como forma de mensurar as perfeições estéticas relacionadas à simetria e às medidas proporcionais (Fitzpatrick et al., 1993).

Essa busca incansável pela beleza, aliada à preocupação com a manutenção da aparência jovem e saudável, além de apresentar antecedentes históricos é um dos maiores ícones da população mundial atual. Dentro deste conceito, a prevenção do envelhecimento e a descoberta de substâncias capazes de promover a juventude eterna compreendem uma das mais abrangentes áreas da medicina moderna.

Dados epidemiológicos recentes demonstram que a humanidade está envelhecendo. O crescimento da população de idosos, em números absolutos e relativos, é um fenômeno mundial e está ocorrendo a um nível sem precedentes. Em 1950, eram cerca de 204 milhões de idosos no mundo e, já em 1998, quase cinco décadas depois, este contingente alcançava 579 milhões de pessoas, um crescimento de quase 8 milhões de pessoas idosas por ano. As projeções indicam que, em 2050, a população idosa será de 1,9 milhão de pessoas, montante equivalente à população infantil de 0 a 14 anos de idade. Além disso, a média da expectativa de vida da população mundial, principalmente daquelas que vivem nos centros industrializados, dobrou no último século (Andrews, 2000).

No Brasil, segundo dados baseados no censo de 2000 realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os idosos representavam aproximadamente 8,6% da população brasileira, correspondente a quase 15 milhões de pessoas com 60 anos ou mais. Ainda conforme estimativas do órgão, nos próximos 20 anos a população idosa do Brasil poderá ultrapassar os 30

milhões de pessoas e deverá representar quase 13% do total de habitantes (Brasil, 2002).

Com base nesses números, somados ao aumento da expectativa de vida deste século, é visível a necessidade de um investimento cada vez maior em produtos e serviços que contemplem e estejam adequados a este grande público-alvo.

Estas ocorrências resultaram em mudanças drásticas no meio social, econômico e na área da saúde (Rocquet e Bonté, 2002). Neste contexto, o grande envolvimento das áreas médicas relacionadas à estética, especialmente a dermatologia se deve, em parte, à localização anatômica da pele, o que acarreta na sua exposição às agressões extrínsecas e intrínsecas, tornando-a a forma mais expressiva de demonstração do grau de envelhecimento (Glogau, 1998).

## **1.2. A Pele como Órgão Neuro-Imuno-Endocrinológico**

Segundo Holbrook (1983), pele é definida como um conjunto de tecidos, com organização estratificada, que reveste o corpo e apresenta componentes estruturais e metabólicos que trabalham em sintonia com o meio ambiente para manter a saúde do ser que envolve (Holbrook, 1983). Representando 10 a 12% do peso corpóreo, caracteriza-se como o maior órgão do corpo humano, com uma área de aproximadamente 1,5 m<sup>2</sup> e espessura média de 3 mm (Breathnach, 1974).

Anatomicamente, a pele serve como uma barreira que separa o meio externo da homeostase interna. Apresenta-se como um complexo órgão com múltiplos tipos de células e estruturas, dividindo-se em três camadas distintas: derme, epiderme e tecido subcutâneo. A epiderme é a camada mais superficial composta principalmente por queratinócitos – que representam a maior população de células da pele –, melanócitos – responsáveis pela produção de melanina – e pelas células de Langerhans ou macrófagos residentes – responsáveis pela apresentação de antígenos. A derme, também chamada tecido conectivo da pele, por sua vez, é composta principalmente de colágeno e elastina. Fibras colagênicas representam 70-80% do peso seco da pele e conferem à derme sua integridade estrutural e mecânica. Apesar de presente em menor proporção, a elastina desempenha a importante propriedade elástica da pele, representando 2-4% da matriz extracelular (MEC). Denominada junção dermoepidérmica (JDE), a membrana responsável por separar a derme da epiderme é composta principalmente destas proteínas da matriz extracelular (MEC) produzidas por fibroblastos residentes (Tzaphlidou, 2004).

Dependendo da localização anatômica e das influências externas, a pele apresenta consideráveis diferenças funcionais e estruturais (Ackerman, 1997; Fitzpatrick et al., 1993; Slominski e Wortsman, 2000; Goldsmith, 2003). Isto se deve ao fato da contínua exposição às variações ambientais, como radiação solar e térmica, energia mecânica, alterações de umidade e/ou insultos químicos e biológicos. A manutenção da integridade estrutural da pele é, portanto, crítica e deve ser servida de rápidos mecanismos de restauração. A preservação da pele,

e conseqüentemente da homeostasia sistêmica, requer uma propriedade especial e uma capacidade de reconhecer e integrar sinais apropriados com alto grau de especificidade. Assim, mecanismos sensoriais devem ser amplamente distribuídos e auto-regulados em intensidade e modo de ação, sendo altamente capazes de diferenciar danos ambientais de sinais biológicos relevantes (Slominski et al., 2000a; Slominski e Mihm, 1996). De maneira geral, estes mecanismos são representados pelo sistema imunológico cutâneo, juntamente com o sistema pigmentar, ativado ou modificado pela radiação solar (Slominski e Pawelek, 1998; Slominski et al., 1993). Todavia, uma estreita relação antômofisiológica entre a pele, o sistema imunológico e o sistema nervoso, sugere o envolvimento de um complexo e unificado sistema de defesa, recentemente descrito como sistema neuro-imuno-endocrinológico da pele (Misery, 1997; Misery, 2000).

Nas últimas décadas, muitos autores afirmam que a pele, particularmente representada pela epiderme e derme, apresenta uma intensa atividade metabólica e endocrinológica (Grando, 1993). Prova desta habilidade é a vitamina D, que sintetizada na pele, atinge a circulação sistêmica e exerce profundos efeitos endócrinos e metabólicos (Holick, 1994; Kragballe, 1996). Células residentes na pele também sintetizam e liberam uma grande quantidade de hormônios e neurotransmissores, dentre eles hormônio paratireoidiano (PTH) (Philbrick et al., 1996), peptídeos proopiomelanocortina-derivados (POMCs), hormônio estimulador de melanócitos (MSH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), beta-endorfina e encefalinas (Slominski et al., 2000b; Slominski et al.,

1993; Luger et al., 1999), hormônio liberador de corticotropinas (CRH), peptídeos urocortinas (Slominski et al., 1998; Slominski et al., 2000b), os neurotransmissores catecolaminas e acetilcolina (Grando e Orton, 1997; Schallreuter et al., 1994), e os precursores das aminas biogênicas (Schallreuter et al., 1993; Schallreuter et al., 1995; Slominski e Pawelek, 1998; Slominski e Paus, 1990). A produção destes fatores não é constitutiva, respondendo, desta forma, a estímulos indutores específicos. Além disto, a pele também é palco para a ativação de hormônios esteróides, como a conversão de testosterona em 5-alfa-dihidrotestosterona ou em estradiol e a conversão de T4 em T3 (Milstone e Edelson, 1988; Grando, 1993; Goldsmith, 2003). Todas estas substâncias produzidas local ou sistemicamente atuam em receptores específicos, recentemente descritos na pele (Quatresooz et al., 2007).

A regulação dos mecanismos de defesa da pele é também crucial na homeostasia local e sistêmica, desempenhando um papel fundamental na patogênese e controle de uma variedade de desordens cutâneas, incluindo psoríase, dermatite de contato alérgica e irritativa, líquen plano, alopecia aerata e vitiligo (Boh e Millikan, 1992; Kadunce e Krueger, 1995; McDonagh e Messenger, 1996; Porter et al., 1997; González et al., 1998; Galli, 2003; Kupper e Fuhlbrigge, 2004).

O maior mecanismo usado pelas células da pele para participar dos mecanismos imunológicos e inflamatórios é a produção de citocinas, bem como a resposta à ação destas citocinas. Queratinócitos são os maiores produtores destes sinalizadores, juntamente com melanócitos e células de Langerhans

(William e Kupper, 1996). Células epidérmicas podem produzir, constitutivamente ou mediante ativação, um arsenal destas substâncias, suportando fortemente a idéia de que a pele é um órgão altamente imunocompetente, exercendo o importante papel de barreira imunológica. A tabela 1 descreve as principais citocinas produzidas pelas células epidérmicas.

Células Epidérmicas	Citocinas (expressão constitutiva ou induzida)
Queratinócitos	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, MCSF, MIP-1 $\alpha$ , IP-10, MCP-1, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$
Células de Langerhans	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIP-2, MIP-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$
Melanócitos	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, MCSF, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$

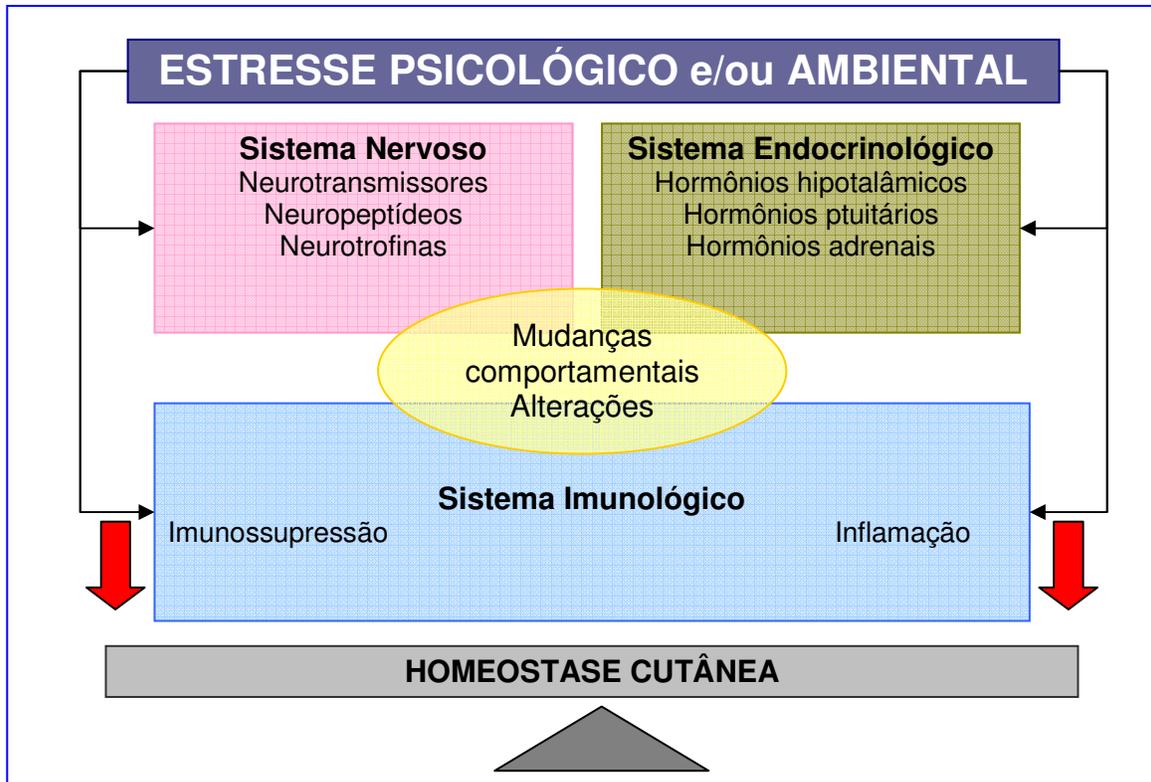
**Tabela 1.** Citocinas expressas por células epidérmicas. (William e Kupper, 1996; Corsini e Galli, 2000; Kupper e Fuhlbrigge, 2004).

Nas duas últimas décadas, tem sido demonstrado que os queratinócitos, que representam 95% do total das células localizadas na epiderme, desempenham um importante papel nas reações cutâneas às agressões externas e na perpetuação das respostas imunológicas e inflamatórias (McKenzie e Sauder, 1990). Enquanto os queratinócitos produzem muitas citocinas de forma constitutiva, uma variedade de insultos ambientais como agentes carcinogênicos, substâncias químicas e RUV, pode induzi-los à liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 alfa e beta, TNF-alfa), quimiotáticas (IL-8, IP-10), indutoras de crescimento (IL-6, IL-7, IL-15, GM-CSF, TGF-alfa e beta) e àquelas reguladoras da imunidade humoral e celular (IL-10, IL-12, IL-18) (William e Kupper, 1996).

Hormônios, neurotransmissores e citocinas gerados localmente podem atuar tanto de forma parácrina quanto de forma autócrina imediata. Todavia, a presença de numerosas terminações nervosas, juntamente com uma rica rede vascular fornece mecanismos adicionais para a expressão das funções neuroendócrinas, como por exemplo, a transmissão de sinais regulatórios para o sistema nervoso central via sistema vascular ou através de redes neurais aferentes (Slominski e Wortsman, 2000).

Este conceito emergente que classifica a pele como órgão neuro-imuno-endocrinológico, é relativamente novo no campo da biologia cutânea, combinando conceitos de imunologia, endocrinologia e neurobiologia para descrever as comunicações multidirecionais que ocorrem entre o cérebro, os sistemas imunológico e endocrinológico e os órgãos periféricos (Blalock, 1989; Besedovsky e Del Rey, 1996; Pennisi, 1997; Pons et al., 2006 ). A coordenada ativação e eventual *downregulation* destes três sistemas, garantem a equilibrada resposta às diferentes formas de estresse. No entanto, um desequilíbrio em qualquer etapa desta estreita relação pode levar à exacerbação das respostas imunológicas, com conseqüente alteração da homeostase sistêmica (Figura 1) (Paus et al., 2006).

Neste contexto, a pele desempenha um papel único devido à sua localização, tamanho, e relativa diversidade funcional. Assim, sinais cutâneos enviados para centros neuroendócrinos podem exercer papéis modulatórios significativos. Todavia, a comunicação entre órgãos periféricos e demais sistemas também é crucial para a manutenção da homeostase local e global.



**Figura 1.** Princípios da resposta do sistema neuro-imuno-endócrino frente ao estresse (adaptada de Paus et al., 2006).

A grande exposição da pele às agressões externas, associada a fatores genéticos, endocrinometabólicos, imunológicos e outros elementos intrínsecos, faz com que a suscetibilidade do tecido cutâneo aos eventos relacionados ao envelhecimento seja mais característica e demasiadamente evidente.

Durante anos, buscam-se alternativas para interromper, reverter ou controlar as alterações que ocorrem na pele durante o processo de envelhecimento.

### **1.3. Envelhecimento Cutâneo**

Envelhecimento cutâneo (EC) representa um insidioso, multifatorial e progressivo processo degenerativo, de curso inevitável, e praticamente irreversível (West, 1994). É tido como resultado de dois processos sinérgicos de envelhecimento: envelhecimento intrínseco ou cronológico e envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento (Trautinger, 2001; Ma et al., 2001). Envelhecimento intrínseco ou cronológico é definido como sendo um processo geneticamente programado, portanto independente dos fatores externos ou ambientais, podendo ser disparado ou agravado por fatores neuro-hormonais. Por outro lado, o envelhecimento extrínseco, também conhecido como fotoenvelhecimento, corresponde às mudanças ocorridas na pele devido ao estilo de vida, sendo influenciado, sobretudo, pela radiação ultravioleta (UV), seguido pelos produtos químicos, tabagismo, calor e demais insultos ambientais. Ambos aceleram as alterações sofridas pelo tecido cutâneo durante o processo de envelhecimento (Pageon e Assenileau, 2005), alterando direta ou indiretamente o complexo sistema neuro-imuno-endocrinológico da pele (Misery, 2000).

As principais alterações clínicas e histopatológicas sofridas pela pele em decorrência dos diferentes tipos de agressões, foram descritas por Bologna (1995) e Ramos-e-Silva e Carneiro (2007), conforme tabela 2.

	<b>Pele Fotoenvelhecida</b>	<b>Pele Cronologicamente Envelhecida</b>
<b>Alterações Clínicas</b>	Espessa e nodular	Fina
	Amarela	Clara, quase transparente
	Rugas grosseiras	Rugas finas
	Áspera	Lisa
	Teleangiectasias freqüentes e equimoses	Raras teleangiectasias e equimoses
	Múltiplas lentigens	Raras lentigens de tom claro
	Pigmentação não-uniforme de diferentes tonalidades	Pigmentação eventual
	Elastótica, frouxa	Inelástica, perda de firmeza
	Comedões	Cravos brancos
	Sudorese reduzida	Sudorese reduzida
	Ressecamento marcante e descamação	Ressecamento e pouca descamação
	Rachaduras e ausência de pêlos	Frágil
	Queratose seborréica e outras queratoses	Raras queratoses e queratose seborréica
	Número aumentado de lesões pré-malígnas	Lesões pré-malígnas ocasionais
Número aumentado de lesões malignas	Lesões malignas ocasionais	
<b>Alterações Histopatológicas Epidérmicas</b>	Espessamento reativo, com considerável atrofia epidérmica	Leve alteração na espessura
	Células atípicas	Diminuição da JDE
	Perda de polaridade	Menor contato dermo-epidérmico
	Variabilidade na morfologia das células basais	Células basais praticamente normais
	Aumento da melanogênese	Diminuição no número e função dos melanócitos
Notável redução no número e função das LC	Moderada redução no número e função das LC	
<b>Alterações Histopatológicas Dérmicas</b>	Zona de Grenz presente	Zona de Grenz ausente
	Espessura reduzida, fibras elásticas não-funcionais degradadas	Redução no volume total
	Aumento do material elastótico amorfo	Redução da celularidade
	Aumento da collagenogênese	Degeneração de elastina
	Aumento do colágeno solúvel	Redução do colágeno solúvel
	Fibroblastos ativados	Perda de fibroblastos proeminentes
	Redução do colágeno maduro (insolúvel)	Aumento do colágeno maduro (solúvel)
	Aumento da atividade de collagenases	Perda das fibras de oxitânicas (elastogênicas)
	Colágeno fragmentado	Risco de ocorrência de quebra das ligações de colágeno
	Aumento de GAGs e proteoglicanas	Aumento de GAGs e proteoglicanas
	Notável regressão e desorganização dos pequenos vasos sanguíneos	Regressão menos notória e desorganização dos pequenos vasos sanguíneos
	Inflamação perivenular crônica	Ausência de evidências de inflamação
	Redução no número e função das glândulas sudoríparas	Redução no número e função das glândulas sudoríparas
	Importante aumento no tamanho das glândulas sebáceas, porém com diminuição da função	Aumento no tamanho das glândulas sebáceas, porém com diminuição da função

**Tabela 2.** Principais alterações sofridas pela pele durante o processo de envelhecimento decorrente de fatores intrínsecos (pele cronologicamente envelhecida) e extrínsecos (pele fotoenvelhecida) (Bologna, 1995; Benedetto, 1998; Ramos-e-Silva e Carneiro, 2007).

Macroscopicamente, o envelhecimento intrínseco leva às consideráveis mudanças, que incluem atrofia dérmica, enrugamento, aspereza, perdas de elasticidade e de gordura subcutânea. A grave aparência deste processo, por sua vez, deve-se às mudanças histológicas drásticas representadas principalmente por atrofia profunda da arquitetura dérmica, com redução no número e função dos fibroblastos, destruição de importantes estruturas protéicas – especialmente colágeno e elastina –, bem como uma alteração na homeostase celular proliferativa, resultando em lesões muitas vezes malignas ou irreversíveis (Robert et al., 2004a; Robert et al., 2004b; Besne et al., 2002; West, 1994; Uitto, 1989).

Além disso, ocorre uma redução no número e tamanho das células epiteliais que podem comprometer a proteção, excreção, absorção, termo-regulação, pigmentação, percepção sensorial e regulação dos processos imunológicos. Com o envelhecimento, queratinócitos e fibroblastos diminuem em número e passam a ter menor capacidade de produção e resposta aos diferentes hormônios e fatores de crescimento (Varani et al., 2001).

Com o fotoenvelhecimento, a superfície da pele torna-se áspera, com inúmeras manchas e rugas profundas. Histologicamente, a pele fotoenvelhecida mostra alteração nos queratinócitos, diminuição no tamanho dos melanócitos, que aumentam em número e distribuem-se irregularmente. As rugas, sinais mais claros do EC, por sua vez, são formadas por uma combinação de fatores tais como movimentos repetitivos da musculatura, tabagismo e desidratação (Ramos-e-Silva e Carneiro, 2007).

Comparações clínicas visuais entre áreas da pele expostas à RUV mediante fotoproteção e não-fotoprotetida, revelam que as principais alterações na aparência da pele relacionadas ao EC decorrem primariamente da exposição solar (Ramos-e-Silva e Carneiro, 2007). Estudos histológicos e ultra-estruturais têm revelado que a pele fotoenvelhecida está associada ao aumento da espessura da epiderme e às alterações na organização do tecido conectivo. Segundo Lavker (1995), as alterações na organização fibrilar de colágeno e elastina são mais severas na pele fotoenvelhecida, quando comparada à pele cronologicamente envelhecida (Lavker, 1995). As figuras 2 e 3 representam as alterações macroscópicas que evidenciam as diferenças entre uma área foto-exposta e uma área protegida da pele de uma mesma pessoa.



**Figura 2.** Área foto-exposta\*.



**Figura 3.** Área não foto-exposta\*.

\* Mulher caucasiana de 85 anos, fototipo de pele III (Fitzpatrick). Fotos com permissão de Blackwell Publishing: Ramos-e-Silva e Carneiro *Journal of Cosmetic Dermatology* 2007; **6**: 40-50.

Outro aspecto de importância significativa diz respeito ao EC relacionado ao grau de pigmentação da pele. Lavker et al. (1995) afirma que a severidade do fotoenvelhecimento é proporcional à cronicidade da exposição solar e inversamente proporcional ao grau de pigmentação da pele. Assim, indivíduos de pele clara são mais susceptíveis aos danos inerentes ao envelhecimento induzidos pela RUV do que indivíduos que apresentam tonalidades mais escuras da pele (Lavker et al., 1995).

Apesar de historicamente o envelhecimento extrínseco e o envelhecimento cronológico serem considerados entidades distintas, evidências recentes indicam que ambas as formas de EC decorrem dos mesmos mecanismos moleculares e bioquímicos, incluindo alterações nos sinais de transdução das vias que promovem a expressão das enzimas de degradação protéica, redução na síntese de pró-colágeno, e conseqüente dano ao tecido conjuntivo (El-Domyati et al., 2002). Estes mecanismos similares sugerem que a RUV acelera os principais aspectos envolvidos no processo cronológico do EC (Uitto, 2008).

Estudos mais abrangentes e conclusivos relacionados à biologia do EC têm sido descritos recentemente, depois de décadas de estagnação. Acredita-se que o envelhecimento da pele, a marca mais pronunciada e de maior preocupação estética durante o processo cronológico de envelhecimento, destaca-se no meio científico atual como sendo um dos campos mais explorados da área médica mundial (Uitto, 2008).

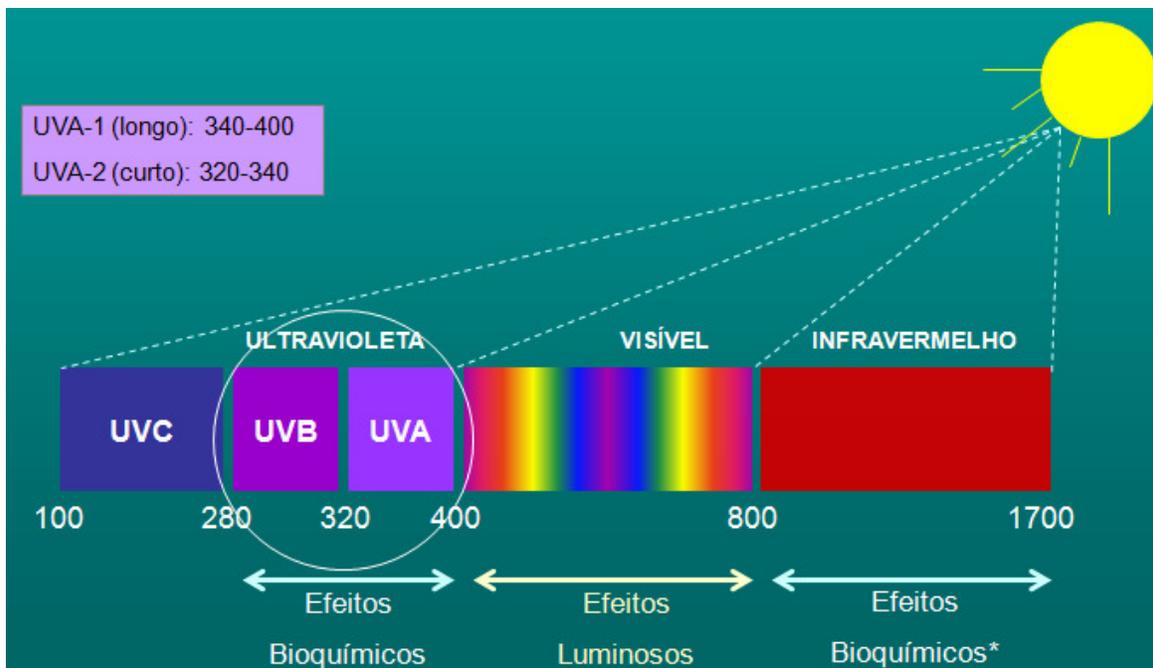
Muitos fatores neuro-imuno-endocrino-metabólicos são considerados importantes e cruciais durante o processo de EC, sendo direta ou indiretamente ativados pela exposição da pele à RUV ou a outros insultos ambientais. Dentre eles destacam-se a formação ou ativação de radicais livres, oxidação protéica, alterações na matriz dérmica, danos ao DNA celular, envolvimento de telomerasas e outras enzimas de degradação, diminuição da produção de derivados POMC, aumento considerável do grau de sensibilidade da pele e, mais recentemente, o grande envolvimento do especializado sistema imunológico da pele (Teofoli et al., 1997; Roosterman et al., 2006).

#### **1.4. Radiação Ultravioleta (RUV), Estresse Oxidativo e Senescência Celular**

A radiação ultravioleta (UV) é um dos principais fatores ambientais que afetam a saúde humana. O espectro eletromagnético emitido pelo sol compreende, principalmente, a faixa do ultravioleta (UV), com comprimentos de onda que variam de 100 a 400 nm. O espectro UV por sua vez subdivide-se em três unidades distintas: UVC (100 – 280 nm), que não chega à superfície da terra, sendo ainda absorvido pelas camadas de ozônio; UVB (280 – 320 nm) e UVA (320 – 400 nm), que ainda pode ser subdividido em curto ou UVA-I (320 – 340 nm) e UVA longo ou UVA-II (340 – 400 nm) (Wentzell, 1996; Kligman, 1982; Wang et al., 2001). Além dos raios UV, também tem despertado interesse da comunidade científica a radiação do tipo infravermelho (RIV), com comprimentos de ondas acima de 800nm. Dados sugerem que mudanças histológicas induzidas pela exposição prolongada à RIV são similares àsquelas induzidas pela

exposição crônica ao UV (Bernstein, 1995; Schieke, 2003). Desta forma, a radiação IV em combinação com as radiações UV contribui para o fotoenvelhecimento (Kligman, 1982; Bernstein, 1995; Schieke, 2003).

A energia das RUVs é inversamente proporcional ao comprimento de onda, ou seja, o conteúdo de energia emitida aumenta à medida que o comprimento de onda diminui (Costin et al., 2007). Desta forma, a RUV-A tem a capacidade de atingir camadas mais profundas da pele, quando comparada à RUV-B (Costin et al., 2007) (Figura 4). Os raios UVA atingem unidades mais profundas da derme, tornando-se os principais responsáveis pelo fotoenvelhecimento. Por outro lado, mesmo atingindo camadas mais superficiais, os raios UVB podem chegar até a derme papilar e provocar alterações às fibras de colágeno e elastina, bem como à atividade metabólica dos fibroblastos residentes. Desta forma, ambos os espectros de radiação solar contribuem consideravelmente ao fotoenvelhecimento, alterando principalmente a estrutura e a função dos tecidos e células (Lowe e Shaath, 1997; Gilchrest, 1996; Wang et al., 2001; Costin et al., 2007).



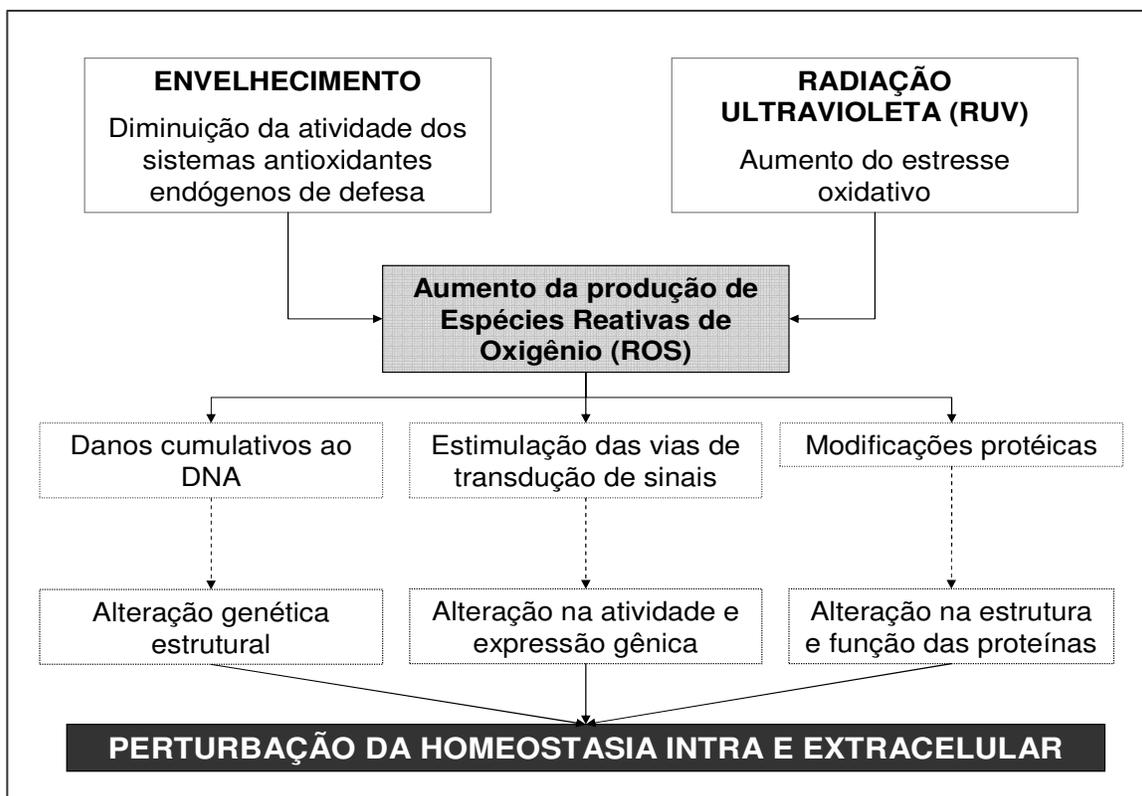
**Figura 4.** Espectro de ação solar e possíveis efeitos sobre a superfície da terra.

Os primeiros eventos cutâneos induzidos pela exposição à RUV são as conseqüências diretas da absorção dos fótons pelo DNA celular (Costin et al., 2007). Em resposta à à RUV-B, a pele desenvolve eritema, seguido normalmente de hiperpigmentação e espessamento da epiderme (Gasparro et al., 1998). Por outro lado, cromóforos celulares absorvem RUV-A, induzindo uma diversidade de reações indiretas que desencadeiam o estresse oxidativo e conseqüente formação de radicais-livres (RL) (Pourzand e Tyrrell, 1999; Césarine et al., 2003).

Muitos estudos relacionados ao EC apontam os radicais livres (RL) como os agentes mais envolvidos neste processo, participando, direta ou indiretamente, de todas as etapas que determinam a sinalização e ativação de da resposta celular, que culminam a longo prazo, na senescência celular.

Segundo Epe (1998), a principal causa da formação excessiva de RL na pele é a RUV. A exposição cutânea à RUV, especialmente de forma crônica, aumenta a quantidade de peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (Masaki et al., 1995; Jurkiewicz and Buettner, 1996; Barber et al., 1998; Brenneisen et al., 1998; Yasui and Sakurai, 2000) e diminui a atividade das enzimas antioxidantes. Estes achados são também observados durante o EC intrínseco. Em ambos os casos, o aumento da produção de ROS altera a estrutura e função dos genes e proteínas, levando ao dano na pele (Figura 5).

Moléculas orgânicas absorvem luz ou radiação UV e são excitadas devido à transferência de um elétron para uma órbita superior. A molécula excitada é um radical livre (RL), que pode causar reações secundárias, denominadas reações de propagação, bem como danos à várias moléculas constitutivas. O ATP (trifosfato de adenosina), molécula de energia armazenada, é produzida por fosforilação oxidativa no interior da mitocôndria. Esta energia é resultado da oxidação de nutrientes via cadeia respiratória. Todavia, a mitocôndria também regula a concentração de cálcio intracelular e a apoptose. Desta forma, o aumento anormal do potencial de membrana gerado pelo excesso de ROS leva à mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), principal indicativo do EC (Epe, 1998).



**Figura 5.** Papel do estresse oxidativo no envelhecimento e em resposta à radiação ultravioleta (RUV): ambos RUV e envelhecimento levam a um aumento de ROS, o que acarreta em alterações genéticas e na função e estrutura das proteínas. Como resultado, ocorre uma perturbação da homeostase intra e extracelular que podem modificar a integridade e às interações célula-matriz, levando à perda de função.

O metabolismo energético celular normal leva a uma maior formação de ROS, primeiramente via ciclo de Krebs, mas também através da transferência de energia por muitos cromóforos endógenos absorvedores de RUV, incluindo NADH/NADPH, triptofano, riboflavina e ácido trans-urocânico. Assim, elétrons excedentes são doados para um oxigênio molecular ( $O_2$ ), gerando aniôn superóxido ( $\bullet O_2^-$ ). O  $\bullet O_2^-$  é reduzido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  formado, por sua vez, é reduzido à água ( $H_2O$ ) pela enzima catalase e glutatona peroxidase (GP). No entanto, o  $H_2O_2$  pode ser convertido, na presença de metais, a um radical hidroxila ( $\bullet OH$ )

altamente citotóxico. Todas as formas de ROS (Tabela 3) podem danificar direta ou indiretamente as principais macromoléculas teciduais, através da indução da atividade das proteínas de “*down-regulation*”, que por sua vez, induzem a atividade de enzimas de degradação. (Wallace e Melov, 1998; Fukagawa, 1999). Todo este processo favorece ou acelera o EC.

Outra forma de dano oxidativo é a peroxidação lipídica da membrana celular. Quando peroxidada, a membrana perde sua permeabilidade, tornando-se rígida, reativa e não funcional. A peroxidação de lipídios pode produzir  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{LOO}^\cdot$ . Em adição, muitos derivados aldeídicos são formados durante a peroxidação da membrana lipídica, particularmente malonaldeído (MDA, propanodiol), principal metabólito do ácido araquidônico, e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Bemeburg, 2000).

Para tentar reverter o processo oxidativo danoso, um mecanismo denominado homeostase redox (HR), é utilizado pelas células como forma de defesa endógena. RL e espécies não-radicalares ou não-reativas estão presentes nas células e tecidos em baixas, mas mensuráveis concentrações. Estas concentrações são determinadas pelo balanço entre a sua produção e sua eliminação por vários compostos antioxidantes e enzimas, conforme detalhado na figura 6. Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), antioxidantes são substâncias capazes, mesmo em baixas concentrações, de competir com substratos celulares oxidáveis, e então diminuir ou inibir significativamente a oxidação, preservando a sua estrutura e função. Esta definição inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GP) e catalase, além de

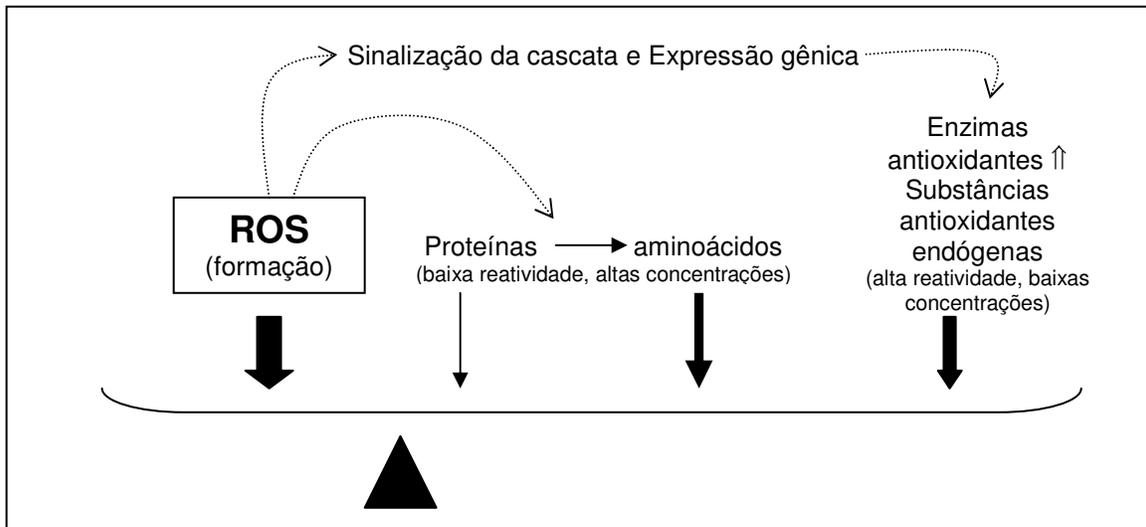
agentes redutores não-enzimáticos, como alfa-tocoferol (vitamina E), betacaroteno ( $\beta$ -caroteno), ácido ascórbico e seus sais (vitamina C) e glutathione (Benzi et al., 1992; Rego e Oliveira, 1995; Makar et al., 1994; Dröge, 2002).

Durante o processo de envelhecimento, há uma considerável diminuição dos níveis plasmáticos destes antioxidantes endógenos associado ao aumento dos marcadores de danos oxidativos, como os produtos de degradação lipídica (Nuttall et al., 1998; Pincemail et al., 2001). Em adição, há compostos, como aminoácidos, peptídeos e proteínas, que apresentam baixa atividade antioxidante, mas quando presentes em altas concentrações no sistema, podem contribuir significativamente no seqüestro dos radicais livres formados, evitando os danos decorrentes da atividade radicalar (Dröge, 2002).

Radicais Livres (RL) e suas Funções Fisiológicas	
Radical Livre (RL)	Símbolos
Hidroxila	$\bullet\text{OH}^-$
Superóxido	$\bullet\text{O}_2^-$
Óxido Nítrico	$\text{NO}\bullet$
Peroxinitrito	$\text{ONOO}^-$
Oxigênio <i>singlet</i>	$^1\text{O}_2$
Peróxido de hidrogênio	$\text{H}_2\text{O}_2$
Peróxido lipídico	$\text{LOO}^-$

**Tabela 3.** Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus respectivos símbolos. (adaptada de Dröge, 2002).

Aliados a este processo, estudos genéticos demonstram que a atividade dos sistemas antioxidantes naturais de defesa são muito mais efetivos na vida pós-natal que quando comparado com períodos mais tardios da vida (Keogh et al. 1996), demonstrando a grande importância do processo oxidativo durante o envelhecimento, particularmente durante o EC.



**Figura 6.** Mecanismos da Homeostase Redox: balanço entre a produção de ROS e os diferentes mecanismos anti-radicalares endógenos (adaptada de Dröger, 2002).

A derme, bem como as camadas mais profundas da epiderme, são as estruturas mais danificadas durante o processo oxidativo (Schmid et al., 2002). Além disso, a síntese lenta das principais proteínas dérmicas, como colágeno e elastina, é o evento mais comum durante o processo do EC. A atividade das enzimas de reparação e manutenção do metabolismo normal das células durante o EC encontra-se alterada, acarretando uma ineficiente remoção das moléculas danificadas, com conseqüente diminuição das vias de sinalização intra e intercelulares (Rattan, 1996; Conconi e Friguet, 1997; Friguet e Szweda, 1997; Bulteau et al., 2002). Estudos indicam que alterações na função e metabolismo dos fibroblastos, principais células da derme, relacionadas à idade deve-se à oxidação protéica catalizada por metais, levando a um exponencial aumento das concentrações de grupos carbonilas protéico-derivados (Berllet e Stadtman, 1997).

O dano oxidativo às proteínas pode ser o fator mais importante no envelhecimento, uma vez que proteínas oxidadas tornam-se inativas e podem acumular-se no interior das células, causando danos irreversíveis ao DNA ou programando a sua morte. Este aumento do conteúdo de grupos carbonilas protéico-derivados deve-se à formação de aldeídos e cetonas decorrentes de certos resíduos aminoácidos (Berllet e Stadtman, 1997).

Cabe ressaltar, que a pele fotoenvelhecida apresenta uma redução significativa na concentração das enzimas antioxidantes na epiderme associada a um aumento dos níveis de proteínas oxidadas na derme superior, indicando uma forte injúria da MEC (Sander et al., 2002). No entanto, a glicação protéica e a conseqüente formação de compostos glicados podem ser inibidas por compostos antioxidantes (Vinson e Howard, 1996).

Todas as ROS apresentam a habilidade intrínseca de ativar muitas proteínas de degradação e enzimas proteolíticas. A regulação da atividade proteolítica é importante para a homeostase tecidual e está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos (Isnard et al., 2002), como desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual, morfogênese, cicatrização e progressão de tumor (Ellerbroek e Stack, 1999; Shapiro, 1998; Yu e Stamenkovic, 2000).

### **1.5. Matriz Extracelular e Regulação do Tecido Conectivo**

Durante o envelhecimento, a perda de tecido é, particularmente, resultado do desequilíbrio entre a ativação e a inibição da atividade proteolítica (Aschcroft

et al., 1997; Khorramizadeh et al., 1999; Isnard et al., 2002; Kähäri, 1997; Lahmann et al., 2001).

Dentre as proteases envolvidas, endopeptidases do tipo elastase desempenham um papel importante (Homsy et al., 1989; Robert, 1988). Esta classe de enzimas compreende as serina-proteases, como PMN-elastase (elastase polimorfonuclear) (Bieth, 1978; Isnard et al., 2002), e a maioria das MMPs presentes na pele, principalmente MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-13 (Hornebeck, 2003; Shapiro, 1998; Birkedal-Hansen, 1995).

MMPs compreendem uma família de aproximadamente 20 enzimas proteolíticas que degradam colágeno, elastina e outras macromoléculas da MEC e têm sua atividade regulada por diversos fatores, dentre eles os subprodutos da cascata oxidativa, citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios, hormônios e neuromediadores, estimulados, em parte, durante o processo de cicatrização de feridas, angiogênese, invasão tumoral, metástase e agressões extrínsecas, como por exemplo, ação da RUV (Mauch et al., 2007). MMP-1, MMP-3 e MMP-9 são ativadas pela RUV-B, enquanto a RUV-A estimula MMP-1, MMP-2, e MMP-3 *in vivo* e *in vitro*. A super-estimulação das MMPs leva a um colapso da MEC e, conseqüentemente, aos visíveis sinais prematuros do envelhecimento (Mauch et al., 2007).

MMP-1 e MMP-9 degradam fibras de colágeno, especialmente durante o fotoenvelhecimento (Mauch et al., 2007). MMP-2 atua sobre os colágenos tipo I, IV e VII. Gelatina, elastina e fibronectina também são substratos para MMP-2, cuja atividade aumenta principalmente durante o envelhecimento cronológico,

podendo ser estimulada também pela RUV (Rocquet e Bonté, 2002; Mauch et al., 2007). MMP-1 é a principal enzima proteolítica para fibras colagênicas, cuja atividade é aumentada principalmente em decorrência de fatores exógenos, dentre eles tabagismo e RUV (Young-Min et al., 2001). Assim, cada uma das MMPs exerce sua ação proteolítica mediante substratos específicos, conforme tabela 4.

Enzimas Matriz Metaloproteinasas (MMPs)	
Enzimas	Substratos
MMP-1 (matriz colagenase)	Colágenos I, II, III, VII e X
MMP-8 (colagenase neutrofílica)	Colágenos I, II, III, proteínas de ligação e agrecanas
MMP-13 (colagenase 3)	Colágenos I, II e III
MMP-18 (colagenase 4)	Colágeno I
MMP-2 (gelatinase A)	Gelatina, colágenos I, IV, VII e XI, fibronectina, elastina e laminina
MMP-9 (gelatinase B)	Gelatina, colágenos IV, V, XIV, elastina e agrecanas
MMP-3 (stromelisina 1)	Agrecanas, gelatina, fibronectina, elastina, laminina, colágenos II, IV, IX e X
MMP-10 (stromelisina 2)	Agrecanas
MMP-14	Colágenos I, II, III e laminina
MMP-11 (stromelisina 3)	Fibronectina
MMP-12 (metaloelastase macrofágica)	Elastina
MMP-7 (matrilisina)	Agrecanas e fibronectina

**Tabela 4.** Principais Matrizes Metaloproteinasas (MMPs) e seus respectivos substratos (adaptada de Rocquet e Bonté, 2002).

Estudos indicam que a exposição de fibroblastos à RUV leva a uma exacerbação da produção e atividade das MMPs, especialmente MMP-1, MMP-2 e MMP-9, enquanto queratinócitos desempenham seu importante papel através de uma ação parácrina indireta, liberando citocinas após estresse solar (Young-Min et al., 2001). Neste sentido, Nagase e Woessner (1999) demonstraram que queratinócitos expostos à RUV apresentam aumento na expressão gênica de receptores para citocinas, bem como aumentam significativamente a produção

de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Wang e Bi (2006) confirmaram estes achados, demonstrando que a exacerbação no gene da IL-1 $\alpha$ , bem como da sua produção, em decorrência da exposição à RUV, gera uma estimulação parácrina dos fibroblastos, com conseqüente ativação de uma cascata de enzimas de degradação, dentre elas as MMPs (Wang e Bi, 2006).

A atividade de MMPs é finamente regulada em três níveis principais: síntese via transcrição, ativação do zimógeno e inibição da atividade proteolítica por inibidores específicos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). De maneira similar às MMPs, os TIMPs são sintetizados por fibroblastos residentes na derme e atuam localmente, com a função específica de bloquear a atividade das MMPs, prevenindo desta forma a digestão da MEC. Quatro TIMPs têm sido descritos, dentre os quais TIMP-1 e TIMP-2 foram mais amplamente estudados. TIMP-1 é estimulado, em parte, por fatores de crescimento – por exemplo, TGF- $\beta$  -, enquanto TIMP-2 é expresso de forma constitutiva (Mattila et al., 1998). O equilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs regula a homeostase do tecido conectivo (Young-Min et al., 2001).

#### **1.6. Evolução do Mercado e Relevância da Utilização de Produtos Dermocosméticos na Prática Dermatológica Atual**

A busca por substâncias que possam retardar ou reverter o processo de EC através de mecanismos que favoreçam a homeostasia da pele, é ferramenta constante de pesquisa e desenvolvimento na área cosmética e dermatológica. O

crescimento da indústria, aliado ao dramático avanço científico na área química cosmética, têm aumento consideravelmente a relação entre dermatologistas e produtos cosméticos ou cosmecêuticos. De acordo com Briney (2005), mais de US\$ 230 bilhões são gastos anualmente, em todo o mundo, apenas em produtos dermocosméticos direcionados aos cuidados com a aparência da pele (Briney, 2005).

A dermatologia, como ciência, tem evoluído com menos ênfase na área clínica, apresentando um considerável crescimento nas áreas de dermatologia estética e cirúrgica (Millikan, 2001). Isto se deve ao fato, principalmente, da evolução na pesquisa básica e clínica de grandes empresas da área cosmética, impulsionada em parte pelos centros de pesquisa farmacológicos situados nos grandes centros. De acordo com dados dos últimos Congressos Mundiais de Dermatologia, aliados ao crescimento das sociedades de dermatologia estética na maioria das regiões do mundo, dermatologistas buscam compostos mais seguros, com funções mais abrangentes, bem-estabelecidas e que possam trazer benefícios adicionais ao paciente (Draelos, 2001). Segundo o FDA (Food and Drug Administration, USA), a prescrição dermatológica atual baseia-se na associação de compostos normalmente prescritos e bem aceitos na área farmacêutica, com produtos cosméticos antioxidantes, anti-envelhecimento, hidratantes e anti-irritantes, especialmente aqueles com alta compatibilidade biológica e aqueles considerados naturais (Lupo e Cole, 2007).

Diante destas circunstâncias, novos compostos que possuam atividades antioxidantes, imunomoduladoras, reguladoras da homeostase cutânea, bem

como aquelas que possam modular a atividade do complexo sistema neuro-imuno-endocrinológico da pele, protetoras e possivelmente adaptógenas podem contribuir para atenuar as manifestações estéticas decorrentes do processo de envelhecimento acelerado.

Neste sentido, avaliamos neste trabalho os efeitos da aplicação da associação de um extrato vegetal com intensa atividade adaptógena, em associação com L-carnosina, um di-peptídeo essencial com importante ação sobre a regulação da homeostase celular.

## **1.7. *Rhodiola rosea* e L-carnosina**

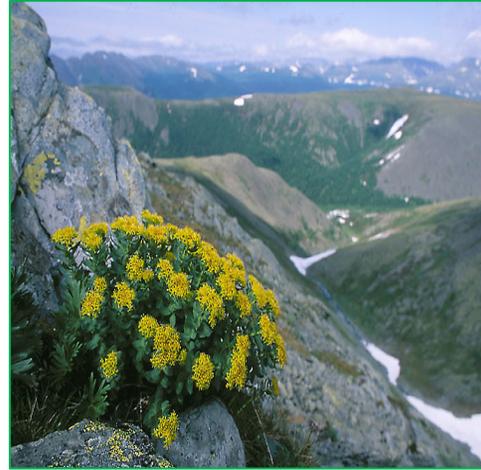
### ***1.7.1. Rhodiola rosea***

*Rhodiola rosea* L., também conhecida como “golden root”, “rose root” ou “arctic root” pertence à família Crassulaceae e caracteriza-se por seu crescimento em solo arenoso e seco das regiões árticas de altitudes elevadas da Europa e Ásia (Figuras 7, 8 e 9). Atinge em média 70 cm, produz flores amarelas e possui uma raiz fina, onde encontram-se presentes seus principais constituintes químicos (Brown et al., 2002). É uma planta popular na medicina tradicional da Europa e Ásia, onde é conhecida por suas atividades estimulantes sobre o sistema nervosa central, anti-depressiva, indutora de melhora da performance física, anti-fadiga e profilática contra afecções respiratórias comuns em regiões de altitudes elevadas (Petkov et al., 1986; Kelly, 2001). Além de *R. rosea*, mais de 200 espécies de *Rhodiola* já foram identificadas, sendo que 20

delas são utilizadas na prática médica tradicional asiática, incluindo *R. alterna*, *R. brevipetiolata*, *R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis* e *R. sacra* (Kelly, 2001; Yousef et al., 2006).



**Figura 7.** Flor da espécie *Rhodiola rosea*.



**Figura 8.** *Rhodiola rosea* em solo arenoso e seco na região da Sibéria.



**Figura 9.** Raiz da espécie *Rhodiola rósea*, onde são encontrados seus principais constituintes fitoquímicos.

*R. rosea* tem sido categorizada como uma planta adaptógena por pesquisadores russos que observaram a sua habilidade em aumentar a resistência do hospedeiro frente uma variedade de insultos químicos, físicos e

biológicos (Kelly, 2001). A origem do termo adaptógeno é datada de 1947 e creditada ao cientista russo Lazarev, que considera esta classificação para qualquer substância que de forma não-específica aumenta a resistência do organismo sem causar distúrbios em parâmetros biológicos normais (Brekhman e Dardymov, 1969; Kelly, 2001; Brown et al., 2002). Inerente a esta definição está o conceito de que a administração de um agente adaptógeno prepara o organismo de forma a torná-lo mais capaz de responder apropriadamente frente a futuros insultos (Kelly, 2001). Em contrapartida, Brekhman e Dardymov (1969) propuseram um critério que precisa ser levado em consideração para considerar uma substância adaptógena; são eles: (1) produzir uma resposta não-específica no organismo, por exemplo, um aumento da resistência contra múltiplos agentes agressores, (2) apresentar uma influência que leve à normalização da resposta fisiológica, e (3) ser incapaz de influenciar as funções normais do organismo mais do que aquela requerida para a promoção de uma resistência não-específica (Brekhman e Dardymov, 1969; Kelly, 2001, Brown et al., 2002).

De maneira similar a outras plantas adaptógenas, como *Eleutherococcus senticosus* (*Siberian ginseng*) e *Panax ginseng* (*Korean ginseng*), estudos demonstram que extratos de *R. rosea* promoveram favoráveis mudanças neuroendocrinológicas relacionadas ao estresse e à depressão, incluindo aumento no nível de neurotransmissores, melhora da atividade central e da função cardiovascular (Maslova et al., 1994).

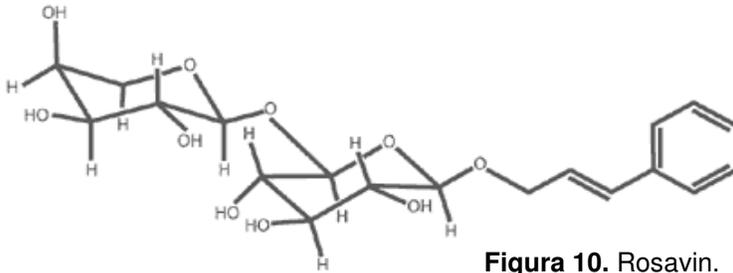
Estudos em cultura de células, animais e humanos têm revelado importantes atividades de *R. rosea*, tais como: anti-fadiga (Darbinyan et al.,

2000), anti-estresse (Spasov et al., 2000), anti-hipóxica e cardioprotetora (Maslova et al., 1994), anti-câncer (Udintsev e Schakhov, 1991), antioxidante (Ohsugi et al., 1999), imunoestimulante (Panossian et al., 1999) e estimulante sexual masculino (Saratikov e Krasnov, 1984).

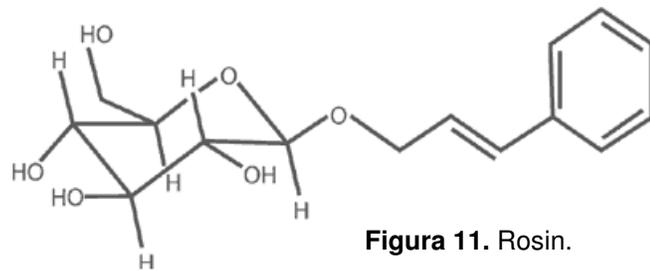
Extratos padronizados de *R. rosea* têm sido encontrados em importantes preparações comerciais utilizadas na Europa, Ásia e, mais recentemente, nos Estados Unidos, com ações biológicas que incluem atividade antialérgica, antiinflamatória, aumento da capacidade mental, dentre uma variedade de outras ações terapêuticas (Tolonen et al., 2003a; Yousef et al., 2006).

A esfera de aplicação terapêutica dos extratos de *R. rosea* é facilmente compreensível e depende exclusivamente da sua vasta composição química (Majewska et al., 2006). Recentemente, estudos fitoquímicos das raízes de *R. rosea* têm revelado a presença de flavonóides, proantocianidina tirosol e seu glicosídeo salirosídeo, glicosídeos fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico – rosavin, rosin e rosarin,  $\beta$ -sitosterol, antraglicosídeos, bem como outros glicosídeos, ácidos orgânicos, óleos etéricos, açúcares, ácidos graxos, alcoóis específicos e proteínas (Kurkin et al., 1985). Dentre esta vasta composição, acredita-se que os principais compostos responsáveis pelas ações farmacológicas conhecidas dos extratos de *R. rosea* são o fenilpropanóide tirosol, seu glicosídeo salirosídeo (*p*-hydroxyphenylethyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) (aproximadamente 1% massa seca) e os fenilpropanóides (aproximadamente 3% da massa seca) rosin (cinnamyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside), rosarin (cinnamyl-(6-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) e rosavin (cinnamyl-(6-*O*- $\alpha$ -

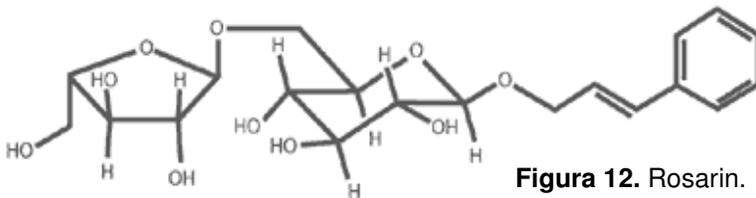
L-arabinopyranosyl) -O-b-D-glucopyranoside), aos quais são atribuídas as ações antioxidantes e neuroestimulantes (Kurkin et al., 1991; Furmanowa et al., 1998; Tolonen et al., 2003b). As figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram a estrutura química dos principais constituintes fitoquímicos da *R. rosea*.



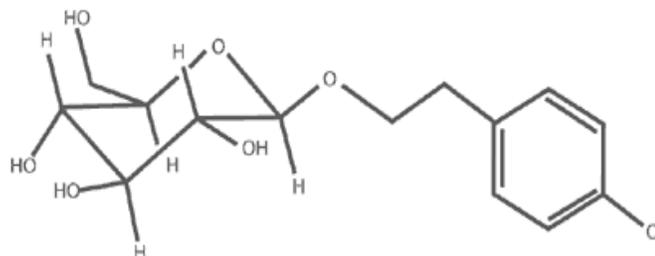
**Figura 10.** Rosavin.



**Figura 11.** Rosin.



**Figura 12.** Rosarin.



**Figura 13.** Salirosídeo.

Estudos realizados com diferentes extratos de raízes de *R. rosea*, padronizados em rosavins totais e salirosídeo, caracterizaram-nos por sua ação antidepressiva e estresse-protetora, aliviando desordens emocionais, mentais e físicas (Spasov et al., 2000; Shevtsov et al., 2003; Majewska et al., 2006), reduzindo a severidade da exaustão após atividade física intensiva (Abidov et al., 2003; Walker et al., 2006), elevando as concentrações de norepinefrina, dopamina e serotonina no cérebro, e atuando como um agonista nicotínico colinérgico no SNC (Majewska et al., 2006). Atletas profissionais que utilizaram estes extratos para incremento da atividade física, apresentaram estimulação dos processos anabólicos na musculatura esquelética, aumento da resistência durante exercício físico máximo e obtiveram uma subsequente proteção do sistema cardiovascular (Abidov et al., 2003; Walker et al., 2006). Além disso, *R. rosea* é também um estimulante do sistema imunológico e muitas investigações tem apontado seu papel anti-câncer (Kelly, 2001) e sua ação citotóxica seletiva sobre diferentes tipos de células tumorais (Majewska et al., 2006).

### **1.7.2. *L-carnosina***

O fato de que aminoácidos são indispensáveis para a saúde humana está claramente definido, uma vez que são fundamentais para a manutenção do equilíbrio nutricional em adultos, bem como para proporcionar crescimento e desenvolvimento saudável a crianças e adolescentes, especialmente quando a ingestão protéica é deficiente ou existem patologias pré-existentes. A falta ou a carência de um aminoácido indispensável na dieta, pode levar ao balanço

negativo de nitrogênio, perda de peso, crescimento retardado em crianças e adolescentes, deficiências sub-clínicas e sintomas clínicos relevantes, os quais variam de acordo com o aminoácido em escassez (Laidlaw e Kopple, 2006). Uma variedade de alterações clínicas pode decorrer da carência nutricional de aminoácidos e peptídeos derivados, como por exemplo, anemia, edema, catarata, hipoproteinemia, cirrose e morte súbita (Bröer, 2008).

Na pele, a presença e a manutenção dos níveis basais de aminoácidos também são fundamentais, uma vez que estão diretamente envolvidos na regulação do sistema de homeostase redox, bem como na integridade do estrato córneo e conseqüente manutenção do equilíbrio hídrico da pele (Harding et al., 2000; Dröge, 2002; Zhang et al., 2006).

A união de um ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas – condensação de um grupo carboxílico de um aminoácido com o grupo amina de outro aminoácido – dá origem a compostos denominados peptídeos. Sob os pontos de vista funcional e estrutural, os peptídeos são compostos altamente versáteis e vêm sendo amplamente empregados na área médica dermatológica, especialmente por suas funções sinalizadora, neurotransmissora e carreadora (Lupo e Cole, 2007), além das funções quelante, antioxidante, tamponante e metabólica na pele (Pickart et al., 1980; Buffoni et al., 1995). Além disso, diversos peptídeos, especialmente aqueles de baixo peso molecular, têm conhecida capacidade de estimular a síntese de fatores de crescimento, levando à cicatrização de feridas como resultado da estimulação da angiogênese, reparação tecidual e síntese de colágenos (Keller et al., 1991).

Muitos peptídeos são encontrados naturalmente no organismo humano, desempenhando de forma consistente todas estas funções biológicas específicas. Neste sentido, carnosina, um di-peptídeo histidina-relacionado encontrado em muitos tecidos do corpo, em especial na musculatura esquelética, vêm sendo abordado na terapêutica como uma importante ferramenta para o controle de patologias de diferentes etiologias. Desde a sua descoberta em 1900 na Rússia, muitas teorias, ainda não completamente elucidadas, têm sido propostas para suas funções biológicas (Quinn et al., 1990). Todavia, atribui-se à carnosina importante ação antioxidante, tamponante, imunoestimulante e neurotransmissora (Gariballa e Sinclair, 2000). A carnosina foi primeiramente isolada de extratos de carne, e subseqüentemente identificada como *β-alanil-L-histidina* (Figura 14) (Sano, 1970). Desde então, vários aminoácidos – como seus derivados metilados, anserina (*β-alanil-L-metil-histidina*) (Ackermann et al., 1929) e homocarnosina (*γ-amino-butiril-histidina*) (Sano, 1970), dentre outros – têm sido isolados de tecidos excitáveis (Kalyanker e Meister, 1959). Todos estes peptídeos são semelhantes estruturalmente e são sintetizados pela carnosina sintetase, uma enzima que atua de forma extensiva sobre substratos peptídicos específicos (Winnick e Winnick, 1959; Gariballa e Sinclair, 2000).

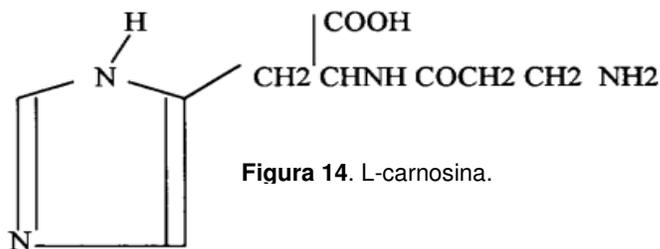
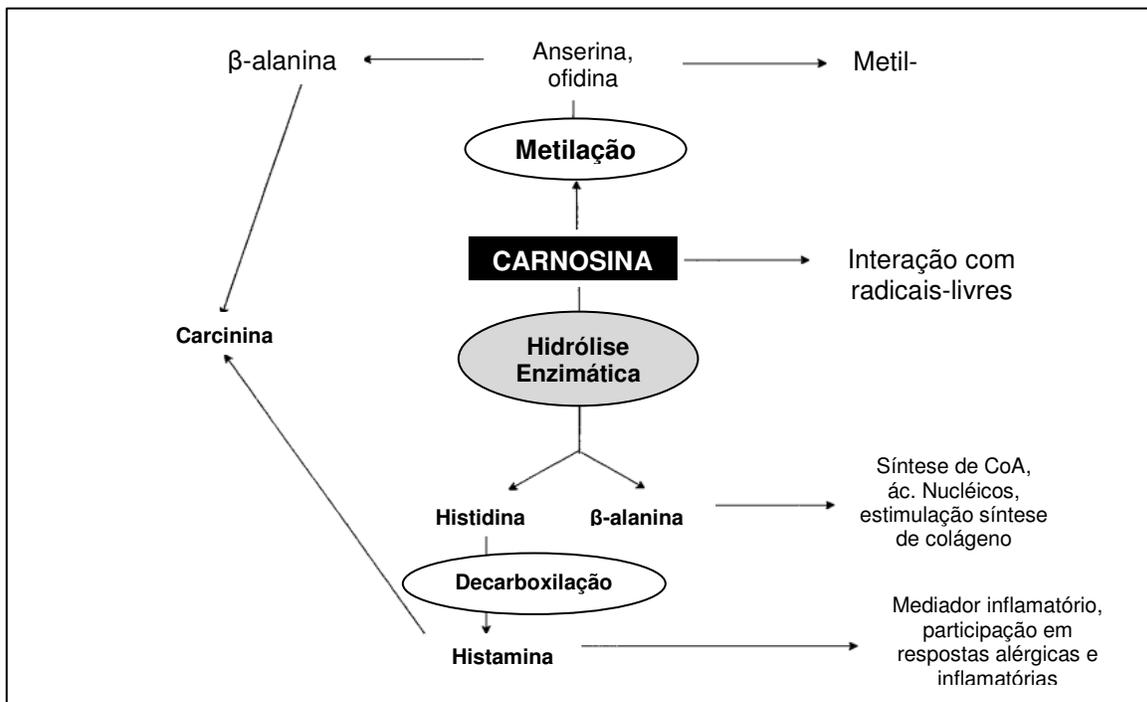


Figura 14. L-carnosina.

A carnosina é um di-peptídeo essencial sintetizado endogenamente, sendo encontrado no cérebro, músculo cardíaco, rins, estômago, bulbos olfatórios e em grandes quantidades na musculatura esquelética, onde desempenha muitos papéis biológicos relevantes, conforme figura 15 (Boldyrev e Severin, 1990; Gariballa e Sinclair, 2000).



**Figura 15.** Metabolismo da carnosina nos tecidos (adaptada de Gariballa e Sinclair, 2000).

A quantidade de carnosina no músculo e no cérebro ultrapassa a quantidade de ATP (Crush, 1970), no entanto suas funções biológicas ainda não encontram-se completamente esclarecidas (Boldyrev et al., 1999). Carnosina pode servir como um efetivo tampão fisiológico, proporcionando aproximadamente 60% da capacidade proton-ligante na musculature esquelética (Skulachev, 1978; Abe, 1995). Atua também como um agente quelante capaz de neutralizar os danos causados por metais pesados como cobre, ferro e cobalto

(Boldyrev, 1998). Além disso, importantes estudos evidenciaram a atividade antioxidante da carnosina, especialmente contra a peroxidação lipídica das membranas biológicas (Dupin et al., 1984; Boldyrev et al., 1987; Aruoma et al., 1989; Boldyrev et al., 1999). O mecanismo pelo qual a carnosina protege os tecidos contra o estresse oxidativo tem sido avaliado através de estudos que demonstram a sua capacidade de atuar como um potente antioxidante hidrofílico especialmente contra ânions superóxido e radical hidroxila (Boldyrev, 1990; Boldyrev, 1993). A habilidade da carnosina em proteger os tecidos do estresse oxidativo também foi demonstrada em estudos *in vivo* em condições de hipóxia e isquemia (Alabovsky et al., 1997; Boldyrev et al.1997). Adicional à atividade anti-radicalar que protege membranas lipídicas e proteínas da oxidação, a carnosina tem apresentado consideráveis propriedades anti-glicantes, o que previne os efeitos deletérios de aldo- e ceto-açúcares sobre biomacromoléculas, durante o estresse oxidativo (Kanta et al., 1996; Boldyrev et al., 1998; Hipkiss, 1998).

Estes efeitos polipotentos da carnosina proporcionaram o desenvolvimento de estudos que comprovam os efeitos da carnosina como uma droga anti-senescência (Gallant et al., 2000; Hipkiss et al., 2001).

Estas propriedades da carnosina, bem como sua excelente biocompatibilidade sugerem que ela atue como um importante agente na prevenção e atenuação do envelhecimento cutâneo extrínseco e intrínseco.



# ***Objetivos***

## 2. OBJETIVOS

---

Este trabalho teve como principais objetivos:

- Avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica da radiação ultravioleta sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele, através da medida dos seguintes parâmetros em cultura de fibroblastos e/ou queratinócitos humanos expostos à RUV/B durante 5 dias de exposição à RUVA/B (100mJ/cm<sup>2</sup>/dia):
  - Produção das citocinas pró-inflamatórias – IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ;
  - Produção dos derivados proopiomelanocortinas –  $\beta$ -endorfina e encefalina;
  - Atividade das enzimas antioxidantes endógenas – superóxido dismutase (SOD) e catalase (SOD);
  - Síntese das proteínas da matriz extracelular – colágeno e elastina;
  - Atividade das enzimas metaloproteinases – MMP-1, MMP-9 e MMP-13;
  - Atividade do inibidor tecidual de metaloproteinase – TIMP-1.
- Avaliar os efeitos *in vitro* do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do dipeptídeo L-carnosina e da associação de ambos (ARRLC), sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele após exposição crônica das culturas celulares ou fragmentos de pele humana à RUVA/B. Os parâmetros avaliados foram:

- Em cultura de queratinócitos e/ou fibroblastos humanos após 5 dias de exposição à RUVA/B (100mJ/cm<sup>2</sup>/dia):

- Produção das citocinas pró-inflamatórias – IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ;
- Produção dos derivados proopiomelanocortinas –  $\beta$ -endorfina e encefalina;
- Atividade das enzimas antioxidantes endógenas – superóxido dismutase (SOD) e catalase (SOD);
- Síntese das proteínas da matriz extracelular – colágeno e elastina;
- Atividade das enzimas metaloproteinases – MMP-1, MMP-9 e MMP-13;
- Atividade do inibidor tecidual de metaloproteinase – TIMP-1.

- Em fragmentos de pele humana expostos à RUVA/B durante 3 dias consecutivos (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia):

- Avaliação histológica visual, considerando os parâmetros: espessura da epiderme, integridade do estrato córneo, número de queratinócitos viáveis e condição geral da pele.

- Avaliar clinicamente, em voluntários humanos sadios, os efeitos da associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e o do di-peptídeo L-carnosina, considerando os seguintes parâmetros:

- Avaliação subjetiva em voluntários classificados como portadores de pele sensível, considerando a melhora da

sensação de conforto da pele, da sensação de ressecamento da pele, bem como a redução da sensação de desconforto da pele após Stinging-Test, após utilização de uma formulação contendo ARRLC, em comparação com a formulação placebo.

- Avaliação instrumental, em indivíduos de pele sensível, da melhora do relevo cutâneo e da redução da perda de água transepidérmica após utilização de uma formulação contendo ARRLC, em comparação com a formulação placebo.
- Avaliar o efeito antioxidante, através de método químico *in vitro*, do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina e da associação de ambos (ARRLC).



# ***Material e Métodos***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1. Amostras-Teste

##### 3.1.1. Extrato de *Rhodiola rosea*

O extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR) foi fornecido pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil). A análise quantitativa do ERR realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) revelou a presença de rosavins totais (aproximadamente 3,0% p/p) e salirosídeo (aproximadamente 1,0% p/p), conforme laudo de análise anexo (Figura 53).

##### 3.1.2. L-carnosina

O di-peptídeo L-carnosina (LC) ( $\beta$ -alanil-L-histidina) foi fornecido pela Chemyunion Química Ltda (Sorocaba, SP, Brasil). A análise quantitativa da L-carnosina realizada por HPLC revelou um teor de aproximadamente 99,0% (p/p), conforme laudo de análise anexo (Figura 54).

##### 3.1.3. Associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina

A associação entre os compostos (ARRLC) foi realizada no próprio laboratório, através de uma simples mistura, com o auxílio de um almofariz, na proporção 1:1. Após completa homogeneização, a mistura foi avaliada por HPLC, demonstrando um teor de aproximadamente 1,5% (p/p) de rosavins totais, 0,5% (p/p) de salirosídeo e 44,5% de  $\beta$ -alanil-L-histidina. O cromatograma obtido encontra-se em anexo (Figura 55).

#### 3.1.4. Determinação do Teor de Rosavins na associação ARRLC

Este experimento avaliou o teor de rosavins através da utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os rosavins são uma classe de compostos encontrados em plantas da espécie *Rhodiola rosea*.

Os seguintes equipamentos e materiais de laboratório foram utilizados na análise:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV;
- Coluna para fase reversa Phenomenex Luna C18 250mm x 4mm x 5  $\mu\text{m}$ ;
- Balões volumétricos;
- Pipetas volumétricas;
- Balança analítica;
- Filtros com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  Millex;
- Reagentes e solventes: Água Milli-Q, Acetonitrila grau HPLC, Metanol grau HPLC, Nitrato de prata P.A.; Cloreto de sódio P.A., Ácido fosfórico P.A..

As soluções-padrão de cada rosavin foram preparadas (rosavin, rosin e rosarin) e a quantificação foi realizada em concentrações de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , dissolvidos em metanol. (Colocar a marca e código dos padrões analíticos utilizados).

As amostras de ARRLC foram pesadas (0,5 g) em um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com metanol. Desta solução, coletou-se uma alíquota de 5 mL em tubo de ensaio com o auxílio de uma pipeta

volumétrica. Adicionou-se 15 mL de solução de nitrato de prata (35 mg/mL) mediante rigorosa agitação. Uma solução de cloreto de sódio 1N foi adicionada à mistura anterior. O sobrenadante do produto resultante foi filtrado e uma injeção em foi realizada em cromatógrafo líquido (Agilent Inc.) sob as seguintes condições:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,0 (A) e acetonitrila (B)
- Fluxo: 1,0 mL/minuto
- Tempo de corrida: 30 minutos
- Gradiente: 95:5 (0 minutos); 80:20 (30 minutos)
- Temperatura do forno: 60° C
- Detecção: 205 nm
- Limpeza da coluna: 50:50 (5 minutos)

Os cálculos foram realizados utilizando software apropriado para o equipamento utilizado.

## **3.2. Estudos In vitro**

### **3.2.1. Linhagem de queratinócitos humanos**

Queratinócitos (KC) humanos criopreservados (HEK - Human Epidermal Keratinocytes, 102-05a) na densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ampola foram adquiridos da Cell Applications Inc. (San Diego, CA). Os queratinócitos foram adicionados na densidade de 87.500 células em garrafas de  $25\text{cm}^2$  (Corning Inc, New York, NY), cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  em presença de 5% de  $\text{CO}_2$ ,

utilizando meio de cultura específico para o crescimento de KC pronto para o uso (Keratinocyte Growth Medium, 131-500, Cell Applications Inc.).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingiram aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas 220 g por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço para posterior irradiação e incubação com os extratos.

### 3.2.2. Linhagem de fibroblastos humanos

Fibroblastos (FB) dérmicos humanos criopreservados (Clonetics™ NHDF - Normal Human Dermal Fibroblasts, CC-2511) na densidade de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ampola foram adquiridos da Cambrex/Lonza (Walkersville, MD). Os FB foram adicionados na densidade de 87.500 células em garrafas de  $25\text{cm}^2$  (Corning Inc, New York, NY), cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  em presença de 5% de  $\text{CO}_2$ , utilizando meio de cultura específico, contendo 500mL de meio de cultura basal para fibroblastos (FBM – Fibroblast Basal Medium, CC-3131, Cambrex/Lonza) suplementado com 10mL de SBF (Fetal Bovine Serum, CC-4101J), 0,5mL de uma associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (GA-1000 – Gentamicin Sulfate/Amphotericin-B, CC-4081J), 0,5mL de insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J) e 0,5mL de fator de

crescimento de fibroblastos humanos (rhFGF-B – r-Human Fibroblast Growth Factor-B, CC 4065-J).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingiram aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas (220 x g) por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço para posterior irradiação e incubação com os extratos.

### 3.2.3. Radiação Ultravioleta

Um simulador de radiação ultravioleta (UV) solar da marca MULTIPORT® Solar Light (Modelo 601; Solar Light Co., Philadelphia, PA) foi utilizado para a irradiação das culturas celulares (Figura 16). O simulador é equipado com uma lâmpada de xenônio de 150W, filtros Schott WG 320 (1,2 mm) e UG 11 (1 mm) que permitem a emissão de um espectro contínuo de radiação na faixa de 290 a 400 nm (UVA/UVB) através de 6 guias (fibras ópticas) individuais, as quais são ajustadas individualmente. A radiação UVC e os comprimentos de onda visíveis foram reduzidos com o filtro líquido e o filtro Schott WG 320. O instrumento foi estabilizado por, no mínimo, 15 minutos antes da irradiação das culturas de células. A intensidade emitida pelas guias foi calibrada antes do uso para emissão de  $100 \text{mJ/cm}^2$ , intensidade onde nenhuma perda de viabilidade celular foi observada.



**Figura 16.** Simulador de radiação ultravioleta (UV) solar da marca MULTIPORT (Model 600; Solar Light Co., Philadelphia, PA).

### 3.2.4. Protocolo de irradiação e incubação das culturas celulares com as amostras a serem avaliadas

Ao atingirem aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas 220 g por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço e mantidas em condições apropriadas de cultivo por 24 h até completa aderência à placa de cultura. Após este período, o meio de cultura foi removido e reservado, as células foram lavadas com tampão fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5mM), e então irradiadas (UVA/UVB) na dose de  $100\text{mJ}/\text{cm}^2/\text{dia}$  por 5 dias consecutivos (D1, D2, D3, D4 e D5), para que pudessemos avaliar o comportamento das culturas

celulares não-tratadas (ERRR, LC e ARRLC), frente à irradiação aguda – representada por D1 (24 h) – e crônica – representada por D5 (120 h), mensurando cada parâmetro avaliado neste estudo. Após a irradiação, o meio de cultura reservado foi devolvido às culturas, que receberam as amostras a serem avaliadas.

Nos experimentos realizados com as amostras-testes, ERR, LC e ARRLC foram adicionados 24 horas após a irradiação em D5. Para tanto, as amostras-testes foram dissolvidas em meios de cultura específicos para cada linhagem de célula a ser experimentada, momentos antes da incubação, e então adicionados às culturas nas concentrações previamente estabelecidas através de ensaios de viabilidade celular/citotoxicidade pelo método MTT (item 3.2.5). ERR e LC foram adicionados às culturas celulares nas doses de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL. Para que pudessemos relacionar a resposta dos compostos isolados em uma equivalência de doses quando associados, ARRLC foi administrado nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL. As amostras-testes foram mantidas em contato com as culturas por 48 horas em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes e/ou lisados celulares foram então coletados e os parâmetros propostos avaliados conforme protocolo específico descrito a seguir.

No sobrenadante das culturas de KC foram avaliados os seguintes parâmetros:  $\beta$ -endorfina, encefalina, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . No lisado destas culturas foram avaliadas as atividades de SOD e catalase.

Nas culturas de fibroblastos, os sobrenadantes proporcionaram a avaliação da atividade de MMP-1, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, colágeno e elastina.

Todos estes parâmetros foram avaliados nas condições basais e nos grupos submetidos à RUV, com e sem tratamento com ERR, LC ou ARRLC.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### 3.2.5. Determinação da viabilidade/citotoxicidade celular

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico que utiliza o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) (VISTICA et al., 1991; MOSMANN, 1983). Esse ensaio é baseado na conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para e formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis. Queratinócitos foram semeados na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM). ERR, LC e ARRLC foram dissolvidos em meio de cultura específico e adicionados à placa de 96 poços em uma diluição seriada na faixa de 80,0 a 0,15 mg/mL. A cultura foi incubada por um período de 48 horas. O MTT foi então adicionado na cultura na concentração de 5mg/mL (30 $\mu$ L/poço) e incubado por mais 4 horas. O conteúdo do poço foi removido e 100  $\mu$ l de etanol foi adicionado com o propósito de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância (A) de cada poço foi determinada a 570 nm em um leitor de Elisa (LGC Biotecnologia, Brasil). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e calculada conforme a equação:

### 3.2.6. Quantificação de citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$

As citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram quantificadas em sobrenadante de cultura de KC humanos utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA sanduíche) disponíveis comercialmente (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). 100 $\mu$ L do anticorpo de captura monoclonal anti-IL-1 $\alpha$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-IFN- $\gamma$  foram adicionados à placa de 96 poços (Nunc) para incubação prévia por 12 horas em temperatura ambiente (TA). Após este período os poços foram lavados com uma solução de tampão de lavagem (PBS/Tween) e incubados com uma solução de bloqueio (300 $\mu$ L), contendo PBS e albumina sérica bovina (BSA) durante 1 hora em TA. Os sobrenadantes provenientes da cultura de KC e os padrões recombinantes (IL-1 $\alpha_r$ , TNF- $\alpha_r$  ou IFN- $\gamma_r$ ) foram adicionados e a placa foi incubada por 2 horas em TA. O anticorpo monoclonal de detecção apropriado para cada parâmetro foi então preparado e incubado por mais 2 horas em TA. Adicionou-se uma solução de estreptavidina-peroxidase e incubou-se por 1 hora em TA. Finalmente, a solução de substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB – tetrametilbenzidina) foi adicionada à placa e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm. Os níveis de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram expressos em pg/mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{absorbância da amostra incubada com as amostras}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$$

### 3.2.7. Mensuração da produção dos componentes da matriz extracelular

Colágeno e elastina e GAG foram quantificados no sobrenadante da cultura de fibroblastos.

#### 3.2.7.1. Colágeno

O colágeno total solúvel (tipo I e IV) foi mensurado utilizando Sircol Kit (Biocolor, Belfast, Irland). Em tubos plásticos próprios para microcentrifuga, 1mL do corante Sircol (vermelho sirius em ácido pícrico) foi adicionado em 100µl da amostra teste e agitado durante 30 minutos em TA. O complexo colágeno-corante formado foi precipitado por centrifugação (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão re-suspendido em 1mL de reagente álcali (NaOH 0.5 M) . Alíquotas de 200 µL foram transferidas para uma placa de 96 poços e as absorbâncias determinadas em 540 nm. A concentração de colágeno foi realizada com base na curva de calibração utilizando colágeno padrão fornecido pelo fabricante do kit.

#### 3.2.7.2. Elastina

Os níveis de elastina foram determinados segundo o protocolo descrito no kit de detecção Fastin (Biocolor, Belfast, Irland). O conteúdo de elastina das amostras foi precipitado em tubos de microcentrifuga após a adição de 1 mL de

reagente de precipitação (ácido tricloroacético e arginina) e incubação a 0°C por 24 horas. Após a centrifugação dos tubos (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão de elastina re-suspendido em 1 mL de TPPS (5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfina sulfonato) e 200 µL de sulfato de amônio saturado 90% para a formação do complexo elastina-corante. Após 60 minutos de agitação, os tubos foram novamente centrifugados (10.000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o complexo re-suspendido em 1 mL do reagente de dissociação (HCl guanidina e 1-propanol) que permitiu a formação do complexo colorido, cuja absorbância foi medida em 513 nm. A concentração de colágeno foi realizada com base na curva de calibração utilizando colágeno padrão fornecido pelo fabricante do kit.

### 3.2.8. Mensuração da produção e/ou atividade de MMP-1, MMP-9, MMP-13 e TIMP-1

As concentrações de MMP-1, MMP-9, MMP-13 e TIMP-1 foram mensuradas no sobrenadante das culturas de fibroblastos por meio de ensaio de ligação competitiva, utilizando kit adquirido comercialmente (Quantikine® Human MMP-1, MMP-9, MMP-13 ou TIMP-1 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN). Adicionou-se 100 µL de diluente de ensaio provido pelo kit (*Assay Diluent* RD5-19) em cada poço da placa. Em seguida, adicionou-se à placa 100 µL de padrão, amostra ou controle nos respectivos poços. A placa foi então mantida em agitador orbital (500 ± 50 RPM) por 2 horas. Após este período os poços foram lavados com uma solução tampão de lavagem (PBS/Tween) e incubados

com 200 µL de pro-MMP-1, pro-MMP-9, pro-MMP-13 ou pro-TIMP-1 conjugado em cada poço. A placa foi então mantida em agitador orbital (500 ± 50 RPM) por mais 2 horas em TA. Após este período a placa foi novamente lavada, seguindo os mesmos critérios estabelecidos anteriormente. Adicionou-se então 200 µL de solução substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB – tetrametilbenzidina) em cada poço e incubou-se ao abrigo da luz por 20 minutos em TA. 50 µL de solução de bloqueio (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) foi adicionado em cada poço. A densidade óptica foi então determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. O cálculo dos resultados foi feito com base na curva de referência de concentrações conhecidas dos mediadores em questão.

### 3.2.9. Mensuração da produção β-endorfina e Encefalina

β-endorfina, encefalina e CGRP foram quantificados em sobrenadante de cultura de KC humanos utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA sanduíche) disponíveis comercialmente (EK-043-01, EK-043-01 respectivamente; Phoenix Pharmaceuticals). Inicialmente, o tampão de ensaio foi diluído para a reconstituição de todos os componentes liofilizados contidos no kit, bem como as amostras a serem avaliadas. As diluições do peptídeo padrão de todos os kits foram realizadas conforme tabela abaixo:

<b>Padrão</b>	<b>Volume do padrão</b>	<b>Tampão de ensaio</b>	<b>Concentração final</b>
Solução-mãe	1,000µl	----	1,000ng/ml
#1	100µl	900µl	100ng/ml
#2	100µl #1	900µl	10ng/ml
#3	100µl #2	900µl	1ng/ml
#4	100µl #3	900µl	0.1ng/ml
#5	100µl #4	900µl	0.01ng/ml

O anticorpo primário e o peptídeo biotinilado foram hidratados com 5 mL de tampão de ensaio, mediante movimentos circulares e adicionados à placa nos poços previamente estabelecidos. Adicionou-se 50µl das soluções-padrão de peptídeo preparadas do # 5 to # 1 (ordem inversa da diluição seriada). Adicionou-se então 50µl das amostras nos poços designados e 25µl do anticorpo primário e 25µl de peptídeo biotinilado previamente hidratados em todos os poços, exceto naquele determinado como branco. A placa foi então incubada por 2 horas em TA. Após este período todo o conteúdo foi descartado e a placa lavada com 400 µL de tampão de ensaio por 4 vezes consecutivas. Após a secagem da placa, adicionou-se solução de SA-HRP (Streptavidin-horseradish peroxidase) em todos os poços, exceto no branco. A imunoplaça foi incubada em TA novamente por mais 1 hora. Após este período todo o conteúdo da placa foi descartado e a lavagem foi efetuada novamente conforme previamente descrito. Após a secagem das placas, adicionou-se 100µl de solução de substrato ( $H_2O_2$  e TMB – tetrametilbenzidina) contida no kit em todos os wells, inclusive no branco. Incubou-se a placa por mais 1 hora em TA. Adicionou-se, após este período, 100µl de solução de bloqueio (HCl 2N) para que a reação fosse interrompida. Após 20 minutos a concentração de  $\beta$ -endorfina e encefalina foram determinados através da medida de absorbância realizada em leitor de microplaca em 450 nm.

### 3.2.10. Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada através de método químico, utilizando o radical DPPH como radical-livre, e através de métodos biológicos, mensurando a produção das enzimas antioxidantes endógenas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em cultura de queratinócitos humanos.

#### 3.2.10.1. DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina)

As ações dos compostos ERR, LC e ARRLC foram analisadas pela sua capacidade de seqüestrarem o radical livre DPPH. Os compostos testes foram preparados através de uma diluição seriada (16 pontos) nas concentrações de 100 a 0,03 mg/mL, utilizando metanol como solvente. 100µL de cada diluição foram adicionados em duplicata à placa de 96 poços. A seguir, 50 µL de uma solução metanólica de DPPH 0,4 mM foi adicionada em cada poço. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 517 nm, contra um branco específico em cada avaliação, formado somente pelas amostras nas suas respectivas diluições metanólicas. Como controle foi utilizado 50µL de solução metanólica de DPPH mais 100µL de etanol. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH, calculado segundo a equação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$$

A determinação da IC<sub>50</sub>, ou seja, concentração da amostra que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH, foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes. Os dados obtidos com os compostos foram comparados com Trolox, um tocoferol usado como controle positivo na avaliação da atividade antioxidante (Friaa e Brault, 2006).

#### 3.2.10.2. Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD)

ERR, LC e ARRLC foram aplicados nas culturas de KC nas concentrações de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, seguindo protocolo descrito no item 3.2.4. Após 24 (D1) e 120 (D5) horas de incubação o lisado celular foi coletado para mensuração das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram determinadas. Para obtenção do lisado celular, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS. Após a completa remoção do PBS, o botão de células foi re-suspendido em tampão de lise (RIPA Buffer, Pierce cód.89900) e incubados num banho de gelo por 5 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um microtubo plástico e mantido em banho de gelo para análise imediata. A atividade das enzimas

antioxidantes foi realizada utilizando-se kits de ensaio da Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA).

A detecção de SOD é feita com a utilização de sal de tetrazolium para detectar radicais superóxidos que são gerados pela adição de xantina oxidase às amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para promover 50% de diminuição dos radicais superóxidos. O ensaio consiste na adição de 10µL das amostras e das soluções de padrão, 200µL da solução de tetrazolium na placa de 96 poços e 20µL da solução de xantina oxidase. A placa é então incubada por 20 minutos num agitador e a absorbância é lida a 450nm. A atividade da SOD é calculada com base na concentração conhecida dos padrões de SOD (U/mL).

O método de mensuração da CAT é baseado na reação da enzima com metanol na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e geração de formaldeído, que é detectado com a adição do cromógeno (4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol). 100µL de PBS, 30µL de metanol, 20µL das amostras ou do padrão de formaldeído e 20µL de  $H_2O_2$  são adicionados aos poços da placa de 96 que é incubada por 20 minutos sob agitação. Após isso 30µL de uma solução de hidróxido de potássio é adicionada para cessar a reação. O cromógeno (30µL) é então adicionado aos poços e a placa incubada por mais 10 minutos. Uma solução de periodato de potássio (10µL) é adicionada, a placa incubada por 5 minutos e a leitura é feita a 540nm. A atividade da CAT é calculada com base na concentração conhecida dos padrões de formaldeído (µM), utilizando a equação:

$$\text{Atividade de CAT (nmol/min/mL)} = \frac{\mu\text{M de amostra}}{20 \text{ min}}$$

### 3.3. Análise estatística

Um método paramétrico de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para a realização da análise estatística seguido do teste Tukey de comparação múltipla. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram menor que 0,05.

### 3.4. Avaliação Histológica

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, mediante consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), protocolado sob o número 582/2006 (CAAE: 0460.0.146.000-06). Para estes experimentos, utilizou-se fragmentos de pele obtidos de blefaroplastias realizadas no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

#### 3.4.1. Coleta do material e Preparo das amostras para tratamento com os produtos-testes

Os fragmentos de pele utilizados neste estudo foram provenientes de blefaroplastias eletivas de pacientes sadios submetidos à cirurgia oftalmoplástica no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital das Clínicas da

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os pacientes foram abordados no pré-operatório sobre a possibilidade de doarem a pele para este estudo. Toda a explicação necessária constante deste trabalho foi informada aos pacientes que consentiram e assinaram o Termo de Consentimento. Após a realização do procedimento cirúrgico pelo corpo clínico da oftalmo-plástica, os fragmentos de pálpebras foram acondicionados em frascos plásticos contendo soro fisiológico 0,9%, podendo ficar armazenados até 18 horas antes da manipulação. As amostras biológicas foram removidas da solução salina, mergulhadas em etanol 70% durante 15 segundos e lavadas 2 vezes em nova solução de salina. Os fragmentos foram transferidos para uma placa de petri contendo meio de cultura RPMI suplementado com SBF (Fetal Bovine Serum, CC-4101J), associação de antibióticos contendo gentamicina e anfotericina-B (GA-1000 – Gentamicin Sulfate/Amphotericin-B, CC-4081J), insulina bovina (Insulin Bovine, CC-4021J) e de fator de crescimento (rhFGF-B – r-Human Fibroblast Growth Factor-B, CC 4065-J), por um período máximo de 24 horas, até o tratamento com as amostras a serem testadas.

#### 3.4.2. Protocolo de irradiação e incubação dos fragmentos de pele com as amostras a serem avaliadas

Para o tratamento com ARRLC, o meio de cultura foi removido e reservado, os fragmentos de pele foram lavados com tampão fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM), e então irradiados (UVA/UVB) na dose de 100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia, durante 3 dias consecutivos (item

3.2.3.). Após a irradiação, o meio de cultura reservado foi devolvido às culturas. Nos experimentos realizados com a amostra-teste, ARRLC (2,0 mg/mL) foi adicionado imediatamente após a última irradiação. Para tanto, foi dissolvido em meio de cultura e aplicado sobre o fragmento de pele de forma homogênea sobre toda a superfície. As amostras foram mantidas em contato com as culturas por 48 horas em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>, para posterior realização dos cortes histológicos.

#### 3.4.3. Realização dos Cortes Histológicos

As amostras de pele foram fixadas em formol tamponado a 10%. Após seu período de fixação, o material foi incluído em blocos de parafina, e realizados cortes seriados com cerca de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro. Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H/E). Os parâmetros visuais qualitativos avaliados foram a espessura da epiderme, o número de queratinócitos viáveis (camada basal, camada granulosa e camada espinhosa) e condição de barreira pela integridade física do estrato córneo.

### **3.5. Estudos Clínicos**

Os estudos clínicos apresentados neste trabalho foram realizados em parceria com o Instituto de Bioengenharia da Pele Evic Brasil, empresa integrada ao Grupo Evic International, que atende todos os aspectos legais e éticos necessários para a avaliação de segurança e eficácia de produtos cosméticos e dermatológicos.

#### **3.5.1. Avaliação da Eficácia**

##### **3.5.1.1. Eficácia Subjetiva**

###### **3.5.1.1.1. Objetivo do Estudo**

O estudo objetivou avaliar sensorialmente de forma subjetiva a apreciabilidade cosmética de uma formulação cosmética contendo a 1% (p/p) da associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina na proporção 1:1 (ARRLC) (item 3.1.3.) em comparação com a formulação placebo. As qualidades cosméticas do produto foram avaliadas a cada visita das voluntárias ao Instituto, onde responderam o questionário definido no início do estudo. A apreciabilidade cosmética foi realizada com uma margem de mais ou menos 1 dia da data prevista para cada visita.

### 3.5.1.1.2. Relevância do Estudo e Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, tendo o consentimento e aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital Leonor Mendes de Barros (São Paulo-SP).

O estudo objetivou um melhor conhecimento da apreciabilidade dos produtos testados e os riscos previsíveis incorridos pelas voluntárias que fizeram parte do estudo. Houve uma conveniência entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos relacionados às modalidades planejadas no protocolo. Devido às exigências metodológicas, todas as voluntárias não foram incluídas no mesmo dia. Assim, no caso de uma reatividade significativa não-esperada em um ou várias das voluntárias incluídas inicialmente, o teste poderia ser interrompido para o restante do painel.

Os riscos previstos para este tipo de estudo eram a possível manifestação de uma alergia a um determinado produto cosmético ou o possível aparecimento de uma irritação no local de aplicação, na forma de vermelhidão da pele, prurido, aquecimento, formigamento, repuxamento, queimação, bolha, crosta, ressecamento ou alteração da cor da pele. Se isto ocorresse, a aplicação do produto seria suspensa, sendo colocada ao voluntário toda a assistência que se fizesse necessária.

Devido às exigências metodológicas, os voluntários foram incluídos em diferentes dias, pois no caso de ocorrer uma reatividade significativa não

esperada em um ou vários dos voluntários incluídos inicialmente, o teste poderia ser descontinuado com o restante do painel.

Todos os voluntários iniciaram o teste após devidamente informados e esclarecidos quanto à participação nesta pesquisa e forneceram seu consentimento informado, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer momento. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais freqüentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica ou a não melhoria das condições propostas no início do estudo.

#### 3.5.1.1.3. Princípio Metodológico

As condições experimentais adotadas, tais como área experimental, quantidade do produto aplicada, freqüência e duração das aplicações reproduziram as condições normais de uso como indicado e o teste realizado em uma “pequena escala” refletiu a aplicação feita por futuros consumidores. A observância das condições experimentais pelas voluntárias que participaram do estudo deu-se através da avaliação por meio de um questionário ao final do estudo e por um controle de consumo do produto. A opinião das voluntárias foi levada em consideração, uma vez que ela reflete as opiniões de consumidores em potencial.

#### 3.5.1.1.4. Tipo de Estudo

O estudo realizado foi monocêntrico e aberto. O controle foi intraindividual, levando em consideração o grupo placebo. O estudo foi realizado de acordo com o procedimento operacional da EVIC Brasil, estabelecido para realização do projeto de teste em humanos.

#### 3.5.1.1.5. Formulações e Aplicação dos produtos

A formulação do produto placebo e do produto contendo ativo, encontram-se quantitativamente descritos, conforme tabela 5:

<b>Componentes</b> (nome comercial e descrição química)	<b>PLACEBO</b> (Lote FSE11B05)	<b>PRODUTO COM ATIVO</b> (Lote FSE011A05)
	<b>Concentração (% p/p)</b>	
Montanov L	3,0	3,0
Uniester LM (C20-22 fosfato de alquila, álcool graxo C20-22)	6,0	6,0
Lanol 99 (isonanoato de isonanila)	2,0	2,0
Uniquilan NA <sub>2</sub> S (EDTA dissódico)	0,1	0,1
Suspender	0,5	0,5
Chemynol	0,5	0,5
Sepigel 501	1,0	1,0
<b>ARRLC</b>	-----	<b>1,00</b>
Água deionizada	q.s.p. 100,0%	q.s.p. 100,0%

**Tabela 5.** Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia subjetiva.

As formulações foram preparadas no Laboratório de Assistência Técnica da Chemyunion Química Ltda e fornecidas, com os respectivos números de lote, antes do estudo juntamente com a fórmula quantitativa, o termo de

responsabilidade técnico sobre a conformidade do produto, dados de segurança e modo de uso.

As condições experimentais de uso dos produtos teste foram:

<b>Zona de aplicação do produto</b>	<b>Modo de aplicação</b>	<b>Aplicação residencial (frequência/duração)</b>
Face	Aplicar o produto após o banho ou lavagem do rosto, antes da aplicação do creme de tratamento atual.	Duas vezes ao dia, durante 28 dias.

**Tabela 6.** Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia subjetiva.

#### 3.5.1.1.6. Voluntários

##### Número

O número de voluntárias cujos dados foram extrapolados no final do estudo é 124, divididos em 2 grupos de 62 voluntárias cada, sendo que um grupo utilizou o produto com ativo e o outro utilizou produtos placebo, conforme a tabela de aleatorização. Cento e vinte quatro voluntárias foram incluídas devido à complexidade do estudo, sendo que ao final do protocolo nenhuma voluntária desistiu do estudo e nenhuma voluntária foi excluída do estudo por decisão do investigador.

##### Critérios Específicos de Inclusão

Os Critérios Específicos de Inclusão, definidos no protocolo de estudo foram:

- idade: de 45 a 50 anos;
- sexo: feminino;

- fototipo de acordo com Fitzpatrick: I a IV (Fitzpatrick et al., 1994) (Tabela 8);
- usuárias de produtos para tratamento facial;
- uso de métodos contraceptivos (no caso de mulheres em período fértil);
- voluntárias com pele sensível que responderam positivamente ao pré-teste de ácido láctico, denominado Stinging-Test (ST).

ST ou Metodologia de Pré-Teste de ácido láctico consiste de uma metodologia amplamente descrita que possibilita o diagnóstico de pele sensível e consiste de:

- Após 15 minutos de sauna (vaporizador na face), 2 mL de uma solução 10% de ácido láctico são aplicados em um dos lados da região nasogeniana. Do outro lado é aplicada a mesma quantidade de uma solução de cloreto de sódio 0,9%. O pinicamento foi avaliado pelas voluntárias, 2 e 5 minutos após a aplicação das soluções, mediante controle clínico. A intensidade do pinicamento é avaliada, seguindo os seguinte critério de classificação contido na tabela 7:

<b>Pontuação</b>	<b>Intensidade do pinicamento</b>
0	Ausente
1	Leve
2	Moderado
3	Importante

**Tabela 7.** Critério de classificação para intensidade de pinicamento no Stinging-Test.

Após a tomada, uma pontuação individual média ( $S_{mi}$  – *Score moyen individuel*) é definida como a média de duas avaliações feitas 2 e 5 minutos após

a aplicação das respectivas soluções, levando em consideração a opinião da voluntária de acordo com sensações nos locais de aplicação. Desta forma, calcula-se a pontuação diferencial, de acordo com a equação abaixo:

$$\mathbf{Sdi} = \text{Sdi (sol. ácido láctico)} - \text{Sdi (sol. NaCl)}$$

São consideradas voluntárias de pele sensível ou ST positivas àquelas que apresentarem Sdi superior a 1. Neste estudo, as 120 voluntárias incluídas foram consideradas ST positivas. As informações tipológicas das voluntárias encontram-se em tabela anexa.

#### Critérios Específicos de Não-Inclusão

Os critérios específicos de não-clusão definidos no protocolo foram:

- marcas cutâneas na área experimental que possam interferir com a avaliação das reações da pele (problemas de pigmentação, elementos de cicatrizes, desenvolvimento exagerado de pilosidade, efélides e *nevus* em grande quantidade, bonzeamento);
- patologias cutâneas ativas (locais ou disseminadas) que possam interferir nos resultados do estudo;
- lesões cutâneas ativas na área de avaliação;
- alergia ou reatividade para a categoria de produtos testados;
- hiper-reatividade cutânea;
- exposição intensiva ao sol até 15 dias antes da avaliação;

- previsão de exposição intensiva ao sol ou lâmpadas UV durante o período do teste;
- previsão de banho (piscina, mar), ou esportes aquáticos, durante a realização do estudo;
- uso de vitamina A ácida (ácido retinóico) por pelo menos 3 meses antecedentes ao estudo;
- tratamento com corticóides tópicos na área de aplicação do teste até 8 dias antes do estudo;
- uso de drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras;
- antecedentes atópicos ou alérgicos;
- tratamento com radiação UVA ou UVB até um mês antes do início do estudo;
- previsão de alteração do método contraceptivo oral corrente;
- mulheres grávidas ou em amamentação.

Todas as voluntárias incluídas no estudo corresponderam aos critérios específicos de não-inclusão.

<b>Fototipo</b>	<b>Cabelo</b>	<b>Pele</b>	<b>Sardas</b>	<b>Queimaduras Solares</b>
I	vermelho	clara	+++	queima-se sempre; nunca bronzeia
II	claro	clara	++	queima-se sempre; bronzeado mínimo
III	castanho	clara	+	queima-se moderadamente; bronzeado progressivo
IV	castanho escuro ou preto	morena	0	queima-se eventualmente; bronzeia-se sempre
V	preto	negra	0	nunca se queima; fortemente pigmentada

**Tabela 8.** Classificação dos fototipos de pele de acordo com Fitzpatrick.

#### 3.5.1.1.7. Benefícios do Estudo

Com esse estudo, as voluntárias podem ter apresentado uma melhora na aparência da face.

#### 3.5.1.1.8. Exigências requeridas pelo estudo

As exigências impostas às voluntárias definidas no protocolo foram:

- continuação do uso dos produtos de tratamento habituais (o produto teste foi inserido ao tratamento usual, a fim de evitar possíveis interferências na retirada do produto de costume);
- respeitar as condições de uso do produto em estudo;
- manter os hábitos de higiene;
- não usar nenhum medicamento na área experimental (em caso terapêutico, exclusão prevista);
- não alterar os hábitos de dieta;
- não alterar o método contraceptivo oral corrente;
- não fazer tratamentos exfoliativos ou *peeling*;
- evitar exposição solar intensa e/ou uso de câmaras de bronzeamento artificial;
- não fazer limpeza de pele com esteticista;
- não iniciar nenhum tratamento anti-alérgico ou anti-inflamatório durante o período do estudo;
- não realizar tratamento tópico contendo vitaminas A ácida, peróxido de benzoíla, eritromicina, ácido azelaico, ou sistêmico (antibiótico,

hormonioterapia) ou tratamento anti-acnéico ou anti-seborréico durante o estudo (em caso terapêutico, o voluntário é excluído);

- comunicar ao Intituto qualquer desvio do protocolo.

Todas as exigências do estudo, definidas no Protocolo, foram respeitadas pelas voluntárias.

#### 3.5.1.1.9. Controle de Observação das Modalidades do Protocolo

As voluntárias foram questionadas no final do estudo sobre o modo como utilizaram o produto teste. Avaliou-se a importância de possíveis desvios em comparação com as condições experimentais requeridas no início do estudo. Verificou-se também o cumprimento das restrições dos estudos pelas voluntárias. O resumo das respostas obtidas está apresentado, conforme tabela anexo. Todos os desvios em relação ao protocolo estabelecido inicialmente foram analisados e seus efeitos sobre a validade dos resultados levados em consideração. Um controle do consumo foi realizado e o consumo individual e médio do painel foi calculado no final do estudo. As amostras entregues às voluntárias foram pesadas antes, no início do estudo, e após a última utilização.

#### 3.5.1.1.10. Apreciabilidade Cosmética e Eficácia Subjetiva

As qualidades cosméticas dos produtos teste foram avaliadas através de um questionário definido inicialmente de acordo com os atributos a serem avaliados. As voluntárias responderam a um questionário sobre o estado da pele

no primeiro dia e sobre as qualidades cosméticas dos produtos teste após 28 dias de uso do produto, levando em consideração os seguintes parâmetros:

- Conforto da pele;
- Ressecamento da pele;
- Conforto da pele após ST.

Os parâmetros conforto da pele e ressecamento da pele seguiram um questionário de escala de 5 pontos e foram avaliados em D1 e D28, conforme abaixo:

Avaliação em D1 e D28:

*Quanto à percepção (nível) de conforto da pele:*

- 5-Muito satisfatória
- 4-Satisfatória
- 3-Nem muito, nem pouco satisfatória
- 2-Pouco satisfatória
- 1-Não é satisfatória

*Quanto à percepção do ressecamento da pele:*

- 5-Muito ressecada
- 4-Ressecada
- 3-Nem muito, nem pouco ressecada
- 2-Pouco ressecada
- 1-Não está ressecada

Para o atributo conforto da pele após ST, aplicou-se um questionário binário apenas em D28.

Avaliação em D28 (percepção em relação ao D1):

*Após o Stinging test , a sensação de desconforto foi mais intensa:*

- ( ) No primeiro dia (D1)
- ( ) No último dia (D28)

### 3.5.1.2. Eficácia Instrumental

#### 3.5.1.2.1. Objetivo

O estudo objetivou avaliar a eficácia instrumental de uma formulação cosmética contendo a 1% (p/p) da associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina na proporção 1:1 (ARRLC) (item 3.1.3.) em comparação com a formulação placebo. Os efeitos do produto na barreira cutânea e na redução de rugas finas foram avaliados por meio de medidas instrumentais, realizadas em diferentes tempos experimentais.

#### 3.5.1.2.2. Relevância do Estudo e Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, tendo o consentimento e aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital Leonor Mendes de Barros (São Paulo-SP).

O estudo objetivou um melhor conhecimento da apreciabilidade dos produtos testados e os riscos previsíveis incorridos pelas voluntárias que fizeram parte do estudo. Houve uma conveniência entre o objetivo do estudo e os possíveis riscos relacionados às modalidades planejadas no protocolo. Devido

às exigências metodológicas, todas as voluntárias não foram incluídas no mesmo dia. Assim, no caso de uma reatividade significativa não-esperada em um ou várias das voluntárias incluídas inicialmente, o teste poderia ser interrompido para o restante do painel.

As substâncias que compõem os produtos utilizados nas pesquisas foram consideradas seguras e adequadas para a finalidade a que se destinam.

Os riscos previstos para este tipo de estudo eram a possível manifestação de uma alergia a um determinado produto cosmético ou o possível aparecimento de uma irritação no local de aplicação, na forma de vermelhidão da pele, prurido, aquecimento, formigamento, repuxamento, queimação, bolha, crosta, ressecamento ou alteração da cor da pele. Se isto ocorresse, a aplicação do produto seria suspensa, sendo colocada ao voluntário toda a assistência que se fizesse necessária.

Devido às exigências metodológicas, os voluntários foram incluídos em diferentes dias, pois no caso de ocorrer uma reatividade significativa não esperada em um ou vários dos voluntários incluídos inicialmente, o teste poderia ser descontinuado com o restante do painel.

Todos os voluntários iniciaram o teste após devidamente informados e esclarecidos quanto à participação nesta pesquisa e forneceram seu consentimento informado, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa manteve o anonimato do voluntário, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer momento. Todos foram

esclarecidos dos possíveis riscos mais freqüentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica ou a não melhoria das condições propostas no início do estudo.

#### 3.5.1.2.3. Princípio metodológico

As condições experimentais adotadas, tais como área experimental, quantidade do produto aplicada, freqüência e duração das aplicações reproduziram as condições normais de uso como indicado e o teste realizado em uma “pequena escala” refletiu a aplicação feita por futuros consumidores. O efeito na barreira cutânea foi quantitativamente avaliado por medida de perda de água transepidérmica (TEWL) através do uso do Tewameter™ (Courage-Khazaka Electronic GMBH, Germany) em diferentes tempos experimentais. A redução de rugas finas foi avaliada objetivamente por meio de análise instrumental com o uso do Skin Visiometer™ SV500 (Courage-Khazaka Electronic GMBH, Germany). A observância subjetiva das condições experimentais pelas voluntárias que participaram do estudo deu-se através da avaliação por meio de um questionário ao final do estudo e por um controle de consumo do produto. A opinião das voluntárias foi levada em consideração, uma vez que ela reflete as opiniões de consumidores potenciais.

#### 3.5.1.2.4. Tipo de Estudo

O estudo realizado foi monocêntrico e aberto. O controle foi intraindividual, levando em consideração o grupo placebo. O estudo foi realizado

de acordo com o procedimento operacional da EVIC Brasil, estabelecido para realização do projeto de teste em humanos.

### 3.5.1.2.5. Formulações e aplicação dos produtos

Para as medidas instrumentais levou-se em consideração a formulação do placebo e do produto contendo ativo, conforme tabela 9:

<b>Componentes</b> (nome comercial e descrição química)	<b>PLACEBO</b> (Lote FCR005A07)	<b>PRODUTO COM ATIVO</b> (Lote FCR005B07)
	<b>Concentração (% p/p)</b>	
Uniox Cristal (álcool cetosteárico, polissorbato 60, cetosteárico glucosídeo, álcool estearílico)	10,0	10,0
Sensanov WR (C20-22 fosfato de alquila, álcool graxo C20-22)	1,0	1,0
Uniliquid (álcool de lanolina, óleo mineral)	1,5	1,5
Chemylan AGLA (acetato de cetila, álcool de lanolina acetilado)	1,5	1,5
Lanol 99 (isonanoato de isonanila)	2,0	2,0
Uniqulan NA <sub>2</sub> S (EDTA dissódico)	0,1	0,1
Glicerina	2,0	2,0
Trietanolamina	0,2	0,2
Sorbato de potássio	0,3	0,3
Sepigel 305 (poliacrilamida, C13-14 isoparafina, álcool laurílico etoxilado 7 OE)	0,5	
Butilenoglicol	2,00	2,00
<b>ARRLC</b>	-----	<b>1,00</b>
Ácido láctico 85%	q.s.p. pH = 5,5 – 6,5	q.s.p. pH = 5,5 – 6,5
Água deionizada	q.s.p. 100,0%	q.s.p. 100,0%

**Tabela 9.** Descrição qualitativa e quantitativa da formulação utilizada nos estudos de eficácia instrumental.

As formulações foram preparadas no Laboratório de Assistência Técnica da Chemyunion Química Ltda e fornecidas, juntamente com os respectivos lotes, antes do estudo juntamente com a fórmula quantitativa, o termo de responsabilidade técnico sobre a conformidade do produto, dados de segurança e modo de uso. As condições experimentais de uso dos produtos teste foram:

Zona de aplicação do produto	Modo de aplicação	Aplicação no Instituto	Aplicação residencial (frequência / duração)
Face e antebraço	Antes da utilização dos produtos, lavou-se a área com sabonete líquido e água fria. Cada produto foi aplicado em um dos lados da face e antebraço. Na face e área dos olhos os produtos foram aplicados sempre com a mesma mão. Entre a aplicação de cada produto, lavou-se as mãos com água e sabão.	D1, D28 e D56	Duas vezes ao dia, durante 56 dias.

**Tabela 10.** Condições experimentais e modo de aplicação dos produtos no estudo de eficácia instrumental.

#### 3.5.1.2.6. Voluntários

##### Número

O número de voluntárias cujos dados foram extrapolados no final do estudo deveria ser 60. Para compensar possíveis desistências, abandono ou exclusão durante o estudo, e para manter a cota completa dos voluntários ao final do estudo, cerca de 10% dos voluntários extras poderiam ser recrutados. Devido aos critérios específicos de inclusão, 62 voluntários foram incluídos no estudo, sendo que 7 deles, seja por motivos particulares, seja por decisão da

equipe foram excluídos do estudo. Os dados de cada voluntário encontram-se descrito em tabela anexo. A eficácia instrumental foi, portanto, avaliada em 55 voluntários em D28 e D56.

#### Critérios Específicos de Inclusão

Os Critérios Específicos de Inclusão, definidos no protocolo de estudo foram:

- idade: de 30 a 50 anos;
- sexo feminino;
- fototipo de acordo com Fitzpatrick: I a IV (Fitzpatrick et al., 1994);
- pele íntegra na região do teste;
- usuárias de produtos da mesma categoria;
- voluntários com histórico de ardência ao aplicar produtos cosméticos;
- pele normal a seca;
- uso de métodos contraceptivos (no caso de mulheres em período fértil);
- voluntárias com pele sensível que responderam positivamente ao pré-teste de ácido láctico, denominado Stinging-Test (ST).

#### Critérios Específicos de Não-Inclusão

Os critérios específicos de não-clusão definidos no protocolo foram os mesmos daqueles descritos anteriormente. Todas as voluntárias incluídas no estudo corresponderam aos critérios específicos de não-inclusão.

#### 3.5.1.2.7. Benefícios do Estudo

Com esse estudo, as voluntárias podem ter apresentado uma melhora na aparência geral da face.

#### 3.5.1.2.8. Exigências requeridas pelo estudo

As exigências impostas às voluntárias definidas no protocolo foram:

- continuação do uso dos produtos de tratamento habituais
- respeitar as condições de uso do produto em estudo;
- não exposição intensa à radiação UVA durante o estudo;
- manter os hábitos de higiene;
- não usar nenhum medicamento na área experimental (em caso terapêutico, exclusão prevista);
- não alterar os hábitos de dieta;
- não alterar o método contraceptivo oral corrente;
- não fazer tratamentos exfoliativos ou *peeling*;
- evitar exposição solar intensa e/ou uso de câmaras de bronzamento artificial;
- não fazer limpeza de pele com esteticista;
- não iniciar nenhum tratamento anti-alérgico ou anti-inflamatório durante o período do estudo;
- não realizar tratamento tópico contendo vitaminas A ácida, peróxido de benzoíla, eritromicina, ácido azelaico, ou sistêmico (antibiótico, hormonioterapia) ou tratamento anti-acnéico ou anti-seborréico durante o estudo (em caso terapêutico, o voluntário é excluído);

- comunicar ao Instituto qualquer desvio do protocolo.

Todas as exigências do estudo, definidas no Protocolo, foram respeitadas pelas voluntárias.

#### 3.5.1.2.9. Controle de Observação das Modalidades do Protocolo

Como forma de controle de observação do estudo, considerou-se os mesmos parâmetros descritos no item 3.5.1.1.9.

#### 3.5.1.2.10. Áreas de Aplicação e Condições Experimentais

As áreas experimentais foram ambos os lados da face e as faces volares dos antebraços (10 cm da inserção do rádio), aleatorizados conforme tabela anexo. As voluntárias permaneceram numa sala climatizada, com temperatura e umidade controladas ( $t = (20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} = (45 \pm 15) \%$ ). Cada voluntária foi colocada por 30 minutos nesta sala, antes do início das medidas instrumentais.

#### 3.5.1.2.11. Avaliação Instrumental da perda de Água Transepidérmica (TEWL)

O nível de TEWL foi avaliado quantitativamente pelas medidas taxa de evaporação da água pela pele em diferentes tempos experimentais para determinação da cinética de TEWL:

- Antes (D1/T0, D28/T0 e D56/T0)
- Após 30 minutos (D1/T30 min , D28/T30 min e D56/T30 min)
- Após 60 minutos (D1/T60 min, D28/T60 min e D56/T60 min)
- Após 120 minutos (D1/T120 min, D28/T120 min e D56/T120 min)

O efeito de barreira cutânea dos produtos foi avaliado levando-se em consideração a TEWL através dos tempos experimentais e em comparação entre os produtos testados.

#### Sítios de medida

Após o condicionamento dos voluntários em um ambiente climatizado, as medidas foram efetuadas em sítios perfeitamente definidos dos antebraços de cada voluntário (a 10 cm da inserção do rádio).

#### Equipamento

A TEWL foi avaliada pelo equipamento Tewameter™ TM300 (Courage-Khazaka Electronic GMBH, Germany) que possui uma sonda com par de sensores para temperatura e umidade. De acordo com a Lei de Fick, a difusão de água (massa de água em um determinado tempo) é proporcional ao gradiente de concentração de água na sonda. Quando a hidratação da pele varia, há uma variação da TEWL medida. Os valores de TEWL foram expressos em  $\text{g/m}^2 \cdot \text{h}$ .

#### Expressão e Interpretação dos Resultados

Todos os voluntários incluídos no estudo foram considerados para avaliar a eficácia do produto teste, tão logo foram sujeitos a todos os exames, em tempos definidos. Os resultados individuais encontram-se anexos em tabela apropriada:

- valores absolutos em cada tempo experimental;

- porcentagem de variação em comparação com T0;
- diferenças entre as porcentagens de variação em comparação com T0.

A média e desvio padrão foram calculados.

A interpretação dos resultados foi absoluta referente à:

- porcentagem de voluntários “reativos” em cada tempo experimental. São considerados voluntários “reativos” aqueles cuja diferença entre as porcentagens de variação em comparação com T0 foi superior ou igual a 10%;
- porcentagem de melhora na TEWL sob o efeito do produto: a cada tempo experimental (diferença entre a porcentagem de variação em comparação com T0) nos voluntários reativos;
- comparação de desempenho entre o produto contendo 1% de ARRLC e o placebo;
- resultados da análise estatística.

#### 3.5.1.2.12. Avaliação Instrumental do Efeito na Redução de Linhas Finas (Melhora do Relevo Cutâneo)

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente a eficácia da formulação contendo 1% de ARRLC em comparação com a formulação placebo na melhora do micro-relevo cutâneo, através da análise de 3 parâmetros:

- Melhora das rugas: Redução de pelo menos 10% de todos os parâmetros ( $R_m$ ,  $R_z$ ,  $R_a$ );

- Melhora nas rugas superficiais: Redução de pelo menos 10% do  $R_m$ .

O efeito no micro-revelo cutâneo foi avaliado quantitativamente por análise de imagens das réplicas do antebraço, realizadas no início do estudo (D1/T0), após 28 dias (D28) e após 56 dias (D56).

### Sítios de medida

Após o condicionamento dos voluntários em um ambiente climatizado, as medidas foram efetuadas em sítios perfeitamente definidos dos antebraços de cada voluntário (a 10 cm a inserção do rádio). Antes da aplicação dos produtos na pele, um adesivo foi colocado no sítio de avaliação. Uma mistura a base de silicone azul foi depositada ao centro do adesivo. Em seguida, um outro plástico adesivo foi colado sobre o anel de maneira a manter a espessura da réplica padronizada. Após um período de secagem, o anel foi descolado juntamente com a réplica negativa da pele no sítio definido. A aquisição de imagens foi feita através do Skin Visiometer™ SV500 (Courage-Khazaka Electronic GMBH, Germany).

### Equipamento

O princípio de medida do Skin foi baseado na transmissão de luz de uma réplica fina de silicone. A absorção da cor azul é conhecida. A réplica foi colocada num suporte específico e inserido no equipamento cuja fonte de luz emite raios paralelos de um lado e um detector CCD capta a imagem de outro. A luz penetrou a réplica e foi absorvida de acordo com sua espessura. A

visualização foi feita por uma unidade de digitalização e uma placa gráfica conectada em um computador.

### Expressão e Interpretação dos Resultados

Os seguintes parâmetros são fornecidos pelo equipamento:

- **Ra:** Média Aritmética da Rugosidade,
- **Rz:** Rugosidade Média,
- **Rm:** Rugosidade Máxima.

A melhora no relevo cutâneo foi expressa objetivamente a nível individual e considerando a evolução dos parâmetros para cada uma das voluntárias.

Na avaliação instrumental do relevo cutâneo a análise foi feita ajustando modelos lineares, em que os efeitos de produto e tempo são avaliados. Os voluntários são considerados efeito aleatório.

### 3.5.2. Análise estatística

Para os estudos de eficácia clínica subjetiva e instrumental, a análise foi feita através de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972) em que efeito de tratamento e tempo foram avaliados. Para se levar em conta a medida repetida, empregou-se o método GEE (Generalized Estimating Equations, Liang e Zeger, 1986). A distribuição postulada para as respostas foi a Binomial; as observações foram feitas em categorias. Estimam-se as proporções de respostas em cada categoria, por tratamento e tempo. Os cálculos foram

feitos com o sistema SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), sob sistema operacional Linux (Mandriva).



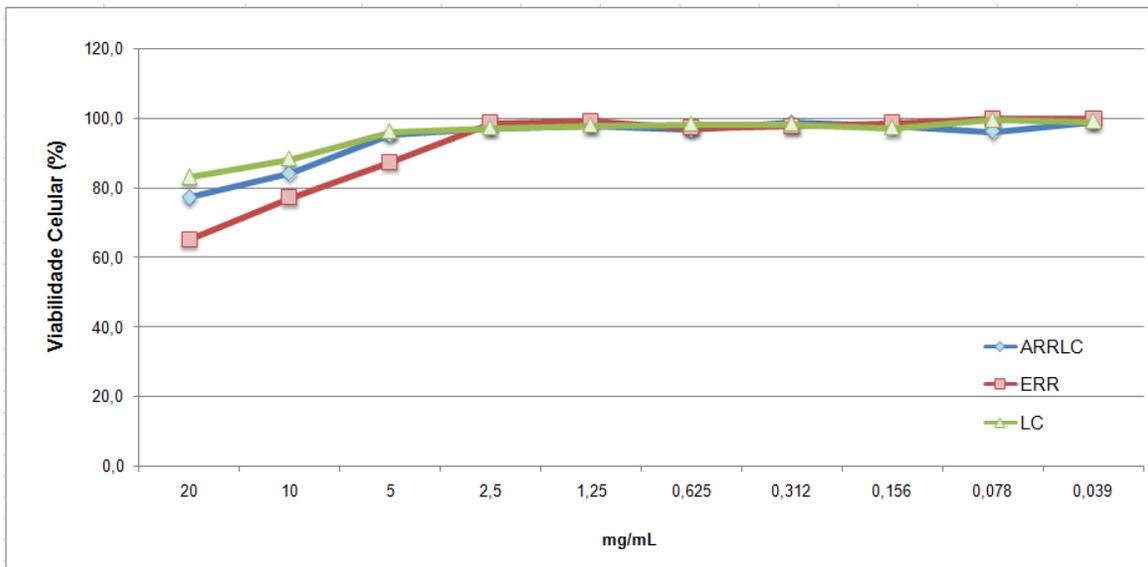
# ***Resultados***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados *in vitro*

#### 4.1.1. Avaliação da citotoxicidade celular do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC)

A possível ação citotóxica de ERR, LC e ARRLC foi avaliada utilizando o método de MTT em cultura de queratinócitos humanos incubados com diferentes concentrações dos compostos, obedecendo uma faixa de 20 a 0,039 mg/mL.



**Figura 17. Efeitos do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina e da associação de ambos (ARRCG) sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos.** Queratinócitos foram incubados com os compostos em diferentes concentrações (20-0,039 mg/mL) durante 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT. Os dados representam a média da porcentagem de células viáveis em relação ao controle obtidos de 3 experimentos independentes.

Conforme podemos observar na figura 17, ambos ARRLC e LC apresentaram, mesmo nas maiores doses avaliadas, ausência de potencial citotóxico, mantendo a viabilidade celular em 77,15 e 83,15%, respectivamente, alcançando níveis ótimos de viabilidade celular a partir da dose de 5 mg/mL. O ERR, por sua vez, apresentou moderada citotoxicidade quando utilizado na dose de 20 mg/mL, sendo observada a morte de aproximadamente 41% do total de células na cultura. Para os produtos, foram considerados níveis excelentes de viabilidade celular aqueles obtidos com dentro da faixa de doses compreendidas entre 10 e 0,039 mg/mL. Com base nos resultados obtidos neste experimento, selecionamos, para os estudos de eficácia in vitro, as doses de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, com a finalidade de obter uma curva dose-resposta para cada um dos compostos.

4.1.2. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) através da capacidade de seqüestrar radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e da capacidade biológica de estimular a produção das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos.

#### 4.1.2.1. DPPH

A capacidade seqüestrante de radicais DPPH por ERR, LC e ARRLC encontra-se descrita na figura 19. O DPPH é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina (Koleva et al., 2002). Para este experimento, os compostos foram adicionados à cultura de queratinócitos humanos nas concentrações de 0,003 a 100 mg/mL.

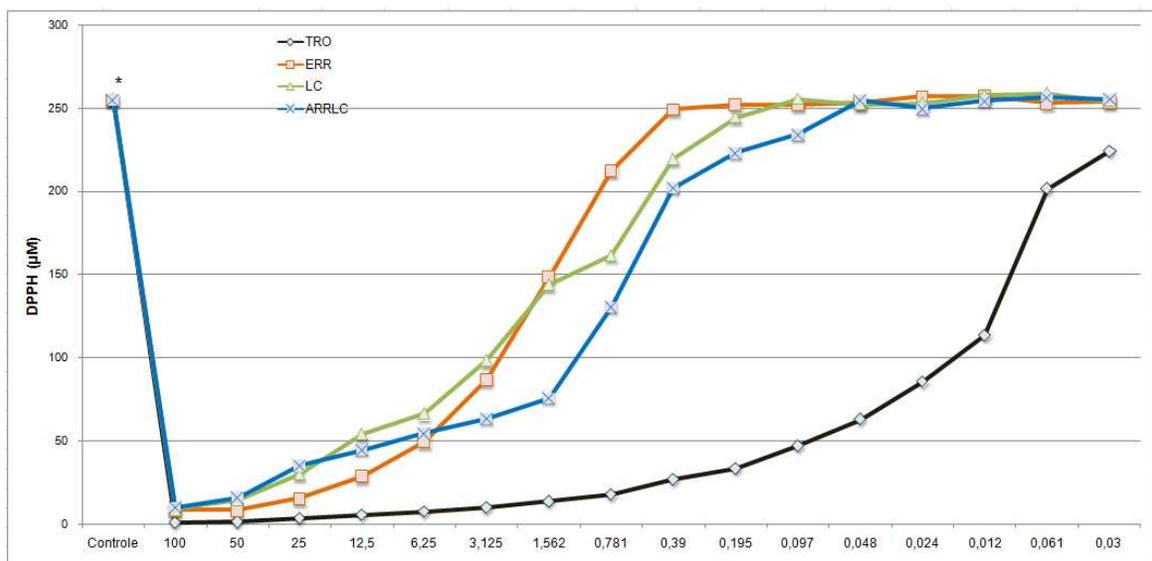


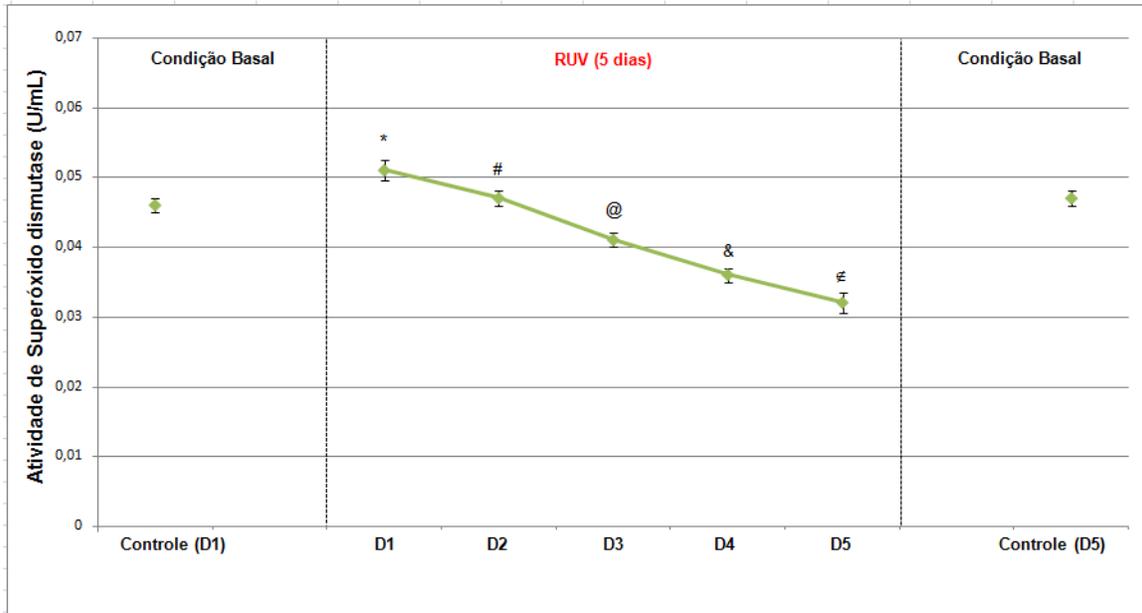
Figura 18. Atividade do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC). A atividade antioxidante foi

**determinada através da capacidade das amostras em seqüestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).** \*P<0,001, em relação ao Trolox 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,39, 0,195, 0,097 e 0,048 mg/mL, ARRLC 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,39 e 0,097 mg/mL, ERR 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562 e 0,781 mg/mL e LC 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562 e 0,781, 0,39 e P<0,05, em relação ao LC 0,195 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Conforme podemos observar, uma dose-resposta foi observada na capacidade seqüestrante dos radicais DPPH por parte dos três compostos avaliados. A resposta produzida por ARRLC se mostra mais pronunciada do que aquela observada com cada fração da associação na sua forma isolada. O perfil de resposta anti-radicalar observada para ERR e LC são muito similares, apresentando uma curva dose-dependente. Esses resultados foram comparados com aqueles obtidos com o Trolox, um controle positivo altamente seqüestrante, cuja IC<sub>50</sub> obtida foi de aproximadamente  $1,32 \times 10^{-2}$  mg/mL. A potência antioxidante dos compostos foi também mensurada através do cálculo de IC<sub>50</sub>, ou seja, concentração necessária para inibir 50% dos radicais DPPH. ERR demonstrou IC<sub>50</sub>=1,315 mg/mL, enquanto que LC apresentou IC<sub>50</sub>=1,35 mg/mL. A associação dos compostos (ARRLC), por sua vez, apresentou valor de IC<sub>50</sub>= $7,48 \times 10^{-1}$ , sugerindo potencialização do efeito antioxidante de ambos ERR e LC, quando associados.

#### 4.1.2.2. SOD

##### 4.1.2.2.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC



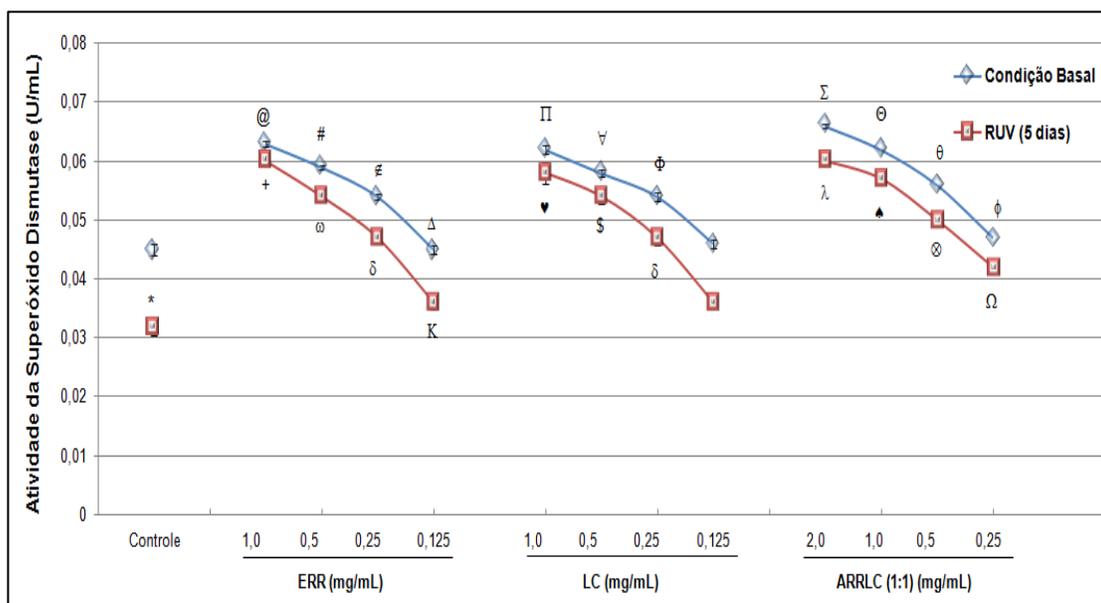
**Figura 19. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Superóxido dismutase (SOD) em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de SOD foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação à RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1, D2 e D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e P<0,01, em relação ao RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Este experimento buscou avaliar as alterações que ocorrem nos níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais de

SOD nas culturas celulares, as medidas obtidas em D1 e D5, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos concluir que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais desta enzima de *homeostase redox*.

Conforme podemos observar na figura 19, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um ligeiro aumento nos níveis de SOD em cultura de queratinócitos humanos, elevando em aproximadamente 11% o nível desta enzima quando comparado ao controle em condição basal. Em D2, podemos observar o início de uma queda nos níveis de SOD, onde há uma queda de aproximadamente 8% nos valores obtidos em D1, retornando aos níveis do controle não-irradiado. No terceiro dia de exposição (D3), podemos observar a tendência de queda nos níveis desta enzima, cujos valores aproximados chegam a 11% de queda em relação ao controle, e 12% em relação a D2. Em D4 e D5, dias que indicam exposição crônica das células à RUV, é possível observar uma queda acentuada na produção de SOD, apresentando níveis inferiores aqueles encontrados para o grupo controle, sendo aproximados 22% e 31% menores, respectivamente.

4.1.2.2.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 20. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de superóxido dismutase (SOD) em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de SOD foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; €P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; ΔP<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; ΠP<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; ∇P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; φP<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal; ΣP<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; ΩP<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0 mg/mL, ERR 0,5, 0,25 e 0,125

mg/mL em condição basal e LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL, LC 1,0 mg/mL, 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação ao ERR 0,25 mg/mL e P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL; <sup>o</sup>P<0,05, em relação ao controle em condição basal, LC 0,125 mg/mL e ERR 0,125 mg/mL, P<0,001, em relação ao ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL, LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0mg/mL; <sup>δ</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>k</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL; <sup>▼</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>§</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, LC/RUV 1,0 mg/mL e ERR/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>λ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação a LC/RUV 1,0 mg/mL e ERR 1,0 mg/mL em condição basal e P<0,05, em relação a ARRLC 1,0 mg/mL em condição basal; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0 mg/mL, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>⊙</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0 e 1,0 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>Ω</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

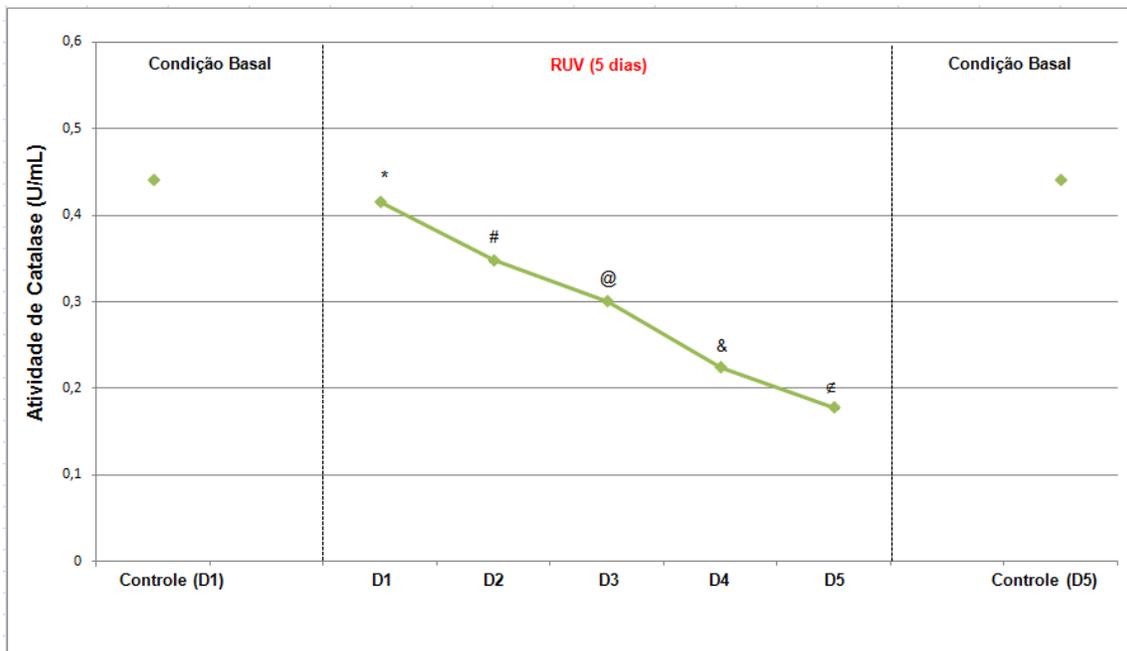
Conforme podemos observar na figura 20, os grupos tratados com ERR apresentaram, mesmo em condição basal, significativo aumento nos níveis de SOD de forma dose-dependente, alcançando concentração até 40% superior ao controle para a dose de 1,0 mg/mL. As doses de 0,5 e 0,25 mg/mL de ERR também induziram um aumento na atividade de SOD, sendo aproximadamente 31,5% e 20% maiores que os alcançados para o grupo controle. A atividade de SOD também foi aumentada após o tratamento com LC. As doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL de LC aumentaram a atividade desta enzima antioxidante em aproximadamente 38%, 29% e 20%, respectivamente. Demonstrando um efeito adicional sobre a atividade de SOD quando ERR e LC são utilizados em associação, ARRLC induziu um aumento significativo na atividade de SOD. A dose de 2,0 mg/mL, quando comparada ao controle em condição basal, aumentou em aproximadamente 47% a atividade de SOD, enquanto que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL promoveram um aumento de 37% e 25%, respectivamente. Quando avaliamos o perfil de resposta obtido em condição de estresse (RUVA/B), observamos que os grupos tratados com ERR causaram, de maneira dose-dependente, um aumento significativo na atividade de SOD quando comparados ao grupo controle irradiado. As doses de 1,0 e 0,5 mg/mL adicionadas à cultura celular após irradiação, também resultaram significativamente positivos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, o que demonstra que mesmo em condição de estresse crônico, o composto apresenta atividade estimuladora da atividade de SOD. Os resultados demonstram que mediante estresse solar a maior dose (1,0 mg/mL), promoveu

um aumento de aproximadamente 1,9 vezes em relação ao grupo controle irradiado. Quando comparamos o grupo irradiado e tratado com esta mesma dose, ao controle não-irradiado (condição basal), podemos observar que o aumento foi de aproximadamente 1,4 vezes. A dose de 0,5 mg/mL, por sua vez, provocou um aumento aproximado de 1,7 vezes em relação ao controle irradiado e de 1,2 vezes em relação ao controle em condição basal. As doses de 0,25 e 0,125 mg/mL de ERR adicionadas à cultura após estresse, foram capazes de estimular a atividade de SOD em aproximadamente 1,5 e 1,15 vezes respectivamente, em relação ao controle irradiado. Cabe ressaltar que a dose de 0,5 mg/mL de ERR manteve os níveis de SOD similares aqueles encontrados para o controle em condição basal. Os grupos irradiados que receberam tratamento com LC, por sua vez, apresentaram um comportamento similar aos grupos tratados com ERR, uma vez que as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL foram capazes de aumentar a atividade enzimática em aproximadas 1,8, 1,7 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação ao controle irradiado. Cabe ressaltar que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de LC foram capazes de aumentar a atividade de SOD, mesmo em relação à condição basal. A dose de 0,25 mg/mL manteve os níveis alcançados pelo controle em condição basal, o que favoreceu também a manutenção do sistema antioxidante natural de defesa das culturas celulares. Mediante estresse solar, as culturas celulares que receberam posterior tratamento com ARRLC mantiveram o perfil de resposta obtido para os grupos tratados apenas com ERR ou ARRLC, promovendo um aumento dose-dependente na atividade de SOD, revelando uma faixa de aumento que variou

de aproximadamente 1,3 – para a menor dose – a 1,9 vezes – para a maior dose –, em relação ao grupo controle irradiado. Estes resultados obtidos para a associação ARRLC nos grupos irradiados também foram considerados significativos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, demonstrando que mesmo frente ao estresse, a associação apresenta importantes efeitos estimulantes sobre o sistema de homeostase redox da pele, *in vitro*.

#### 4.1.2.3. CAT

4.1.2.3.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 21. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100

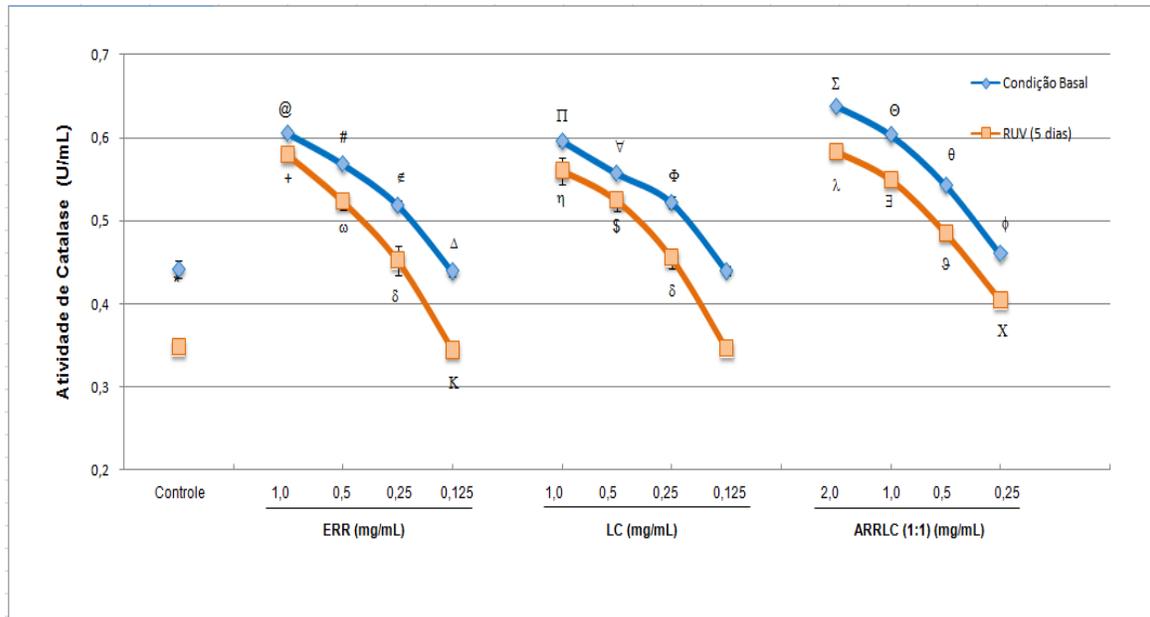
mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de CAT foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,01, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação à RUV D1 e controle D1; @P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1, D2 e D3; €P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e P<0,01, em relação ao RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Este experimento buscou avaliar as alterações que ocorrem nos níveis da enzima de homeostase redox catalase (CAT) após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais de CAT nas culturas celulares, as medidas obtidas em D1 e D5, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos concluir que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais desta enzima.

Conforme podemos observar na figura 21, a exposição à RUVA/B promove, já no primeiro dia, uma queda significativa na atividade de CAT em cultura celular, reduzindo em aproximadamente 6% o nível desta enzima quando comparado ao controle em condição basal. Em D2, podemos observar o início de uma queda mais acentuada nos níveis de CAT, onde há uma redução de aproximadamente 21% nos valores obtidos para o grupo controle, bem como uma redução de 16,5% em relação ao controle. No terceiro dia de exposição (D3), podemos observar a tendência contínua de queda nos níveis de CAT, cujos valores aproximados chegam a 32% de queda em relação ao controle, e 14% em relação a D2. Em D4 e D5, dias que indicam exposição crônica das células à RUV, é possível observar quedas ainda mais acentuadas na produção

de CAT, apresentando níveis inferiores aqueles encontrados para o grupo controle, sendo aproximados 49% e 59% menores, respectivamente.

4.1.2.3.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 22. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção da enzima catalase (CAT) em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de CAT foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; €P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>A</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>II</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>V</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>Φ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 e 0,5

mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>2</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>9</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0 mg/mL, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>9</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL, LC 1,0 mg/mL, 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação ao ERR 0,25 mg/mL e P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL; <sup>9</sup>P<0,05, em relação ao controle em condição basal, LC 0,125 mg/mL e ERR 0,125 mg/mL, P<0,001, em relação ao ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL, LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0mg/mL; <sup>8</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>k</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL; <sup>7</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>\$</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, LC/RUV 1,0 mg/mL e ERR/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>λ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação a LC/RUV 1,0 mg/mL e ERR 1,0 mg/mL em condição basal e P<0,05, em relação a ARRLC 1,0 mg/mL em condição basal; <sup>3</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0 mg/mL, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>9</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0 e 1,0 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>x</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e

0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Conforme apresentado na figura 22, os grupos tratados com ERR apresentaram, mesmo em condição basal, um aumento significativo nos níveis de CAT de forma dose-dependente, alcançando concentração até 27,1% superior ao controle para a dose de 1,0 mg/mL. Também apresentaram dados significativos, os grupos tratados com 0,5 e 0,25 mg/mL de ERR, doses que geraram um aumento na atividade de CAT em aproximadamente 28% e 17%, respectivamente. A atividade de CAT também foi aumentada após o tratamento com LC, o qual induziu um aumento aproximado de 35%, 26% e 18%, respectivamente, para as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, quando comparados ao grupo controle. ARRLC induziu um aumento ainda maior na atividade de CAT quando comparado aos aumentos induzidos por ERR ou LC utilizados separadamente, o que demonstra um efeito adicional sobre a atividade desta enzima quando estes compostos são utilizados em associação. A dose de 2,0 mg/mL de ARRLC, quando comparada ao controle em condição basal, aumentou em aproximadamente 45% a atividade de CAT, enquanto que as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL promoveram um aumento de aproximadamente 36%, 23% e 5%, respectivamente. Quando levamos em consideração o perfil de resposta obtido para os grupos que sofreram exposição à RUVA/B, observamos que os aqueles que receberam tratamento com ERR causaram, de maneira dose-dependente, um aumento significativo na atividade de CAT quando

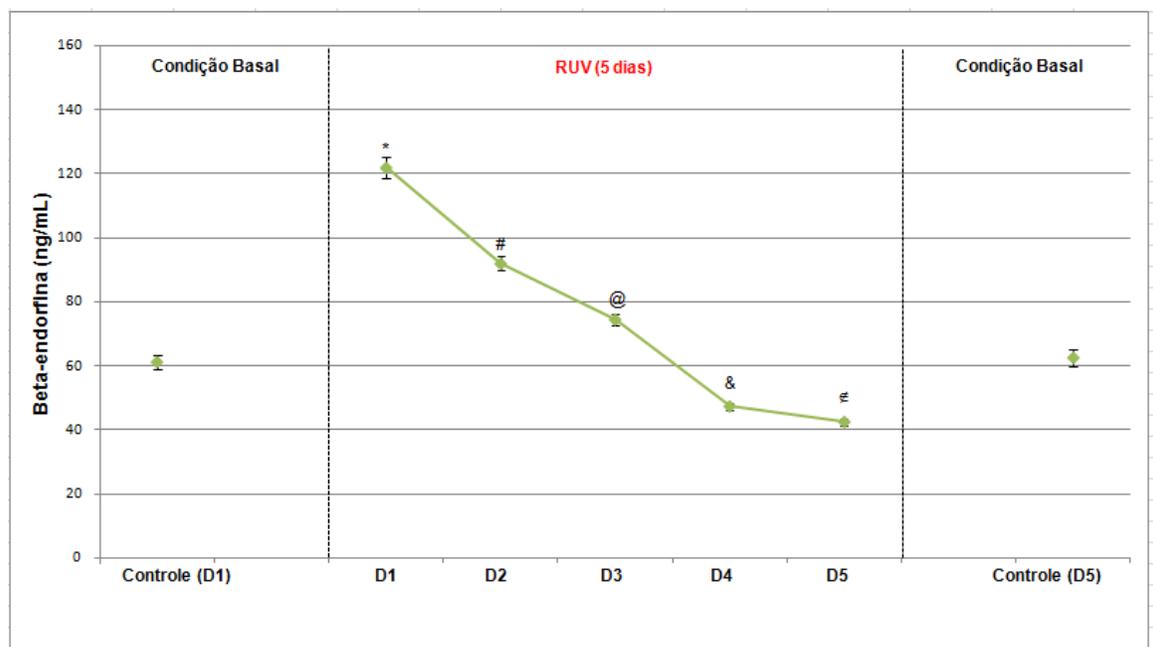
comparados ao grupo controle irradiado. As doses de 1,0 e 0,5 mg/mL adicionadas à cultura celular após irradiação, também apresentaram resultados significativamente positivos quando comparamos ao grupo controle não-irradiado (condição basal), o que demonstra que mesmo em condição de estresse crônico, representado por 5 dias de RUVA/B, o composto apresenta atividade estimuladora da atividade de CAT, resultando em níveis aproximadamente 31% e 18% maiores, respectivamente. Os resultados demonstram que mediante estresse solar 1,0 mg/mL de ERR adicionado posteriormente à cultura celular irradiada promoveu um aumento de aproximadamente 66% na atividade de SOD, em relação ao grupo controle irradiado. A dose de 0,5 mg/mL, por sua vez, provocou um aumento aproximado de 50% na atividade de CAT, quando comparado àquela apresentada pelo grupo controle irradiado. A dose de 0,25 mg/mL de ERR adicionadas à cultura após estresse, foi capaz de estimular a atividade de CAT em aproximadamente 30%, em relação ao controle irradiado. Cabe ressaltar que a dose de 0,5 mg/mL de ERR manteve os níveis de CAT ainda superiores aqueles encontrados para o controle em condição basal. Os grupos irradiados que receberam tratamento com LC, por sua vez, apresentaram um comportamento similar aos grupos tratados com ERR, uma vez que as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL foram capazes de aumentar a atividade desta enzima em aproximados 61%, 51% e 30%, respectivamente, em relação ao grupo controle irradiado. Cabe ressaltar que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de LC foram capazes de aumentar a atividade de CAT, mesmo em relação à condição basal. A dose de 0,25 mg/mL manteve os níveis alcançados pelo controle em condição

basal, o que favoreceu também a manutenção do sistema antioxidante natural de defesa das culturas celulares. Mediante estresse solar, as culturas celulares que receberam posterior tratamento com ARRLC mantiveram o perfil de resposta obtido para os grupos tratados apenas com ERR ou ARRLC, promovendo um aumento dose-dependente na atividade de CAT, revelando uma faixa de aumento que variou de aproximadamente 16% – para a menor dose (0,25 mg/mL) – a 68% vezes – para a maior dose (2,0 mg/mL) –, em relação ao grupo controle irradiado. Cabe ressaltar que um efeito aditivo desta associação (ARRLC) foi observado, uma vez que a atividade de CAT foi aumentada também para a menor dose. Os resultados obtidos para os grupos tratados com ARRLC nas doses de 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL também foram considerados significativos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, o que demonstra que mesmo frente à exposição à RUVA/B, a associação apresenta consideráveis efeitos estimulantes *in vitro* sobre o sistema de homeostase redox da pele.

4.1.3. Avaliação dos efeitos do extrato de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo *L*-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção dos neuropeptídeos proopiomelanocortina-derivados (POMCs)  $\beta$ -endorfina e encefalina em cultura de queratinócitos humanos.

#### 4.1.3.1. $\beta$ -endorfina

4.1.3.1.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 23. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de beta-endorfina em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de beta-endorfina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em

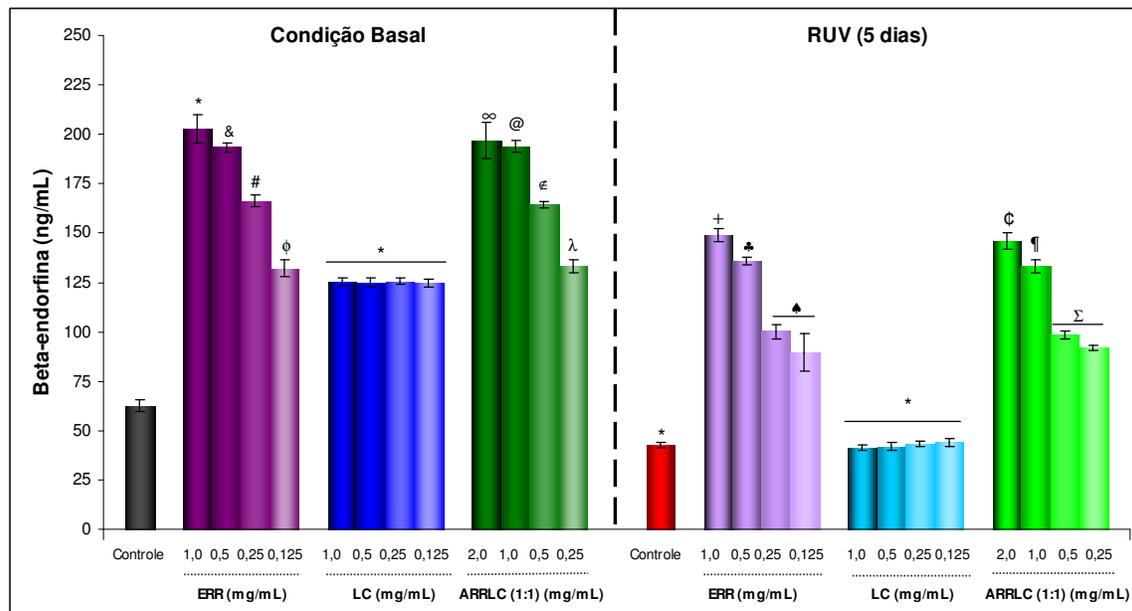
relação ao controle D1, controle D5, RUV D1, D2 e D3;  $\neq P < 0,001$ , em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e  $P < 0,01$ , em relação ao RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Este experimento buscou avaliar as alterações que ocorrem nos níveis de  $\beta$ -endorfina após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais de  $\beta$ -endorfina nas culturas celulares, as medidas obtidas em D1 e D5, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos concluir que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais deste mediador.

Conforme podemos observar na figura 23, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento expressivo na concentração de  $\beta$ -endorfina em cultura de queratinócitos humanos, elevando em aproximadamente 2 vezes o nível deste POMC peptídeo, quando comparado ao controle, mantido em condição basal. Logo no segundo dia de exposição, podemos observar uma queda de aproximadamente 25% nos níveis de  $\beta$ -endorfina, porém ainda acima daqueles encontrados em condição basal, em uma taxa de aproximadamente 50%. No terceiro dia de exposição (D3), podemos observar a tendência de queda nos níveis deste mediador, mas com valores superiores aqueles encontrados no grupo controle. Em D4 e D5, dias que indicam exposição crônica das células à RUV, é possível observar uma queda acentuada na produção de  $\beta$ -endorfina, apresentando níveis inferiores aqueles encontrados para o grupo controle, sendo 22,66 e 30,61%, respectivamente. Cabe ressaltar que a concentração deste POMC peptídeo obtido no quinto dia de exposição foi

significativamente menor do que a obtida no quarto dia (D4), demonstrando que a exposição crônica da cultura celular à RUV/A/B leva a uma considerável redução nos níveis basais de  $\beta$ -endorfina.

#### 4.1.3.1.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUV/A/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 24. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de beta-endorfina em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de beta-endorfina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; &P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal;  $\phi$ P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal;  $\infty$ P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em

condição basal e ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>@</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>λ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV e ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV e ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e <sup>\*</sup>P<0,01, em relação ao ERR/RUV 1,0 mg/mL; <sup>^</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, <sup>°</sup>P<0,01, em relação ao ERR 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, <sup>°</sup>P<0,05, em relação ao ERR/RUV 0,5 mg/mL e <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao ERR/RUV 0,25 e 0,125 mg/mL e LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 mg/mL em condição basal, <sup>¶</sup>P<0,05, em relação ao ERR/RUV 1,0 mg/mL e <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao ERR/RUV 0,25 e 0,125 mg/mL e LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>Σ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, <sup>Σ</sup>P<0,001, em relação ao ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e <sup>Σ</sup>P<0,001, em relação LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Neste experimento, ERR e LC foram aplicados nas culturas de queratinócitos humanos nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, enquanto ARRLC foi aplicada nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ambos após cinco dias de exposição crônica das culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias).

Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

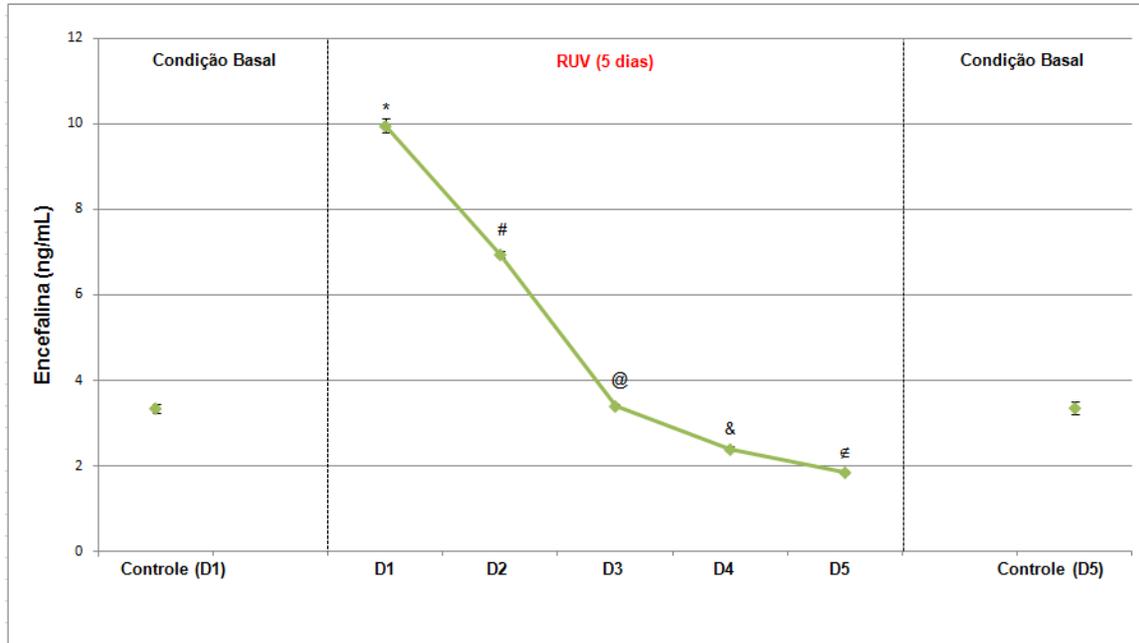
Conforme podemos observar na figura 24, os grupos tratados com ERR apresentaram, já em condição basal, um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -endorfina de forma dose-dependente, alcançando concentração até 3 vezes superior ao controle para a dose de 1 mg/mL. Os grupos que receberam LC também apresentaram aumento considerável nos níveis de  $\beta$ -endorfina quando comparados ao controle em condição basal. Neste caso houve um aumento homogêneo, não dose-dependente, de aproximadamente 2 vezes nos níveis basais deste mediador, um índice similar aquele obtido com a menor dose de ERR. De forma curiosa, os grupos tratados com a associação destes compostos (ARRLC) apresentaram um perfil praticamente idêntico ao encontrado para os grupos que receberam somente ERR, sendo os valores não significativos entre si quando comparamos a mesma equivalência de doses.

Quando avaliamos o perfil de resposta obtido em condição de estresse (RUVA/B), observamos que os grupos tratados com ERR causaram, de maneira dose-dependente, um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -endorfina quando comparados ao grupo controle irradiado. Estes achados também demonstraram significância mesmo quando comparamos ao grupo controle não-irradiado, demonstrando que mesmo em condição de estresse crônico, o composto apresenta atividade estimuladora da síntese deste neuropeptídeo. Os resultados

demonstram que mediante estresse solar a maior dose (1 mg/mL), promoveu um aumento de aproximadamente 3,5 vezes em relação ao respectivo grupo controle. Quando comparamos o grupo irradiado e tratado com esta mesma dose, ao controle não-irradiado (condição basal), podemos observar que o aumento foi de aproximadamente 2,3 vezes. Mesmo com a menor dose avaliada (0,125 mg/mL), pudemos verificar um aumento importante, especialmente quando comparamos ao respectivo grupo controle irradiado, alcançando um índice de aumento de aproximadamente 100% nos níveis de  $\beta$ -endorfina. Nos grupos irradiados e tratados com LC, um perfil de resposta diferente daquele encontrado em condição basal foi obtido, uma vez que em todas as doses avaliadas não observou-se aumento na produção de  $\beta$ -endorfina, apresentando níveis similares e não-significativos àquele obtido para o grupo controle irradiado. No entanto, os grupos irradiados que receberam ARRLC, mantiveram o perfil de resposta obtido para os grupos tratados apenas com ERR, promovendo um aumento dose-dependente na produção de  $\beta$ -endorfina, revelando uma faixa de aumento que variou de aproximadamente 2,16 – para a menor dose – a 3,42 vezes – para a maior dose –, em relação ao grupo controle irradiado. Estes resultados obtidos para a associação ARRLC nos grupos irradiados também foram considerados significativos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, demonstrando que mesmo frente ao estresse, o composto apresenta importantes efeitos estimulantes sobre o sistema neuro-endocrinológico da pele.

#### 4.1.3.2. Encefalina

##### 4.1.3.2.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*



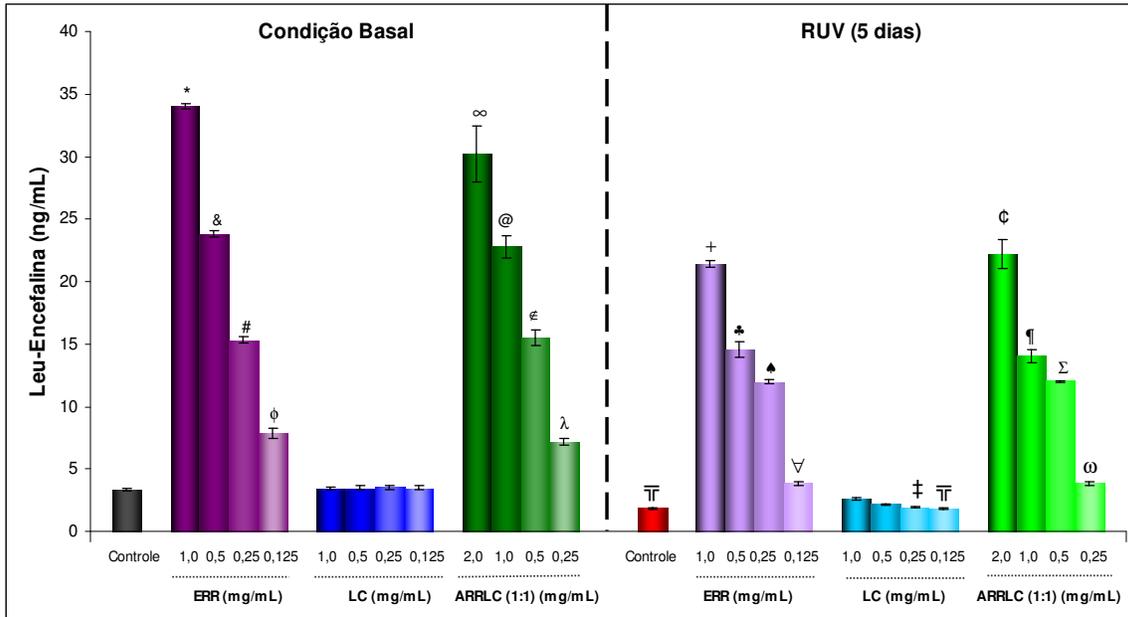
**Figura 25. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Leu-encefalina em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de Leu-encefalina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle D1, controle D5, RUV D1, D2 e D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Neste experimento, buscamos avaliar as alterações que ocorrem nos níveis de encefalina após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais de encefalina

nas culturas celulares, as medidas obtidas em D1 e D5, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos concluir que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de encefalina.

Conforme demonstrado na figura 25, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento expressivo na concentração de encefalina nas culturas celulares, elevando em aproximadamente 3 vezes o nível deste POMC peptídeo em D1. Em D2, podemos observar ainda um aumento em relação aos níveis basais, porém em menor proporção (2,1 vezes). No terceiro dia de exposição (D3), podemos observar uma tendência contínua dos níveis de encefalina, alcançando valores similares e não-significativos aqueles obtidos para o grupo controle. Em D4, por sua vez, podemos observar uma redução considerável na produção de encefalina, com queda aproximada de 28,65% em relação à condição basal. Ilustrando as conseqüências de uma exposição crônica à RUVA/B, os resultados obtidos em D5 indicam valores 1,8 vezes menores quando comparados aqueles obtidos em condição basal.

4.1.3.2.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUV A/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 26. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de Leu-encefalina em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de Leu-encefalina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; &P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; φP<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; ∞P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; @P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>ε</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>λ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal,

LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>π</sup>P<0,01, em relação ao controle; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>∇</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>‡</sup>P<0,05, em relação ao controle em condição basal; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ERR/UV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e ARRLC/UV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL e <sup>°</sup>P<0,01, em relação ao ERR 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0, 0,25 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e ARRLC/UV 0,5 e 0,25 mg/mL e <sup>¶</sup>P<0,01, em relação ao ARRLC 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>Ⓢ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0 e 0,25 e 0,125 mg/mL, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e ARRLC/UV 0,25 mg/mL; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/UV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC/UV 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>°</sup>P<0,01, em relação a LC/UV 0,5 mg/mL (ANOVA, Tukey).

ERR, LC foram aplicados nas culturas de queratinócitos humanos nas concentrações de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, enquanto ARRLC foi aplicada nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ambos após cinco dias de exposição crônica das culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias). Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

Conforme podemos observar na figura 26, os grupos tratados com ERR apresentaram, já em condição basal, um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -endorfina para todas as doses avaliadas e de forma dose-dependente. Os aumentos obtidos foram de aproximadamente 10, 7, 4,5 e 2,4 vezes, respectivamente para as doses de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL. Não foi observado para este parâmetro aumento significativo nos grupos que receberam apenas LC, mantendo níveis compatíveis com o grupo controle. Ainda em condição basal, quando avaliamos o perfil de resposta obtido para ARRLC, cujos níveis de aumento foram aproximadamente 9, 6,8, 5,2 e 2,1 vezes superior ao controle para as doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, respectivamente, podemos concluir que o perfil de resposta para a associação foi similar aquele obtido para os grupos que receberam apenas ERR. Se levarmos em consideração a equivalência de doses, é possível concluir que apenas ao compararmos a dose de 1,0 mg/mL de ERR com a dose de 2,0 mg/mL de ARRLC, teremos uma diferença significativa no perfil de resposta dos dois produtos.

Quando avaliamos o perfil de resposta obtido em condição de estresse (RUVA/B), observamos que os grupos tratados com ERR causaram, de forma dose-dependente, um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -endorfina quando comparados ao grupo controle irradiado. Estes achados também demonstraram importante significância mesmo quando comparamos ao grupo controle não-irradiado, demonstrando que mesmo em condição de estresse crônico, o composto apresenta atividade estimuladora da síntese deste POMC-peptídeo. Os resultados demonstram que mediante estresse solar a maior dose (1 mg/mL),

promoveu um aumento de aproximadamente 11,5 vezes em relação ao respectivo grupo controle. Mesmo com a menor dose utilizada, o que corresponde a 0,125 mg/mL, ERR promoveu um aumento de aproximadamente 2 vezes nos níveis de encefalina, quando comparado ao grupo controle irradiado. Além disso, todas as doses de ERR avaliadas, mesmo em condição de estresse, foram capazes de estimular significativamente a produção de encefalina por queratinócitos humanos quando levamos em consideração os níveis atingidos pelo grupo controle em condição basal. Nos grupos irradiados e tratados com LC não foi possível observar um aumento na produção de encefalina, mantendo níveis similares aqueles demonstrados pelo grupo controle irradiado. De forma diferente, os grupos irradiados com a associação de LC com ERR (ARRLC), mantiveram o perfil de resposta obtido para os grupos tratados apenas com ERR, promovendo um aumento dose-dependente na produção de  $\beta$ -endorfina, revelando uma faixa de aumento que variou de aproximadamente 2,1 a 12 vezes, considerando a ordem crescente de doses aplicadas em cultura. Estes resultados obtidos para a associação ARRLC nos grupos irradiados também foram considerados significativos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, demonstrando que mesmo frente ao estresse, o continua desempenhando um papel de modulação das respostas neuromediadas na pele.

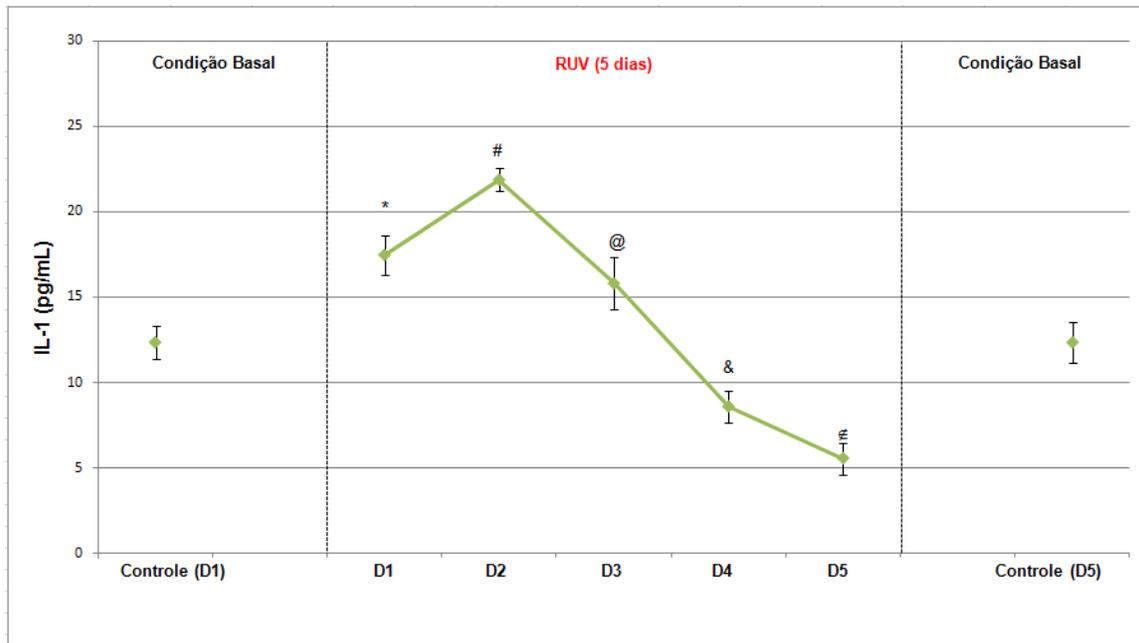
4.1.4. *Avaliação dos efeitos do extrato de Rhodiola rosea (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em cultura de queratinócitos humanos.*

IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são consideradas citocinas pró-inflamatórias e, diferente de muitos outros mediadores imunológicos considerados interleucinas, são as únicas capazes de ativar um número realmente suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear processos inflamatórios que culminam na aceleração do envelhecimento cutâneo. Por este motivo, buscamos nestes experimentos avaliar o perfil de resposta de células da epiderme humana frente o impacto da RUVA/B de forma aguda e crônica.

#### 4.1.4.1. IL-1 $\alpha$

4.1.4.1.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

. Neste experimento, buscamos avaliar as alterações que ocorrem nos níveis de IL-1 $\alpha$  após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais desta citocina, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de IL-1 $\alpha$ .

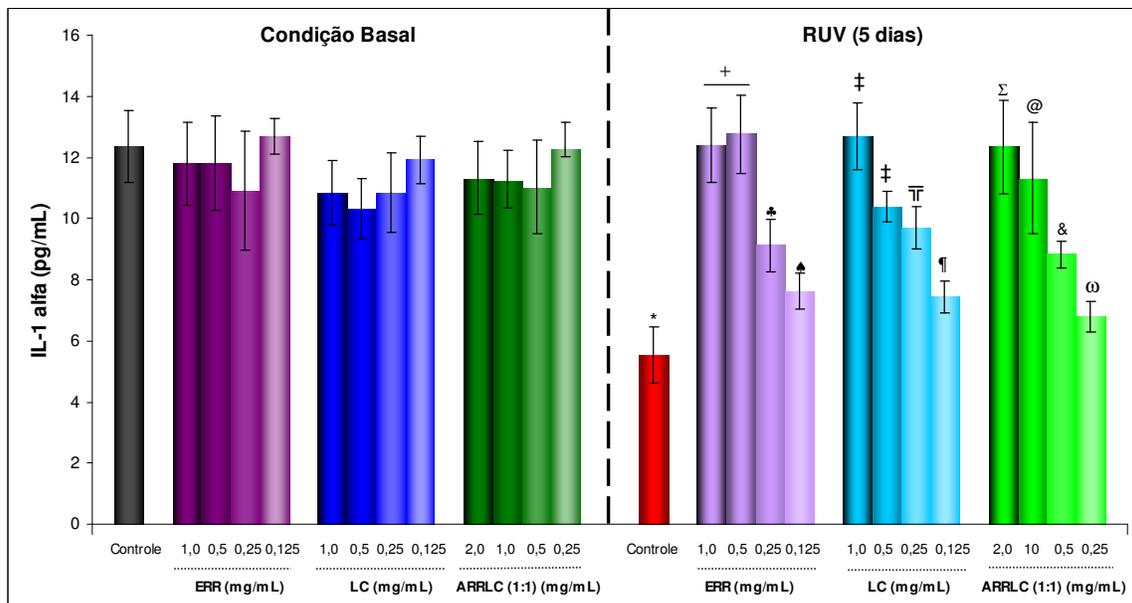


**Figura 27. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de IL-1 $\alpha$  em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de IL-1 $\alpha$  foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, D2 e D3; #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 27, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento significativo na produção de IL-1 $\alpha$  nas culturas celulares, nos três primeiros dias de exposição. Níveis máximos de IL-1 $\alpha$  foram atingidos em D2, onde pudemos observar um aumento de cerca de 43,6% em relação ao controle não irradiado. O pico máximo atingido em D2 foi 1,25 vezes maior do que os valores atingidos em D1, demonstrando que até o segundo dia

de exposição ocorre um aumento gradual. Quando avaliamos o nível de resposta obtido em D3, podemos observar que é superior ao obtido com o grupo controle não-irradiado (1,28 vezes). No entanto, há uma queda de aproximadamente 28% em relação a D2, o que demonstra o início de uma tendência de queda. Em D4, como era de esperar, podemos observar uma redução considerável na produção de IL-1 $\alpha$ , com queda aproximada de 30,5% em relação à condição basal. Ilustrando as conseqüências de uma exposição crônica à RUVA/B, os resultados obtidos em D5 indicam valores 1,8 vezes menores quando comparados aqueles obtidos em condição basal. Estes achados indicam que ao longo de 5 dias, temos as conseqüências da exposição crônica à RUV, onde os níveis de IL-1 $\alpha$  encontram-se reduzidos.

*4.1.4.1.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 28. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de IL-1 $\alpha$  em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de IL-1 $\alpha$  foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; †P<0,001, em relação ao controle/RUV; \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e ERR 0,125 mg/mL em condição basal, \*P<0,05, em relação ao ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; ‡P<0,001, em relação ao controle/RUV; ¯P<0,001, em relação ao controle/RUV e ¯P<0,01, em relação ao LC/RUV 1,0 mg/mL; ¶P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL e ¶P<0,01, em relação ao LC 0,5 mg/mL em condição basal e LC/RUV 0,5 mg/mL; ¸P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC/UV 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/UV 0,25 e 0,125 mg/mL e °P<0,05, em relação ao LC/UV 0,25 mg/mL; @P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC/RUV 0,125 mg/mL, ERR/RUV 0,125 mg/mL e @P<0,05, em relação ao ARRLC/RUV 0,5 mg/mL; &P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0 mg/mL, ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e ERR 0,125 mg/mL em condição basal e &P<0,01, em relação ao LC 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e °P<0,01, em relação ao LC/RUV 0,25 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Para este experimento, as culturas celulares receberam ERR e LC nas concentrações 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, e ARRLC nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ambos aplicados após cinco dias de exposição crônica das

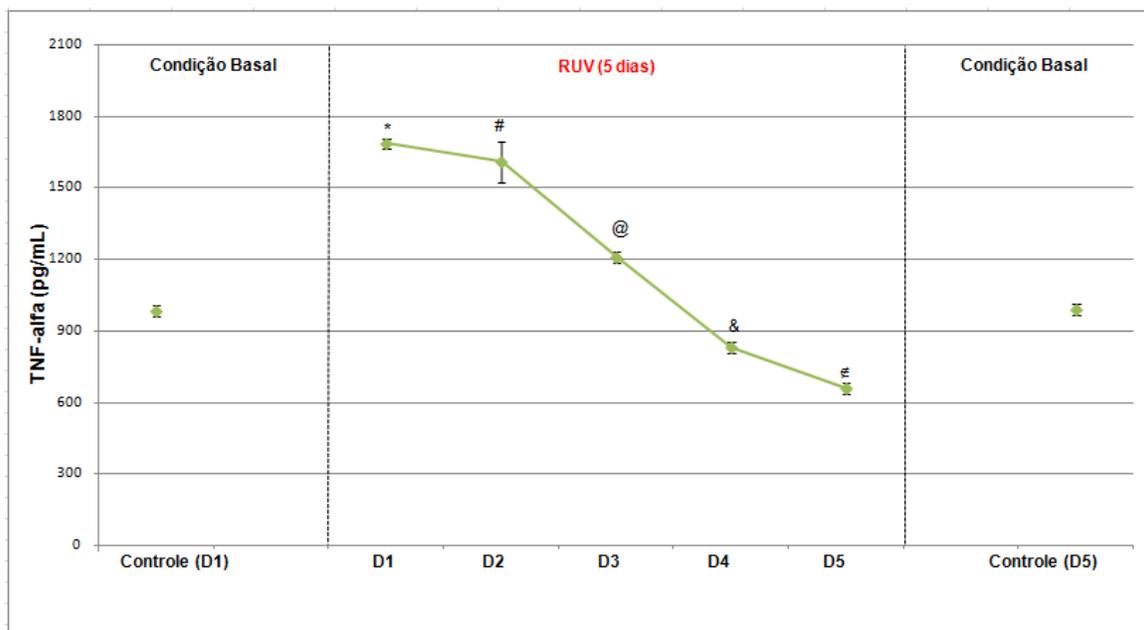
culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias). Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

De acordo com a figura 28, todos os grupos avaliados demonstraram ausência de resposta em condição basal, ou seja, tanto ERR, quanto LC e ARRLC não alteraram o perfil de resposta para IL-1 $\alpha$ , quando comparamos ao grupo controle nas mesmas condições. Após 5 dias de exposição à RUVA/B, podemos observar que o grupo controle apresentou uma redução de aproximadamente 2,22 vezes nos níveis basais de IL-1 $\alpha$ . Quando levamos em consideração o perfil de resposta obtido com os grupos que recebem tratamento com ERR, LC ou ARRLC, observa-se que os níveis deste mediador apresentam-se superiores aqueles obtidos para o grupo controle não-tratado e irradiado. As duas maiores doses, para os 3 produtos avaliados, foram capazes de manter os níveis de IL-1 $\alpha$  similares aqueles obtidos para o controle em não-irradiado, recuperando, algumas vezes, o perfil de resposta imunológica dos queratinócitos para este perfil de citocina. As menores doses, ou seja, as doses de 0,25 e 0,125 mg/mL para LC e ERR, e as doses de 0,5 e 0,25 mg/mL para ARRLC, não foram capazes de restabelecer os níveis normais de IL-1 $\alpha$ , mas de forma significativa, elevaram os níveis deste mediador quando comparamos ao grupo controle apenas irradiado.

#### 4.1.4.2. TNF- $\alpha$

##### 4.1.4.2.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar as alterações que ocorrem nos níveis de TNF- $\alpha$  após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais desta citocina, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de TNF- $\alpha$ .

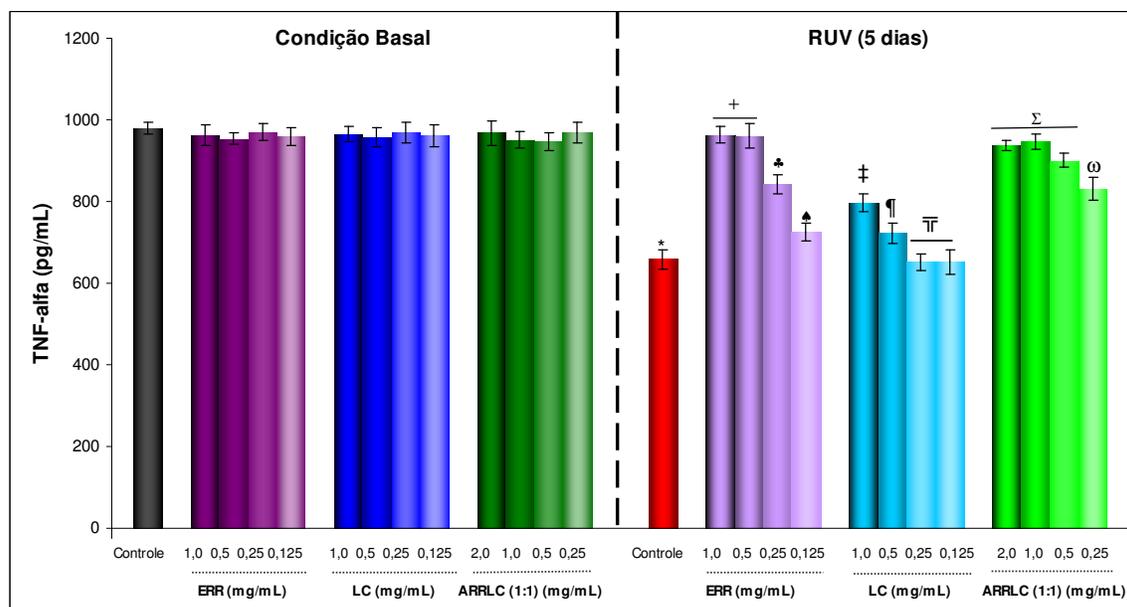


**Figura 29. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de TNF- $\alpha$  foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão

obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e P<0,05, em relação ao RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, D2 e D3; ≠P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Como podemos observar na figura 29, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  nas culturas celulares, nos três primeiros dias de exposição. Níveis máximos de TNF- $\alpha$  foram atingidos já no 1º dia de exposição (D1), onde observa-se um aumento de cerca de 71,5% em relação ao controle. Os valores obtidos em D2 já demonstram o início de uma queda gradual deste mediador ao longo dos cinco dias, sendo 1,05 vezes menor que D1. Quando avaliamos o nível de resposta obtido em D3, podemos observar ainda um aumento de aproximadamente 1,22 vezes em relação ao controle, porém já é 1,44 vezes menor que os valores obtidos para D2, o que confirma uma tendência de queda, assim como observado de D1 para D2. Em D4, como era de esperar, podemos observar uma redução considerável na produção de TNF- $\alpha$ , com queda aproximada de 19% em relação à condição basal. Ilustrando as conseqüências de uma exposição crônica à RUVA/B, os resultados obtidos em D5 indicam valores em torno de 50% inferiores quando comparados aqueles obtidos em condição basal. Estes achados indicam que ao longo de 5 dias, temos as conseqüências do fotoenvelhecimento, onde os níveis de TNF- $\alpha$  encontram-se conhecidamente reduzidos.

4.1.4.2.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 30. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de TNF- $\alpha$  foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; †P<0,001, em relação ao controle/RUV; ‡P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; §P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; ¶P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; ¯P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; ΣP<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; ΩP<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC/UV 0,25 mg/mL, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e ERR/RUV 0,25 e 0,125 mg/mL; ωP<0,001, em relação ao controle em condição basal e

controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Para este experimento, as culturas celulares receberam ERR e LC nas concentrações 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, e a associação de ambos (ARRLC) nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, todos aplicados após cinco dias de exposição crônica das culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias). Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

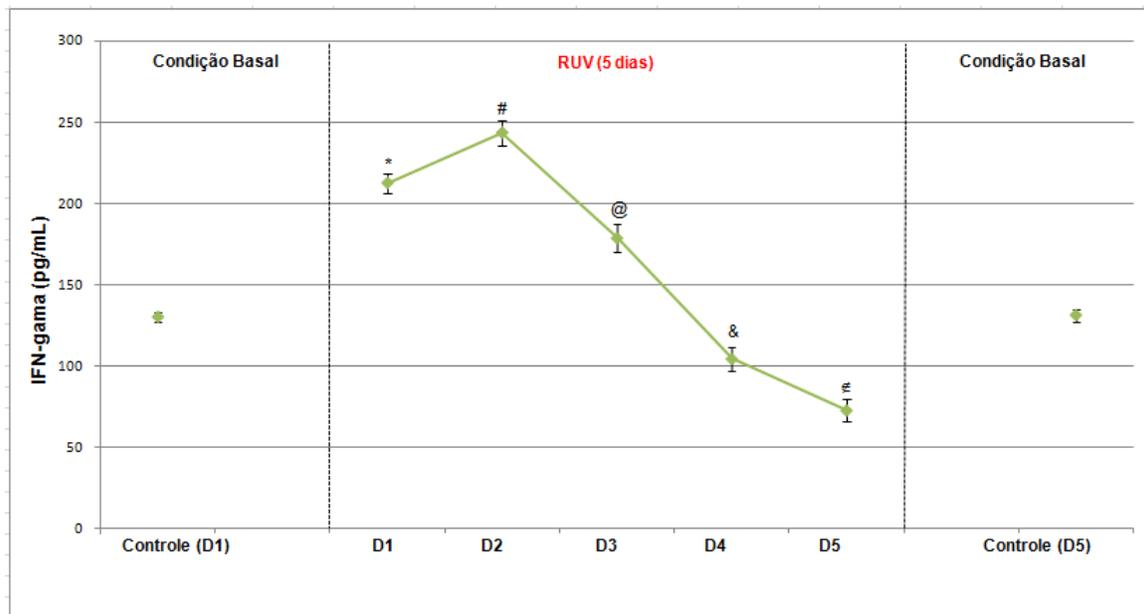
Conforme podemos observar na figura 30, assim como observado para IL-1 $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória do mesmo padrão de resposta imunológica, para todos os grupos e doses avaliadas, houve ausência de resposta em condição basal, ou seja, não alteraram o perfil de resposta para TNF- $\alpha$ , quando comparamos ao grupo controle em condição basal. Após 5 dias de exposição à RUVA/B, podemos observar que o grupo controle apresentou uma redução de aproximadamente 1,5 vezes nos níveis basais de TNF- $\alpha$ . Quando o perfil de resposta obtido com os grupos que receberam tratamento apenas com ERR é levado em consideração, observa-se que para as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, que apresentaram os mesmos efeitos, os níveis deste mediador apresentam-se similares aqueles obtidos para o grupo controle em condição basal. O mesmo

padrão de resposta foi obtido com as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC. Para LC, um efeito positivo é observado apenas para as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, porém apenas quando comparado ao grupo controle não-tratado e irradiado, não sendo possível observar um efeito deste produto na reversão completa da resposta obtida com o estresse solar. As doses de 0,25 e 0,125 mg/mL de ERR foram capazes também, mesmo de forma discreta, de elevar os níveis de TNF- $\alpha$  em relação ao controle irradiado. Estes achados não foram observados para as para as duas menores doses de LC. No entanto, quando observamos os níveis de TNF- $\alpha$  após irradiação nos grupos que receberam tratamento com ARRLC, um efeito aditivo é obtido, especialmente com as menores doses, uma vez que o padrão de resposta por equivalência de doses, é superior aquele obtido para ERR e LC isoladamente. Mesmo a dose de 0,5 mg/mL de ARRLC, que equivale à dose de 0,25 mg/mL de LC e ERR, apresentou níveis similares aqueles obtidos para o controle em condição basal, sendo suficientes para reverter os efeitos imunossupressores da RUV após 5 dias de exposição.

#### 4.1.4.3. IFN- $\gamma$

##### 4.1.4.3.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar as alterações que ocorrem nos níveis de IFN- $\gamma$  após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis basais desta citocina, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de IFN- $\gamma$ .

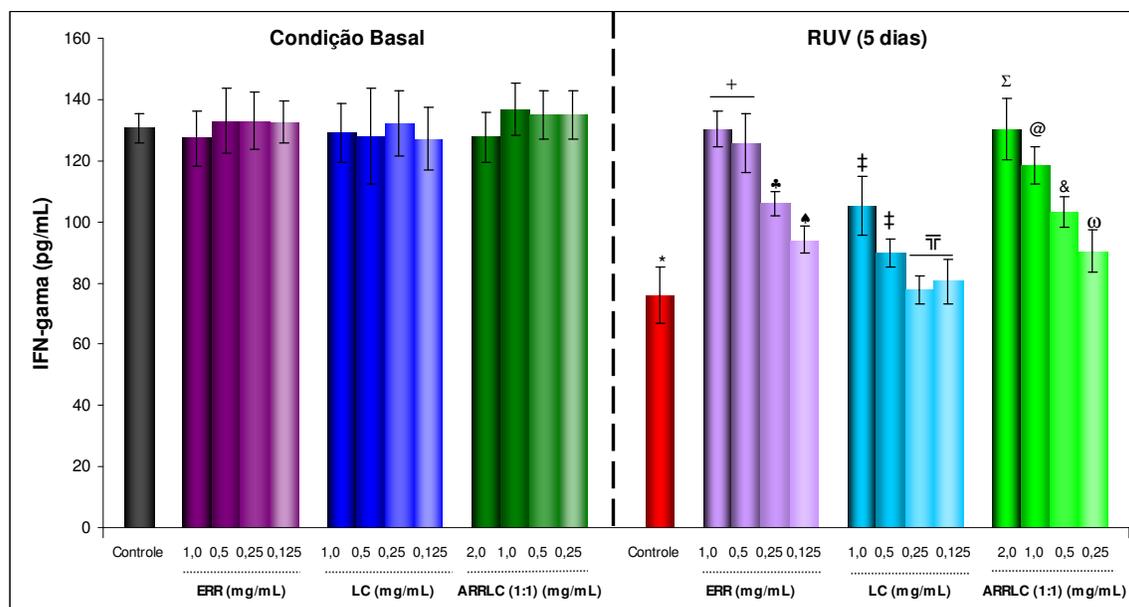


**Figura 31. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de IFN- $\gamma$  em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de IFN- $\gamma$  foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001,

em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1;  $^{\circ}P < 0,001$ , em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D1 e RUV D2;  $\&P < 0,001$ , em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, D2 e D3;  $\notin P < 0,001$ , em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na figura 31, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  nas culturas celulares, nos três primeiros dias de exposição. Níveis máximos de IFN- $\gamma$  foram atingidos no 2º dia de exposição (D2), onde é observado um aumento cerca de 62,15%, em relação ao controle. Os valores obtidos em D3 já demonstram o início de uma queda gradual deste mediador ao longo dos cinco dias, sendo 26,6% menor que D2. Quando avaliamos o nível de resposta obtido em D4, já é possível observar uma redução para níveis inferiores aos níveis basais, sendo aproximadamente 1,25 vezes menor que controle e 1,7 vezes menor que os valores obtidos para D3, o que confirma uma tendência de queda, assim como observado de D2 para D3. Em D5, como era de esperar, podemos observar uma redução ainda mais acentuada na produção de IFN- $\gamma$ , com queda aproximada de 44,15% em relação à condição basal. Estes achados indicam as conseqüências do fotoenvelhecimento, onde os níveis de IFN- $\gamma$  encontram-se conhecidamente reduzidos.

4.1.4.2.2. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC



**Figura 32. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de *IFN-γ* em cultura de queratinócitos humanos.** Queratinócitos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de *IFN-γ* foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; +P<0,001, em relação ao controle/RUV; \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ERR 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e \*P<0,01, em relação ao ERR 1,0 mg/mL em condição basal; \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e \*P<0,05, em relação ao controle/RUV; ‡P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, LC 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal e \*P<0,01, em relação ao LC 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal; ¯P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC/RUV 1,0 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; ΣP<0,001, em relação ao controle/RUV, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ARRLC/UV 0,5 e 0,25 mg/mL, ERR/UV 0,25 e 0,125 mg/mL; @P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL,

ERR/RUV 0,125 mg/mL e <sup>@</sup>P<0,05, em relação ao ARRLC/RUV 1,0 mg/mL; <sup>&</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; LC/RUV 0,25 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, e <sup>@</sup>P<0,01, em relação ao LC/RUV 0,125 mg/mL e ERR 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL (ANOVA, Tukey).

Para este experimento, as culturas celulares receberam ERR e LC nas concentrações 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, e ARRLC nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ambos aplicados após cinco dias de exposição crônica das culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias). Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

De acordo com a figura 32, todos os grupos avaliados demonstraram ausência de resposta em condição basal, ou seja, tanto ERR, quanto LC e ARRLC não alteraram o perfil de resposta para IFN- $\gamma$ , quando comparamos ao grupo controle nas mesmas condições. Após 5 dias de exposição à RUVA/B, podemos observar que o grupo controle apresentou uma redução de aproximadamente 1,7 vezes nos níveis basais de IFN- $\gamma$ . Quando levamos em consideração o perfil de resposta obtido com os grupos irradiados que receberam tratamento com ERR, LC ou ARRLC, observa-se que os níveis deste mediador apresentam-se superiores aqueles obtidos para o grupo controle não-

tratado e irradiado, com exceção daqueles que receberam LC nas doses de 0,25 e 0,125 mg/mL, os quais não apresentaram efeitos significativamente diferentes do controle irradiado. As duas maiores doses, para os 3 produtos avaliados, foram capazes de manter os níveis de IFN- $\gamma$  similar aquele obtido para o controle não-irradiado, praticamente recuperando o perfil de resposta imunológica dos queratinócitos para este perfil de citocina. Para os grupos que receberam apenas ERR, a produção de IFN- $\gamma$  observada foi a mesma para os grupos tratados com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, sendo aproximadamente 1,6 vezes maior que a produção obtida para o grupo controle apenas irradiado. Para as doses de 0,25 e 0,125 mg/mL observa-se uma resposta dose-dependente, sendo 1,38 e 1,23 vezes superior ao valor obtido para o grupo controle irradiado não-tratado. Para LC observa-se efeito imunomodulador apenas para as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, onde observa-se aumento de 1,37 e 1,17 vezes em relação ao controle apenas irradiado. Quando avaliamos a resposta imunomoduladora de ARRLC, é possível perceber uma resposta dose-dependente, onde as doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, apresentaram respectivamente um aumento de aproximadamente 1,7, 1,55, 1,35 e 1,18 vezes superior ao controle irradiado não-tratado.

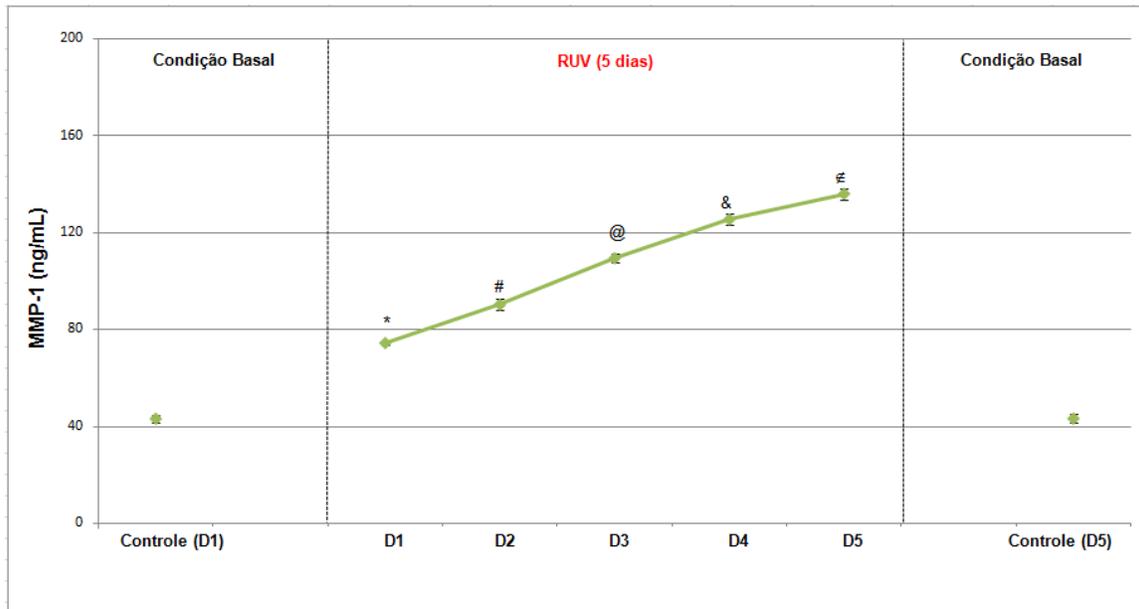
*4.1.5. Efeitos do extrato seco de Rhodiola rosea (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de matriz metaloproteinases (MMPs)*

MMPs são conhecidas por sua habilidade intrínseca de degradar a matriz extracelular, especialmente colágeno, elastina e glicosaminoglicanas. Com o aumento da atividade destas enzimas ocorre um desarranjo na estrutura dérmica, com conseqüente dano à junção dermo-epidérmica. Estes efeitos são comuns durante o processo de envelhecimento cutâneo, acelerados em parte pela foto-exposição. Por este motivo, buscamos avaliar nestes estudos, o perfil de resposta de fibroblastos da derme humana frente o impacto da RUVA/B de forma aguda e crônica.

*4.1.5.1. MMP-1 (Matriz Colagenase)*

*4.1.5.1.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar o perfil de atividade da enzima MMP-1 frente à exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de MMP-1.

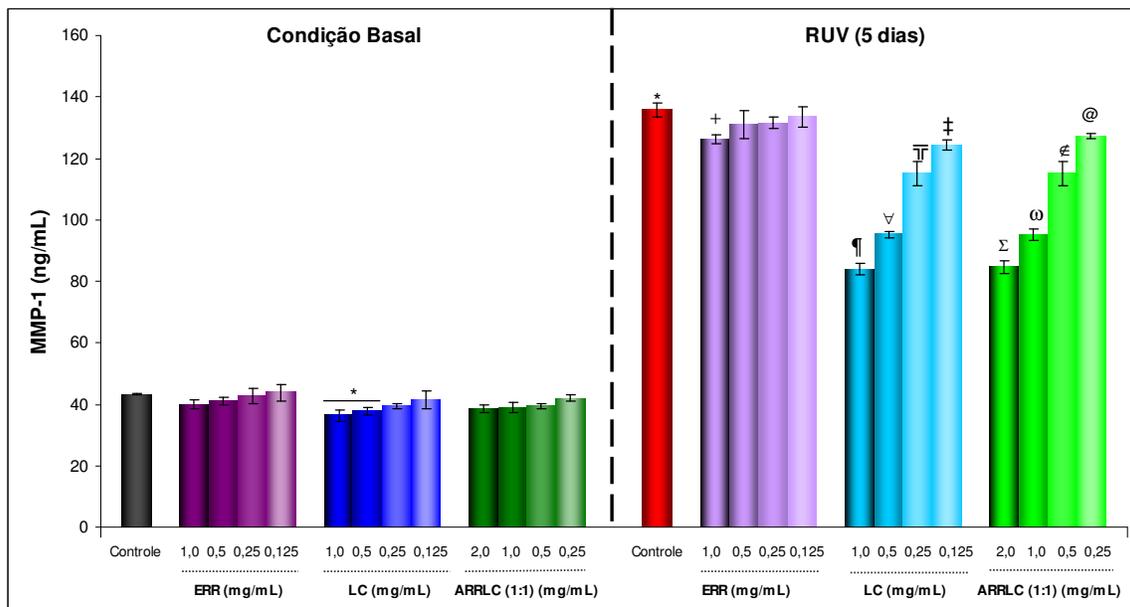


**Figura 33. Efeitos da radiação ultravioleta (RUV A/B) sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de MMP-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 33, a atividade de MMP-1 encontra-se significativamente aumentada já no 1º dia de exposição, apresentando valores aproximadamente 72,5% superiores aqueles obtidos para o grupo controle não-irradiado. Os valores obtidos no 2º dia de exposição indicam o aumento gradual que ocorre com a cronicidade da exposição, sendo 109,3% maiores que o grupo controle e 21,32% superiores aqueles obtidos em D1. Os níveis de MMP-1

demonstrados nos três dias subseqüentes de exposição à RUVA/B (D3, D4 e D5) continuam evidenciando um efeito estimulante gradual e tempo-dependente sobre a atividade de fibroblastos no que diz respeito à produção desta enzima de degradação. O maior aumento foi obtido em D5, sendo aproximadamente 3,15 vezes superior ao grupo controle não-irradiado. Este padrão de resposta ilustra os eventos predatórios causados por esta enzima em decorrência do fotoenvelhecimento.

4.1.5.1.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 34. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de MMP-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6).

\*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; †P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; ††P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; †††P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; ††††P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; †††††P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; ††††††P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; †††††††P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; ††††††††P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; †††††††††P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

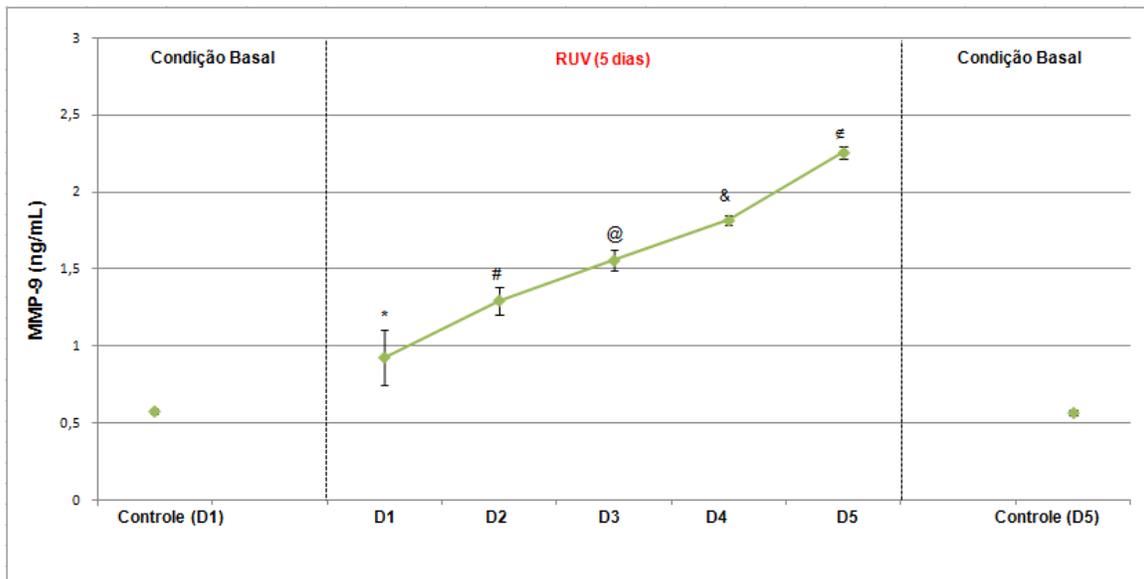
Podemos observar, de acordo com os resultados apresentados na figura 34, que ambos ERR e ARRLC, em todas as doses avaliadas, não apresentaram efeitos sobre a produção de MMP-1 em cultura de fibroblastos humanos não-expostos à RUVA/B. A resposta obtida nos grupos tratados com LC demonstram

um efeito discreto, porém significativo, para as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, o que evidencia um efeito do produto, mesmo em condição basal. A taxa média de redução para estas doses de LC foi de aproximadamente 16,7%, não havendo significância entre elas. Quando o parâmetro de observação passa a ser a condição de estresse solar, observamos para o grupo controle irradiado, um aumento na concentração de MMP-1 de aproximadamente 3,2 vezes em relação ao grupo controle em condição basal. Os grupos irradiados que receberam posterior tratamento com as diferentes doses de ERR não apresentaram efeitos tão evidentes sobre a redução da atividade de MMP-1, sendo que mesmo tendo apresentado significância em relação ao controle irradiado, a dose de 1,0 mg/mL de ERR reduziu em apenas 7% a produção desta enzima em relação ao controle apenas irradiado. Um perfil de resposta muito similar foi obtido para os grupos irradiados e tratados com LC e ARRLC, que não apresentaram significância entre si, quando levamos em consideração a mesma equivalência de doses. Para as maiores doses, ou seja, 1,0 mg/mL de LC e 2,0 mg/mL de ARRLC, houve uma redução aproximada de 38,3% e 37,8%, respectivamente, em relação ao grupo controle apenas irradiado. Foi observada uma atividade anti-metaloproteinase dose-dependente para LC e ARRLC, sendo que a menor dose apresentou uma redução de aproximadamente 9% e 7%, em relação ao grupo controle irradiado, respectivamente.

#### 4.1.5.2. MMP-9 (Matriz Gelatinase B)

##### 4.1.5.2.1. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar o perfil de atividade da enzima MMP-9 frente à exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de MMP-9.

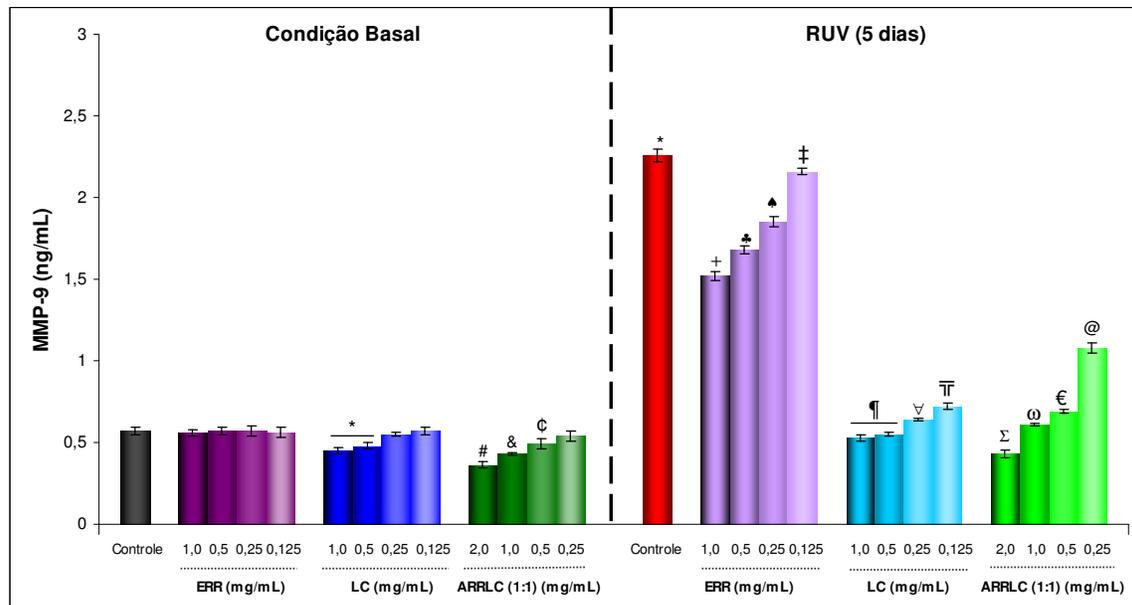


**Figura 35. Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de MMP-9 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular.** Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle

(D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3;  $\neq P < 0,001$ , em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 35, podemos observar que o perfil de resposta obtido para MMP-9 foi muito similar aquele obtido para a enzima MMP-1, onde já no 1º dia de exposição, ocorre um aumento significativo na sua atividade, apresentando valores aproximadamente 1,6 vezes superiores aqueles obtidos para o grupo controle não-irradiado. Os valores obtidos no 2º dia de exposição indicam o aumento gradual que ocorre com a cronicidade da exposição, sendo 2,25 vezes maiores que o grupo controle e 1,4 vezes superior aqueles obtidos em D1. Os níveis de MMP-1 demonstrados nos 3º, 4º e 5º dias de exposição à RUVA/B (D3, D4 e D5) continuam evidenciando um efeito estimulante gradual e tempo-dependente sobre a atividade de fibroblastos no que diz respeito à produção desta enzima de degradação. O maior aumento foi obtido em D5, sendo aproximadamente 3,9 vezes superior ao grupo controle não-irradiado e 1,24 vezes superior a D4. Este padrão de resposta ilustra os eventos degradantes causados pela MMP-9 durante a foto-exposição crônica.

4.1.5.2.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 36. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-9 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de MMP-9 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle, ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e #P<0,01, em relação ao ARRLC 1,0 mg/mL em condição basal; &#x2122;P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e &#x2124;P<0,01, em relação ao ARRLC 0,5 mg/mL em condição basal; &#x2125;P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 mg/mL em condição basal, &#x2126;P<0,01, em relação ao ERR 0,125 mg/mL em condição basal e &#x2127;P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal; +P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; \*P<0,001, em

relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>‡</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, contgrole/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC 2,0 mg/mL em condição basal e LC 1,0 mg/mL em condição basal; <sup>∇</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e <sup>∇</sup>P<0,01, em relação ao LC 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>⌘</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>Σ</sup>P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação ao ARRLC 2,0 e 0,25 mg/mL em condição basal e P<0,05, em relação ao ARRLC 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>ω</sup>P<0,001, em relação controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 2,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0 e 0,125 mg/mL, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, P<0,01, em relação ao ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal e P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal e LC/RUV 0,5 mg/mL; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>@</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

De acordo com os dados apresentados na figura 36 podemos observar, que diferente do perfil de resposta obtido para MMP-1, a associação ARRLC foi capaz de inibir a produção de MMP-9 mesmo em condição basal. As doses de 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL de ARRLC reduziram em aproximadamente 36%, 25% e 14%, respectivamente, a produção de MMP-9. Para os grupos tratados apenas com LC, podemos observar que houve uma redução significativa na atividade de MMP-9 apenas com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, que apresentaram uma redução aproximada de 21% e 15%, respectivamente. Com estes achados, é possível observar um efeito aditivo quando LC é associado a ERR, mesmo tendo este segundo, apresentado ausência de resposta em condição basal, quando administrado isoladamente. Quando o parâmetro de avaliação passa a ser a condição RUVA/B exposta, observamos para o grupo controle irradiado, um aumento na concentração de MMP-9 de aproximadamente 4 vezes em relação ao grupo controle em condição basal. Diferente do perfil de resposta obtido para MMP-1, no caso da MMP-9, os grupos irradiados que receberam ERR, apresentaram um efeito anti-MMP-9 importante e de forma dose-dependente. O grupo que recebeu 1,0 mg/mL de ERR após a irradiação apresentou uma redução de aproximadamente 32,7% em relação ao controle irradiado não-tratado. Para as doses de 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL de ERR, observamos uma redução respectiva de 25%, 18% e 5% em relação ao grupo apenas irradiado. Os grupos tratados LC, por sua vez, demonstraram uma redução mais acentuada na produção de MMP-9, sendo que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, que não apresentaram significância entre si, reduziram em aproximadamente 4

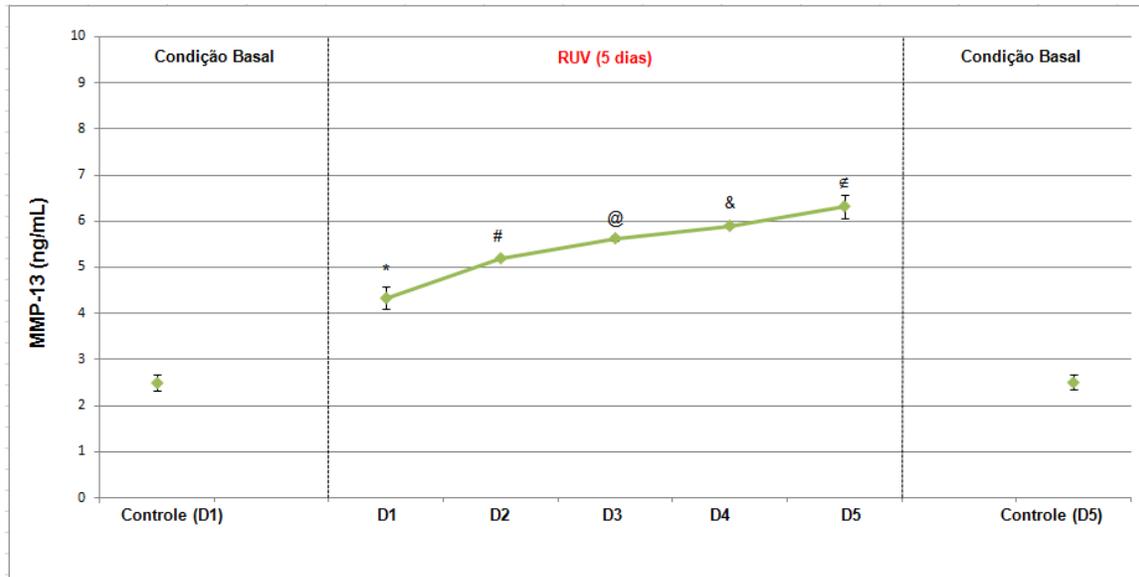
vezes a produção desta enzima quando comparamos ao grupo controle apenas irradiado. LC também apresentou efeito significativo para as doses de 0,25 e 0,125 mg/mL administrados às culturas após a irradiação, reduzindo a produção de MMP-9 em uma taxa próxima de 71% e 67%, respectivamente, em relação ao controle apenas irradiado. Os níveis de MMP-9 obtidos para os grupos que receberam ARRLC após a irradiação foram significativamente reduzidos, sendo que a dose de 2,0 mg/mL, revelou um efeito aditivo quando ERR e LC são administrados em associação, uma vez que reduziu em aproximadamente 5,25 vezes a produção de MMP-9. Esta redução foi 18% maior do que a redução promovida por LC na dose de 1,0 mg/mL e 72% superiores à redução promovida por ERR 1,0 mg/mL. As demais doses de ARRLC (1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL) promoveram, respectivamente, uma redução aproximada de 3,7, 3,2 e 2,1 vezes em relação ao grupo controle apenas irradiado.

#### 4.1.5.3. MMP-13 (Matriz Gelatinase 3)

##### *4.1.5.3.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Buscamos avaliar, neste experimento, o perfil de atividade da enzima MMP-13 frente à exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que

podéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de MMP-13.

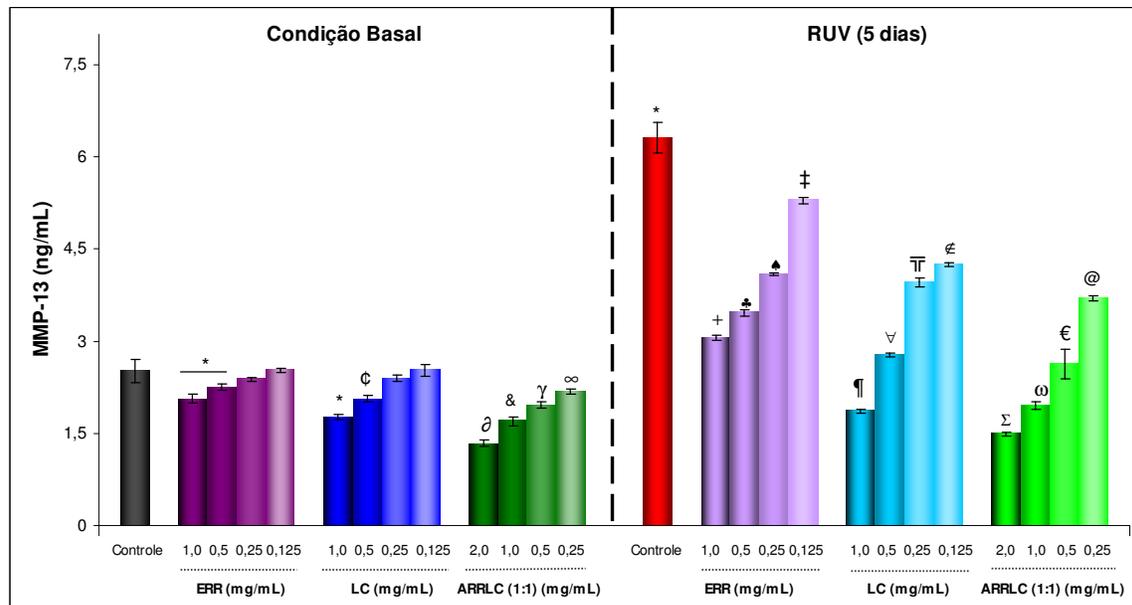


**Figura 37. Efeitos da radiação ultravioleta (RUV A/B) sobre a produção de MMP-13 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de MMP-13 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D1 e P<0,01, em relação ao RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, D2 e D3; &#x2013;P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e P<0,01, em relação ao RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 37, podemos observar que o perfil de resposta obtido para MMP-13 foi muito similar aquele obtido para as outras enzimas da família metaloproteinase avaliadas (MMP-9 e MMP-13). No primeiro dia de exposição, ocorre um aumento significativo na sua atividade,

apresentando valores aproximadamente 1,7 vezes superiores aqueles obtidos para o grupo controle não-irradiado. Os valores obtidos no 2º dia de exposição indicam o aumento gradual que ocorre com a cronicidade da exposição, sendo 2,1 vezes maiores que o grupo controle e 1,2 vezes superior aqueles obtidos em D1. Os níveis de MMP-13 demonstrados nos 3º, 4º e 5º dias de exposição à RUVA/B (D3, D4 e D5) continuaram elevando-se de forma gradual e tempo-dependente sobre a atividade de fibroblastos no que diz respeito à produção desta enzima de degradação. O maior aumento foi obtido em D5, sendo aproximadamente 2,5 vezes superior ao grupo controle não-irradiado e 1,1 vezes superior a D4. Da mesma forma ocorrida para as outras MMPs, o padrão de resposta obtido para MMP-13 demonstra os eventos deletérios conhecidos causados pelas enzimas MMPs durante a foto-exposição crônica.

4.1.5.3.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 38. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de MMP-13 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de MMP-13 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0 mg/mL em condição basal; ²P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; &P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e &P<0,01, em relação ao ARRLC 0,5 mg/mL em condição basal; ³P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ³P<0,05, em relação ao ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal; ∞P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 0,125 mg/mL em condição basal e ∞P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal

e ERR 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL; <sup>^</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>‡</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC 2,0 e 0,25 mg/mL em condição basal e LC 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>∇</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; <sup>⌘</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>²</sup>P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, <sup>²</sup>P<0,05, em relação ao ARRLC 1,0 mg/mL em condição basal; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 2,0 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, <sup>°</sup>P<0,01, em relação ao ARRLC 1,0 mg/mL em condição basal e <sup>°</sup>P<0,05, em relação ao ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, <sup>€</sup>P<0,01, em relação ao ERR 0,25 mg/mL em condição basal e <sup>€</sup>P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>@</sup>P<0,001, em

relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL,  $P < 0,01$ , em relação ao LC/RUV 0,5 mg/mL e ERR/RUV 0,5 mg/mL (ANOVA, Tukey).

De acordo com os dados apresentados na figura 38 podemos observar, que diferente do perfil de resposta obtido para MMP-1 e MMP-9, ERR foi capaz de inibir a produção de MMP-13 mesmo em condição basal. As doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR reduziram em média aproximadamente 1,15 vezes a produção de MMP-9, em relação ao controle em condição basal. Para os grupos em condição basal tratados apenas com LC, podemos observar que houve uma redução significativa na atividade de MMP-13 apenas com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, que apresentaram uma redução aproximada de 1,41 e 1,21, respectivamente. Os resultados obtidos para os grupos tratados com ARRLC em condição basal, demonstram um efeito aditivo da associação, uma vez que as avaliadas apresentaram efeito anti-MMP-13 significativo em relação ao controle em condição basal. Ao compararmos a mesma equivalência de doses, para a maior dose avaliada de cada composto, é possível concluir que ARRLC apresentou efeito inibidor de MMP-13 1,5 vezes maior que aquele apresentado para ERR e 1,32 vezes maior que o efeito apresentado por LC. Esta resposta obtida com ARRLC foi observada de forma dose-dependente, onde as reduções foram 1,87, 1,47, 1,28 e 1,15 vezes respectivamente para as doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL. Quando o parâmetro de resposta passa a ser a condição de exposição à RUVA/B, observamos para o grupo controle irradiado, um aumento

na concentração de MMP-13 de aproximadamente 2,5 vezes em relação ao grupo controle em condição basal. Os grupos irradiados tratados com ERR apresentaram redução significativa na produção de MMP-13, em relação ao grupo controle apenas irradiado, em todas as doses avaliadas e de forma dose-dependente. A dose de 1,0 mg/mL de ERR reduziu em aproximadamente 2,1 vezes a produção de MMP-13, enquanto as doses de 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL provocaram uma redução de aproximadamente 1,8, 1,5 e 1,2 vezes, respectivamente. Os efeitos anti-MMP-13 foram mais pronunciados nos grupos tratados com LC, os quais apresentaram, respectivamente para as doses de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, uma redução aproximada de 3,4, 2,25, 1,59 e 1,48 vezes em relação ao grupo controle apenas irradiado. Da mesma forma como observamos para a condição basal, ARRLC demonstrou que quando associados, ERR e LC apresentam efeitos potencializados, uma vez que para todas as doses avaliadas, observou-se um efeito superior para a equivalência de doses. A dose de 2,0 mg/mL de ARRLC reduziu em aproximadamente 4,23 vezes a produção de MMP-13, enquanto as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL provocaram uma redução de aproximadamente 3,2, 2,4 e 1,7 vezes, respectivamente.

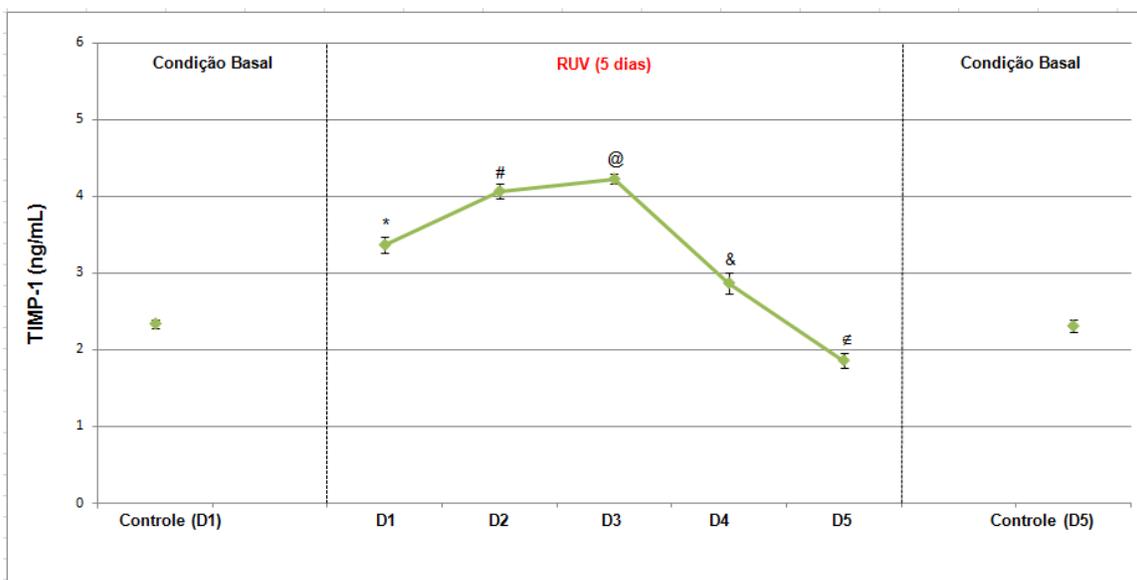
*4.1.6. Efeitos do extrato seco de Rhodiola rosea (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de inibidores de metaloproteinase tecidual (TIMPs) em cultura de fibroblastos humanos.*

De maneira similar às MMPs, os TIMPs são sintetizados por fibroblastos residentes na derme e atuam localmente, com a função específica de bloquear a atividade das MMPs, prevenindo desta forma a digestão da MEC. O equilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs regula a homeostase do tecido conectivo.

#### 4.1.6.1. TIMP-1

*4.1.6.1.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar a produção de TIMP-1 frente à exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de TIMP-1.

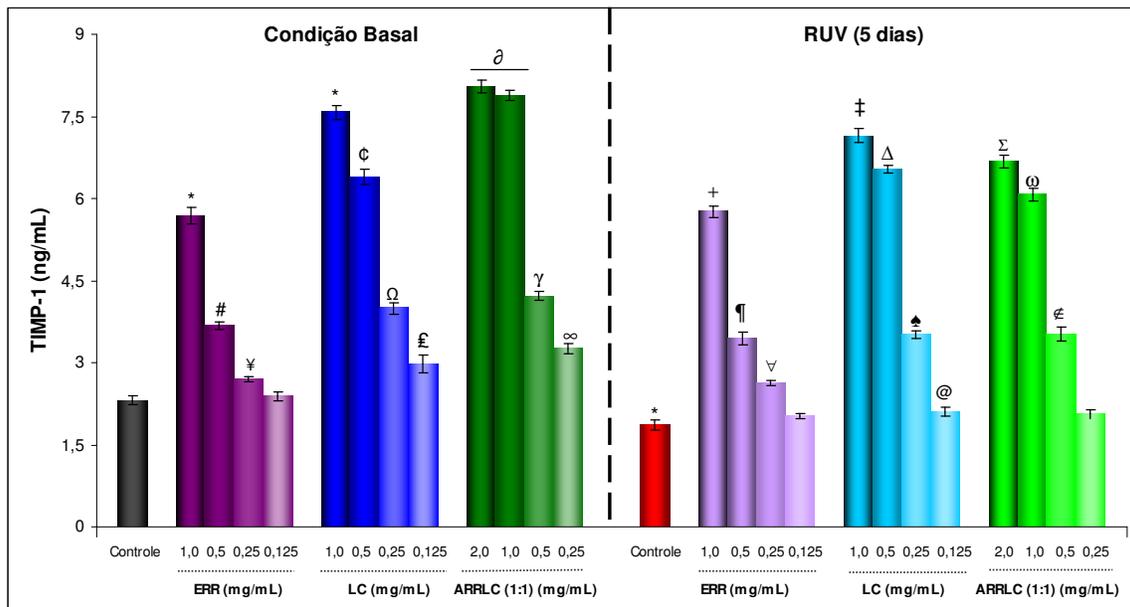


**Figura 39. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de TIMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de TIMP-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D1 e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, D2 e D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 39, a exposição à RUVA/B promove, a curto prazo, um aumento significativo na produção de TIMP-1 por fibroblastos humanos, nos três primeiros dias de exposição. Níveis máximos de TIMP-1 foram atingidos em D3, onde pudemos observar um aumento de cerca de 80% em relação ao controle não irradiado. O pico máximo atingido em D3 foi 1,25 vezes maior do que os valores atingidos em D1 e apenas 1,03 vez superior a D2, demonstrando que do 2º (D2) para o 3º (D3) dia de exposição não há

aumento significativo. Em D4, ainda há um aumento significativo em relação à condição basal, porém já indica uma queda importante em relação a D3 (32,15%). Ilustrando as conseqüências de uma exposição crônica à RUVA/B, os resultados obtidos em D5 indicam valores 25% menores quando comparados aqueles obtidos em condição basal. Estes achados indicam que ao longo de 5 dias, temos as conseqüências da exposição crônica à RUV, onde os níveis de TIMP-1 encontram-se consideravelmente reduzidos.

4.1.6.1.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 40. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de TIMP-1 em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de TIMP-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6).

\*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; ¥P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal; ¤P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e °P<0,05, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e °P<0,001, em relação ao LC 0,125 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,5 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL e °P<0,05, em relação ao ERR 0,125 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; °P<0,001, em relação ao ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL e °P<0,05, em relação ao controle/RUV; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5,

0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>§</sup>P<0,01, em relação ao LC 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>€</sup>P<0,01, em relação ao ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal (ANOVA, Tukey).

Para este experimento, as culturas celulares receberam ERR e LC nas concentrações 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, e ARRLC nas doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, ambos aplicados após cinco dias de exposição crônica das culturas à RUVA/B (RUV – 5 dias). Grupos não expostos (Condição Basal) também receberam tratamento com os compostos, a fim de avaliarmos os efeitos dos mesmos em condição basal. Além disso, para ambas as condições, um grupo controle foi utilizado para realização das análises comparativas.

De acordo com a figura 40, todos os grupos avaliados demonstraram efeito TIMP-1 estimulante mesmo em condição basal, ou seja, tanto ERR, quanto LC e ARRLC alteraram o perfil de resposta para TIMP-1, quando comparamos ao grupo controle nas mesmas condições. Dos grupos tratados com ERR, um importante efeito foi observado com as doses de 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, as quais induziram, respectivamente, um aumento de 2,45, 1,58 e 1,15 vezes, em relação ao grupo controle não-tratado. Para os grupos tratados com

LC, observamos um aumento significativo nas quatro doses avaliadas, com uma tendência à dose-dependência. Quando comparada ao controle em condição basal, a dose de 1,0 mg/mL promoveu um aumento de aproximadamente 3,3 vezes nos níveis de TIMP-1, enquanto que aumentos de 2,8, 1,7 e 1,3 vezes foram observados para as doses de 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, respectivamente. Ao avaliarmos os resultados obtidos para ARRLC, é possível observar um efeito aditivo quando ERR e LC são utilizados em associação. Estes resultados são evidenciados com as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC, as quais promoveram, respectivamente, um aumento de aproximadamente 3,5 e 3,4 vezes, quando comparados ao controle em condição basal. Após 5 dias de exposição, podemos observar os efeitos crônicos da radiação RUVA/B sobre os níveis de TIMP-1 em cultura de fibroblastos humanos, uma vez que o grupo controle irradiado apresentou uma redução aproximada de 1,25 vezes nos seus níveis basais. Quando levamos em consideração o perfil de resposta obtido com os grupos irradiados que receberam posterior tratamento com ERR, LC ou ARRLC, observa-se que os níveis deste mediador apresentam-se superiores aqueles obtidos para o grupo controle irradiado, especialmente com as três maiores doses de cada produto. ERR causou, com a dose de 1,0 mg/mL um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de TIMP-1 em relação ao controle irradiado, enquanto que as doses de 0,5 e 0,25 mg/mL induziram, respectivamente, um aumento aproximado de 1,8 e 1,4 vezes na produção de TIMP-1 em relação ao grupo controle nas mesmas condições. Quando o perfil de resposta obtido para os grupos tratados com LC é levado em consideração, é

possível observar um aumento de aproximadamente 3,8 e 3,5 vezes causados respectivamente pelas doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, enquanto que as doses de 0,25 e 0,125 mg/mL geraram, respectivamente, um produção 1,9 e 1,2 vez maior que àquela obtida para o grupo controle irradiado. Uma resposta similar foi obtida quando as células receberam tratamento com ARRLC. Quando tomamos como ponto de partida o valor alcançado para o grupo controle irradiado, podemos observar que a dose de 2,0 mg/mL de ARRLC induziu a produção de 3,6 vezes mais TIMP-1, enquanto as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL aumentaram, respectivamente, 3,3 e 2,0 vezes os níveis deste mediador. Cabe ressaltar que estes níveis foram superiores também aos níveis de TIMP-1 produzidos pelo grupo controle em condição basal.

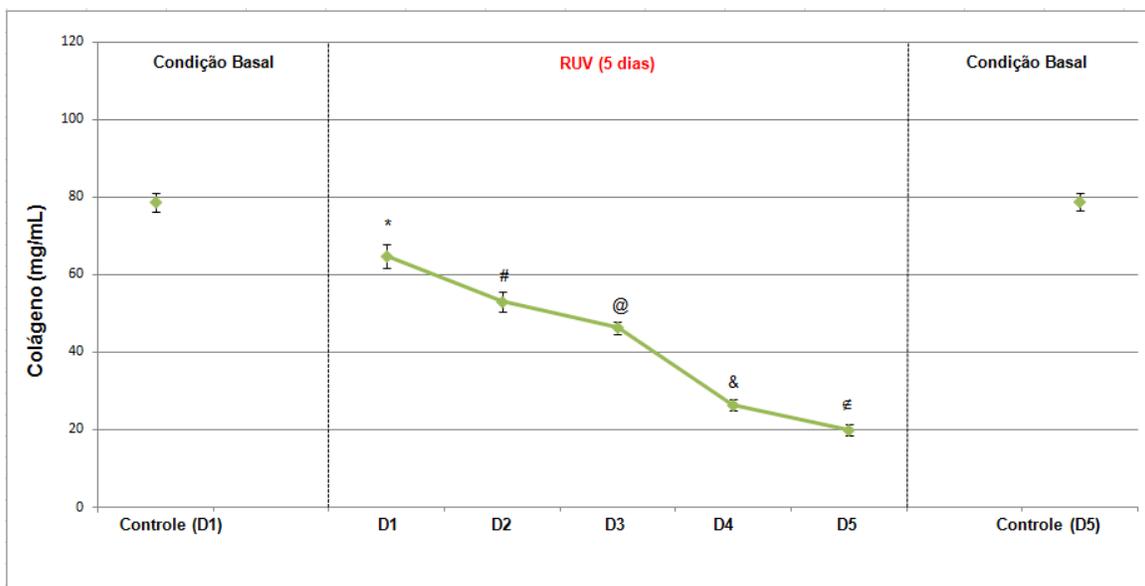
#### *4.1.7. Efeitos do extrato seco de Rhodiola rosea (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de colágeno e elastina*

Colágeno e elastina representam a maior porção protéica da derme e são responsáveis pela manutenção da firmeza e elasticidade da pele, respectivamente. Durante o envelhecimento, os níveis destas proteínas encontram-se reduzidos, como resultado da queda da atividade de fibroblastos, bem como da ação constante de espécies oxidativas.

##### 4.1.7.1. Colágeno total

###### *4.1.7.1.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

Neste experimento, buscamos avaliar o perfil de resposta celular relacionada à produção de colágeno após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de colágeno total.

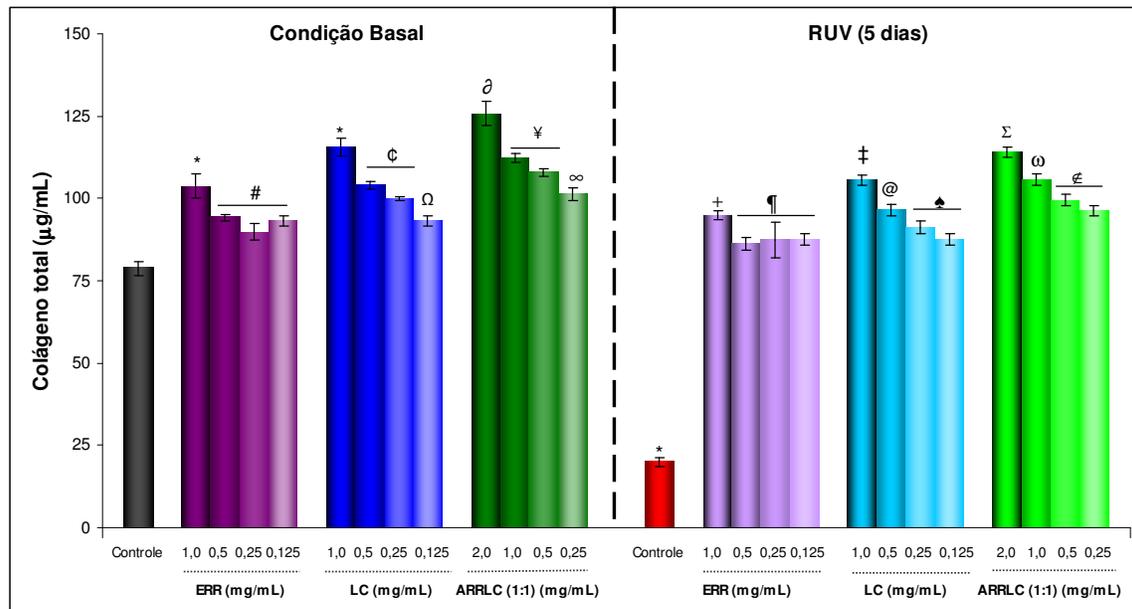


**Figura 41. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de Colágeno total em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de Colágeno total foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 41, podemos observar já no 1º dia (D1) de exposição à RUVA/B uma redução bastante significativa de aproximadamente 18% na produção de colágenos por fibroblastos de pele humana. Os valores obtidos no 2º dia de exposição indicam uma queda gradual nos níveis basais de colágenos com a cronicidade da exposição, sendo aproximados 32,5% menores que aqueles obtidos para o grupo controle não-irradiado, e 18% menores que aquele obtido em D1. Os níveis de colágenos

demonstrados nos 3º (D3), 4º (D4) e 5º (D5) dias de exposição à RUVA/B continuaram reduzindo-se de forma gradual e tempo-dependente a atividade de fibroblastos no que diz respeito à produção deste mediador. A maior redução foi obtida em D5, sendo aproximadamente 4 vezes inferior ao grupo controle não-irradiado.

4.1.7.1.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 42. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de Colágeno total em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de Colágeno total foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; #P<0,001, em relação ao controle em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal; °P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0 mg/mL em condição basal; ¶P<0,001, em

relação ao controle em condição basal e LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>y</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>∞</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, LC 1,0 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0 mg/mL em condição basal e P<0,05, em relação ao ERR 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, e 0,5 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL e P<0,01, em relação ao ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; em condição basal e <sup>¶</sup>P<0,05, em relação ao ERR 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>‡</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL em condição basal, LC 1,0 e 0,125 mg/mL em condição basal e P<0,01, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>@</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL em condição basal, LC 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; <sup>\*†</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>‡</sup>P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 2,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>‡</sup>P<0,01, em relação ao ARRLC 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>o</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0 e 1,0 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>o</sup>P<0,01, em relação ao LC 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, LC 1,0 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e

ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e  $P < 0,01$ , em relação ao ERR 0,5 mg/mL em condição basal (ANOVA, Tukey).

Conforme podemos observar na figura 42, os grupos tratados com ERR apresentaram, já em condição basal, um aumento significativo nos níveis de colágenos, alcançando concentração até 32% superiores ao controle para a dose de 1 mg/mL. As demais doses (0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL) de ERR também induziram uma maior produção de colágenos quando comparada ao grupo controle não-tratado, porém não foram significativas entre si, gerando um aumento aproximado de até 20% em relação ao grupo controle. Os grupos que receberam LC também apresentaram aumento considerável nos níveis de colágenos quando comparados ao controle em condição basal. Neste caso houve um aumento de aproximadamente 47% para a dose de 1,0 mg/mL, enquanto que as doses de 0,5 e 0,25 mg/mL, não significativas entre si, induziram um aumento de aproximadamente 32% e 28% nos níveis basais deste mediador. Já a dose de 0,125 mg/mL de LC promoveu um aumento de apenas 18% na produção de colágeno quando comparado ao grupo controle em condição basal. Para os grupos que receberam ARRLC, podemos observar que um efeito aditivo foi atingido para todas as doses avaliadas em condição basais, uma vez que induziram um aumento de aproximadamente 59%, 42,5%, 37% e 28% respectivamente para as doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL. Cabe ressaltar que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ARRLC não apresentaram significância estatística entre si. Avaliando o perfil apenas das doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC, que equivalem a 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR ou LC

isoladamente, podemos observar claramente um efeito aditivo quando os compostos são aplicados concomitantemente, evidenciando a importância da associação.

Quando avaliamos o perfil de resposta obtido em condição de estresse (RUVA/B), observamos que o perfil de resposta obtido para cada composto em condição basal foi mantido proporcionalmente. Os grupos tratados com ERR causaram um aumento significativo nos níveis de colágenos quando comparados ao grupo controle irradiado. Estes achados também demonstraram significância mesmo quando comparamos ao grupo controle em condição basal, demonstrando que mesmo em condição de estresse crônico, o composto apresenta atividade estimuladora da síntese deste componente da MEC. Os resultados demonstram que mediante estresse solar a maior dose de ERR (1 mg/mL), promoveu um aumento de aproximadamente 4,75 vezes em relação ao respectivo grupo controle. Quando comparamos o grupo irradiado e tratado com esta mesma dose, ao controle não-irradiado (condição basal), podemos observar que o aumento foi de aproximadamente 1,25 vezes. As doses de 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL de ERR não apresentaram perfil diferente de resposta, e pudemos verificar um aumento importante, especialmente quando comparamos ao respectivo grupo controle irradiado, alcançando um índice de aumento de aproximadamente 4 vezes nos níveis desta proteína. Os grupos que receberam LC após a irradiação também apresentaram aumento considerável nos níveis de colágenos quando comparados ao controle irradiado. Neste caso houve um aumento de aproximadamente 5,3 vezes para a dose de 1,0 mg/mL, enquanto

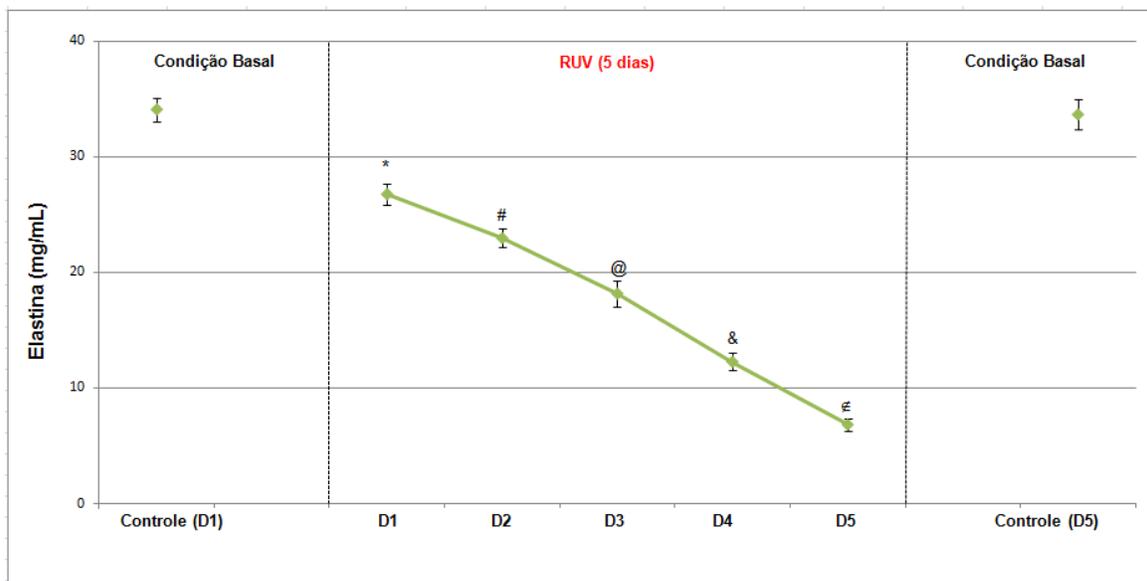
que a dose de 0,5 mg/mL induziu um aumento de aproximadamente 4,8 vezes nos níveis basais de colágenos. Já a dose de 0,25 e 0,125 mg/mL de LC, não significativas entre si, promoveram um aumento de aproximadamente 4,5 e 4,4 vezes na produção de colágeno quando comparado ao grupo controle irradiado, respectivamente. Para os grupos que receberam ARRLC, podemos observar que um efeito aditivo foi atingido para todas as doses avaliadas em condição de estresse, uma vez que induziram um aumento de aproximadamente 5,7, 5,3, 5,0 e 4,8 vezes, respectivamente para as doses de 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL. Cabe ressaltar que as doses de 0,5 e 0,25 mg/mL de ARRLC não apresentaram significância estatística entre si. Avaliando o perfil apenas das doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC, que equivalem a 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR ou LC isoladamente, por exemplo, podemos observar claramente um efeito aditivo quando os compostos são aplicados concomitantemente, evidenciando a importância desta associação.

Estes resultados obtidos para a associação ARRLC nos grupos irradiados também foram considerados significativos quando comparamos ao grupo controle em condição basal, demonstrando que mesmo frente ao estresse, o composto apresenta importantes efeitos estimulantes sobre a síntese de colágenos, componentes mais abundantes da MEC.

#### 4.1.7.2. Elastina

*4.1.7.2.1. Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, sem tratamento com ERR, LC e ARRLC*

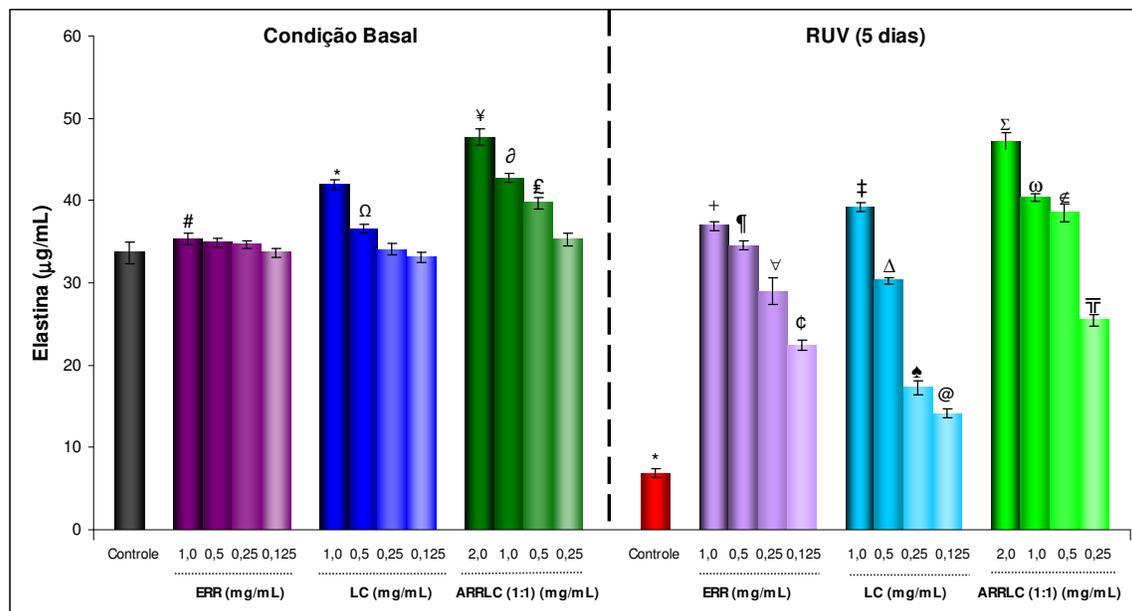
Neste experimento, buscamos avaliar o perfil de resposta de fibroblastos relacionada à produção de elastina após exposição aguda (D1) e crônica (D5) à RUVA/B. Foram consideradas como padrão para controle dos níveis enzimáticos basais, medidas obtidas em D1 e D5 na ausência de estresse solar, definidos como grupo controle (D1) e controle (D5). Este parâmetro serviu de base para que pudéssemos avaliar que ao longo dos 5 dias, não há diferença significativa nos níveis basais de elastina.



**Figura 43. Efeitos da radiação ultravioleta (RUVA/B) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) durante 5 dias consecutivos e a concentração de elastina foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). \*P<0,001, em relação ao controle (D1) e controle (D5); #P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5) e RUV D1; @P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), e RUV D2; &P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2 e RUV D3; ¶P<0,001, em relação ao controle (D1), controle (D5), RUV D1, RUV D2, RUV D3 e RUV D4 (ANOVA, Tukey).

Conforme demonstrado na figura 43, podemos observar uma redução significativa na produção logo 1º dia (D1) de exposição à RUVA/B, onde houve uma queda de aproximadamente 21,5% em relação ao controle. No 2º dia de exposição podemos observar uma queda gradual nos níveis basais de elastina com a cronicidade da exposição, sendo aproximados 32% menores que aquele obtido para o grupo controle não-irradiado, e 15% menores que aquele obtido em D1. Os níveis de elastina continuaram em queda com a cronicidade da exposição, sendo encontrados nos 3º (D3), 4º (D4) e 5º (D5) uma redução gradual e tempo-dependente na produção deste mediador. Em D3, D4 e D5 pudemos observar uma redução, em relação ao controle não-irradiado, de aproximadamente 46%, 64% e 80%, respectivamente.

4.1.7.2.2. *Condição Basal e frente à Radiação Ultravioleta A e B (RUVA/B) por 5 dias consecutivos, com posterior tratamento com ERR, LC e ARRLC*



**Figura 44. Efeitos do extrato seco de *Rhodiola rosea* (ERR), do di-peptídeo L-carnosina (LC) e da associação de ambos (ARRLC) sobre a produção de elastina em cultura de fibroblastos humanos.** Fibroblastos humanos foram incubados com as amostras-teste em condição basal e mediante RUV (UVA/UVB 100 mJ/cm<sup>2</sup>) e a concentração de elastina total foi mensurada no sobrenadante da cultura celular. Os dados representam a média ± desvio padrão obtidos de 2 experimentos independentes (n=6). #P<0,01, em relação ao controle; \*P<0,001, em relação ao controle em condição basal; <sup>Ω</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e LC 1,0 mg/mL em condição basal; <sup>¥</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>²</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>£</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, ARRLC 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>+</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal, ERR 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, <sup>+</sup>P<0,01, em relação ao ERR 0,5 mg/mL em condição basal e <sup>+</sup>P<0,05, em relação ao ERR 0,25 mg/mL em condição basal; <sup>¶</sup>P<0,001, em relação ao controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 mg/mL; <sup>∇</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>°</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>‡</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal e LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal; <sup>^</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 mg/mL; <sup>\*</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e LC/RUV 1,0 e 0,5 mg/mL; <sup>@</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição

basal e LC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL; <sup>Σ</sup>P<0,001, em relação ao controle, controle/RUV, ARRLC 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL; <sup>º</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal e controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, ERR/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>º</sup>P<0,01, em relação ao ARRLC/RUV 0,5 mg/mL; <sup>€</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0 e 0,25 mg/mL em condição basal, ARRLC/RUV 0,25 mg/mL, LC 1,0, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL e <sup>€</sup>P<0,01, em relação ao LC 0,5 mg/mL em condição basal; <sup>ƒ</sup>P<0,001, em relação ao controle em condição basal, controle/RUV, ARRLC 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/mL em condição basal, LC 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal, LC/RUV 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL, ERR 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL em condição basal e ERR/RUV 1,0, 0,5 e 0,125 mg/mL (ANOVA, Tukey).

De acordo com os resultados apresentados na figura 44, já em condição basal, ERR promoveu nos grupos tratados com 1,0 mg/mL, um aumento discreto (5%), porém significativo, nos níveis de elastina em relação ao controle. Para a LC, uma resposta positiva foi alcançada com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL, as quais apresentaram, respectivamente, um aumento aproximado de 24,5% e 8,5% em relação ao controle em condição basal. Os grupos que receberam ARRLC, no entanto, apresentaram uma resposta ainda mais significativa, onde as doses de 2,0, 1,0 e 0,5 mg/mL induziram um aumento de 41,75%, 27% e 18%, respectivamente, em relação ao controle em condição basal. Estes

achados demonstram uma potencialização dos efeitos de ERR e LC quando são utilizados em associação, representada pelo uso de ARRLC.

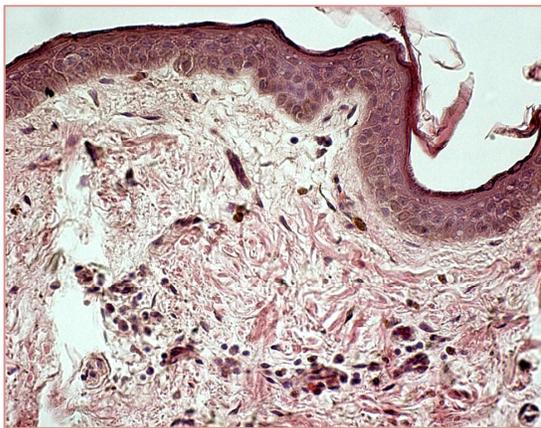
Em condição de estresse induzido pela RUVA/B, observamos um papel importante, de todos os compostos, sobre a manutenção dos níveis de elastina, especialmente quando levamos em consideração os novéis basais obtidos para o controle não-irradiado. Somente com a irradiação, resultado este representado pelo grupo controle irradiado não-tratado, podemos observar uma queda bastante significativa na produção de elastina, onde foram alcançados níveis quase 5 vezes menores. Os grupos que receberam posterior tratamento com ERR, apresentaram em todas as doses avaliadas um resultado significativo sobre a produção de elastina em relação ao controle irradiado. Os aumentos foram de aproximadamente 5,4, 5, 4,2 e 3,2 vezes, respectivamente, para as doses de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL. Os níveis de elastina alcançados após o tratamento das culturas irradiadas com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR foram similares aqueles encontrados para o controle em condição basal, indicando um importante efeito estimulante da síntese desta proteína dérmica pelo ERR, mesmo em condição de estresse. Os grupos que recebem LC após a irradiação também apresentaram uma importante resposta, para todas as doses avaliadas, sendo que os grupos que receberam 1,0 e 0,5 mg/mL, induziram um maior aumento, atingindo níveis 5,7 e 4,4 vezes maiores que o controle irradiado, respectivamente. Os grupos que receberam 0,25 e 0,125 mg/mL de LC, apresentaram, respectivamente, um aumento aproximado de 2,5 e 2,05 vezes em relação controle irradiado. No perfil de resposta obtido para os grupos

tratados com ARRLC, podemos evidenciar um efeito aditivo, uma vez que as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL apresentaram, respectivamente, um aumento de aproximadamente 6,9 e 6 vezes nos níveis de elastina, em relação ao controle irradiado. Estes valores são superiores aqueles alcançados para as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR ou LC, que correspondem às doses de 2,0 e 1,0 mg/mL da associação de ambos (ARRLC). A dose de 0,5 mg/mL de ARRLC promoveu uma produção de elastina quase 5,6 vezes maior que aquela apresentada para o grupo controle irradiado. Também para a dose de 0,25 mg/mL de ARRLC pudemos observar um efeito positivo, a qual induziu um aumento de aproximadamente 3,7 vezes nos níveis de elastina quando comparada ao grupo controle. Cabe ressaltar que as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC promoveram níveis de elastina superiores aqueles encontrados para o controle em condição basal, demonstrando que mesmo em condições de estresse crônico a associação promove uma maior produção deste componente da MEC.

## 4.2. Resultados da Avaliação Histológica

4.2.1. *Efeitos da associação entre o extrato de Rhodiola rosea e do dipeptídeo L-carnosina (ARRLC) em fragmentos de pele humana em condição basal e mediante exposição à RUVA/B*

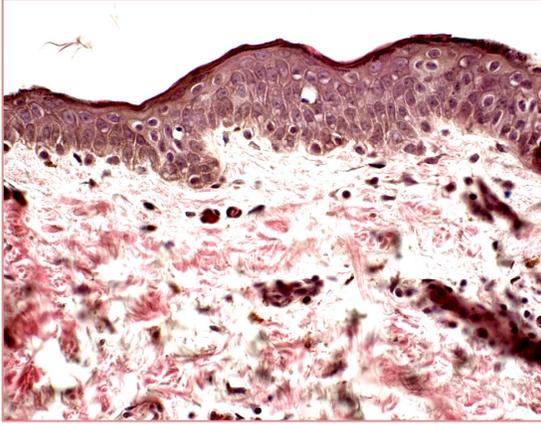
A coloração dos fragmentos de pele humana com HE (hematoxilina-eosina) consiste em uma técnica amplamente utilizada em histologia e dermatopatologia pois permite a visualização das principais estruturas celulares, possibilitando a análise morfológica visual qualitativa. Neste experimento, avaliamos os efeitos de ARRLC (2 mg/mL) aplicados sobre os fragmentos de pele em condição basal e após exposição à RUVA/B, ambos em comparação com os respectivos controles (controle em condição basal e controle irradiado).



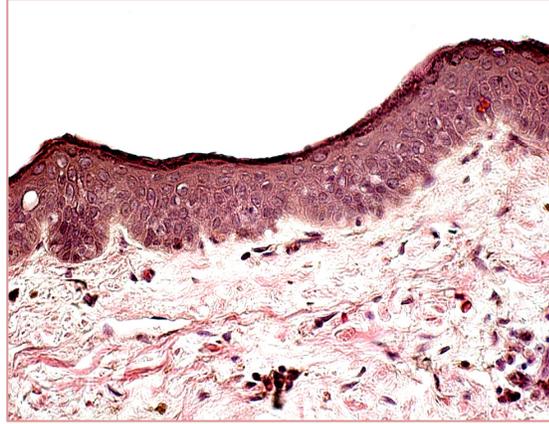
**Figura 45a.** Controle Basal



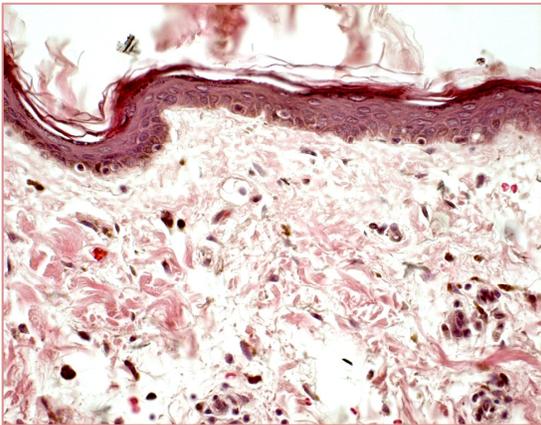
**Figura 45b.** Controle Basal



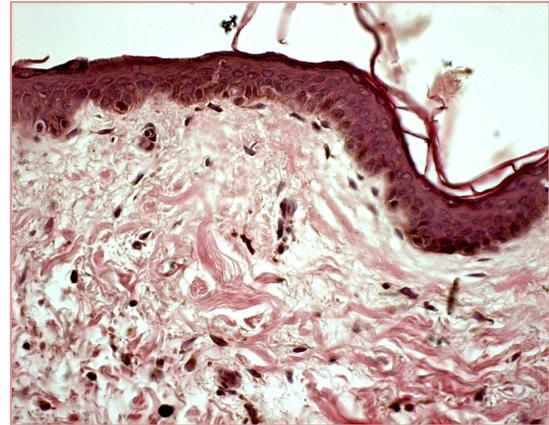
**Figura 46a.** ARRLC 2 mg/mL



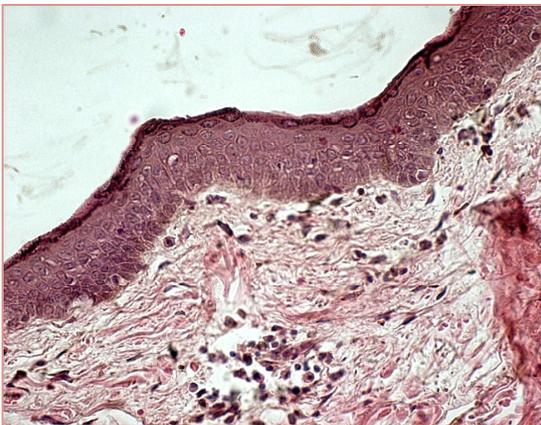
**Figura 46b.** ARRLC 2 mg/mL



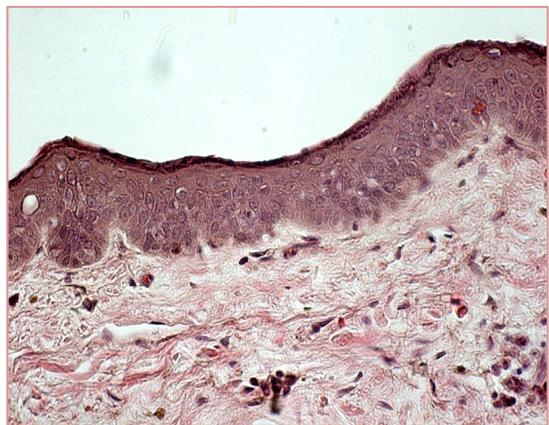
**Figura 47a.** RUVA/B 100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia,  
3 dias consecutivos.



**Figura 47b.** RUVA/B 100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia,  
3 dias consecutivos.



**Figura 48a.** RUVA/B 100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia,  
3 dias consecutivos + ARRLC 2  
mg/mL.



**Figura 48b.** RUVA/B 100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia,  
3 dias consecutivos + ARRLC 2  
mg/mL.

Ao avaliarmos a resposta da pele após aplicação de ARRLC em condição basal, ou seja, sem exposição à RUVA/B, é possível notar que houve uma melhora visualmente significativa no aspecto geral da pele, caracterizado principalmente pelo aumento da espessura da epiderme, pelo aumento do número de queratinócitos nucleados na camada basal, bem como pela compactação da camada córnea, aparentemente descompactada nas ilustrações que representam a condição basal. Após a exposição dos fragmentos de pele à RUVA/B ( $100\text{mJ}/\text{cm}^2/\text{dia}$ ), por três dias consecutivos, percebe-se um aspecto visual significativamente danificado, representado pela redução do número de camadas na epiderme, redução do número de queratinócitos viáveis, bem como por maior descompactação do estrato córneo. Após tratamento dos fragmentos com ARRLC ( $2,0\text{ mg/mL}$ ), ocorre uma restauração do aspecto geral da pele, com aumento no número de camadas e queratinócitos viáveis, bem como uma menor perda de compactação do estrato córneo.

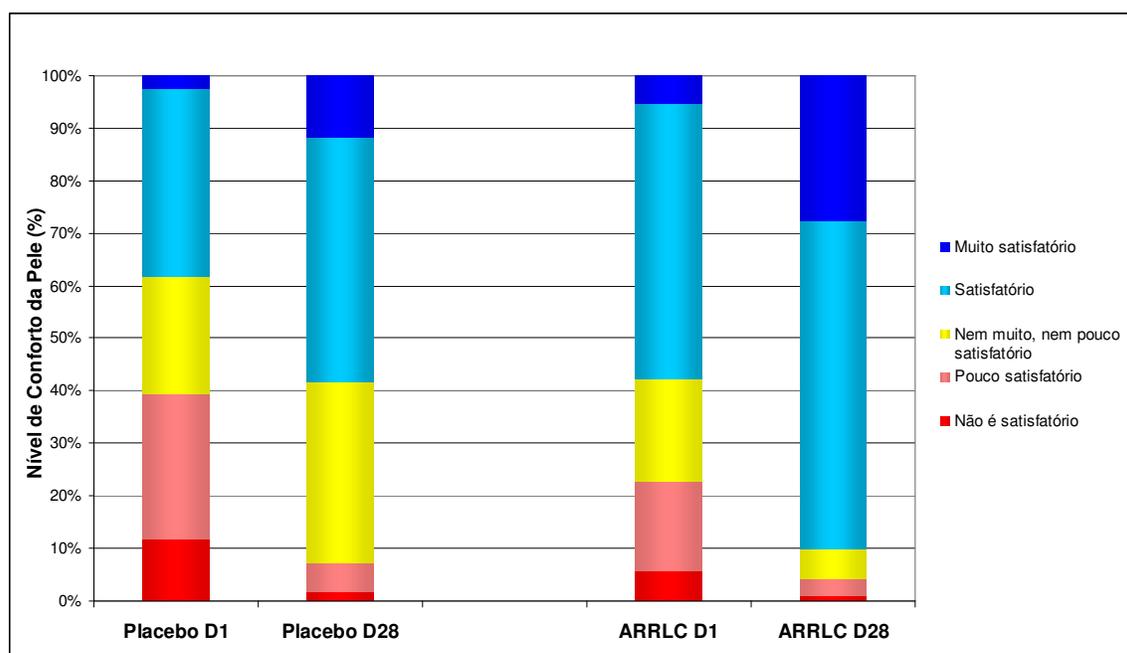
### 4.3. Resultados da Avaliação Clínica

4.3.1. Eficácia Subjetiva – Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% (p/p) da associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC)

#### 4.3.1.1. Nível de Conforto da Pele

Produto	Tempo	Respostas – Nível de Conforto				
		Não é satisfatório	Pouco satisfatório	Nem muito, nem pouco satisfatório	Satisfatório	Muito satisfatório
		prob	prob	prob	prob	Prob
Placebo	D1	11,70	27,66	22,51	35,60	2,53
Placebo	D28	1,56	5,64	34,04	45,93	11,83
ARRLC	D1	5,62	16,99	19,58	52,38	5,43
ARRLC	D28	0,89	3,31	5,67	62,37	27,76

Tabela 11. Porcentagens estimadas de respostas por produto e tempo.

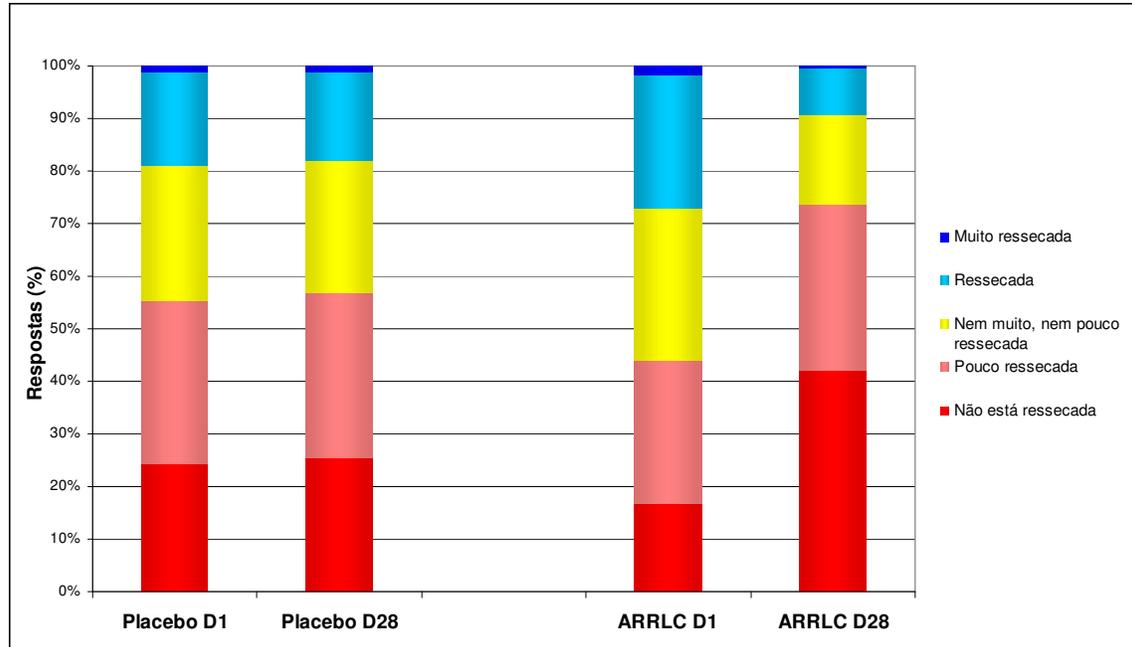


**Figura 49. Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo, sob condições normais de uso – Teste em uso sobre controle clínico.** Cento e vinte e quatro voluntários utilizaram um produto contendo 1% de ARRLC durante 28 dias. Um questionário referente ao nível de conforto da pele foi respondido pelas voluntárias em D1 e D28. As comparações foram realizadas através de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972). Para considerar-se a medida repetida, empregou-se o método GEE (Generalized Estimating Equations, Liang e Zeger, 1986). A distribuição postulada para as respostas foi multinomial e as observações foram feitas em categorias. A função de ligação é o logito acumulado. Estimaram-se as proporções de respostas em cada categoria, por produto e tempo. Pode-se avaliar eventuais mudanças na distribuição das respostas no tempo por produto. Os cálculos foram feitos com o sistema SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), sob sistema operacional Linux (Mandriva). Não houve efeito da interação de tratamento por tempo ( $p=0,59$ ), isto é, os tratamentos apresentam o mesmo comportamento ao longo do tempo. Houve evidência de efeito de tratamento ( $p=0,02$ ), ou seja, houve evidência de diferença entre as distribuições dos níveis de resposta quando foram considerados os diferentes tratamentos. Houve evidência de efeito de tempo, ( $p<0,0001$ ), isto é, há evidência de diferença entre as distribuições dos níveis de respostas quando são considerados os diferentes tempos.

#### 4.3.1.2. Nível de Ressecamento da Pele

Produto	Tempo	Respostas – Ressecamento				
		Não está ressecada	Pouco ressecada	Nem muito, nem pouco ressecada	Ressecada	Muito ressecada
		prob	prob	prob	prob	Prob
Placebo	D1	24,28	31,06	25,57	17,86	1,22
Placebo	D28	25,39	31,42	25,01	17,04	1,15
ARRLC	D1	16,85	27,07	28,89	25,26	1,92
ARRLC	D28	42,2	31,63	16,78	8,85	0,54

**Tabela 12.** Porcentagens estimadas de respostas por produto e tempo.



**Figura 50. Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo, sob condições normais de uso – Teste em uso sobre controle clínico.** Cento e vinte e quatro voluntários utilizaram um produto contendo 1% de ARRLC durante 28 dias. Um questionário referente ao nível de ressecamento da pele foi respondido pelas voluntárias em D1 e D28. As comparações foram realizadas através de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972). Para considerar-se a medida repetida, empregou-se o método GEE (Generalized Estimating Equations, Liang e Zeger, 1986). A distribuição postulada para as respostas foi multinomial e as observações foram feitas em categorias. A função de ligação é o logito acumulado. Estimaram-se as proporções de respostas em cada categoria, por produto e tempo. Pode-se avaliar eventuais mudanças na distribuição das respostas no tempo por produto. Os cálculos foram feitos com o sistema SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), sob sistema operacional Linux (Mandriva). Houve efeito da interação de tratamento por tempo ( $p=0,002$ ), isto é, os tratamentos não apresentam o mesmo comportamento ao longo do tempo. Desta maneira, o efeito de tempo foi avaliado para cada produto separadamente. A seguir estão apresentados os contrastes de interesse com níveis de significância corrigidos:

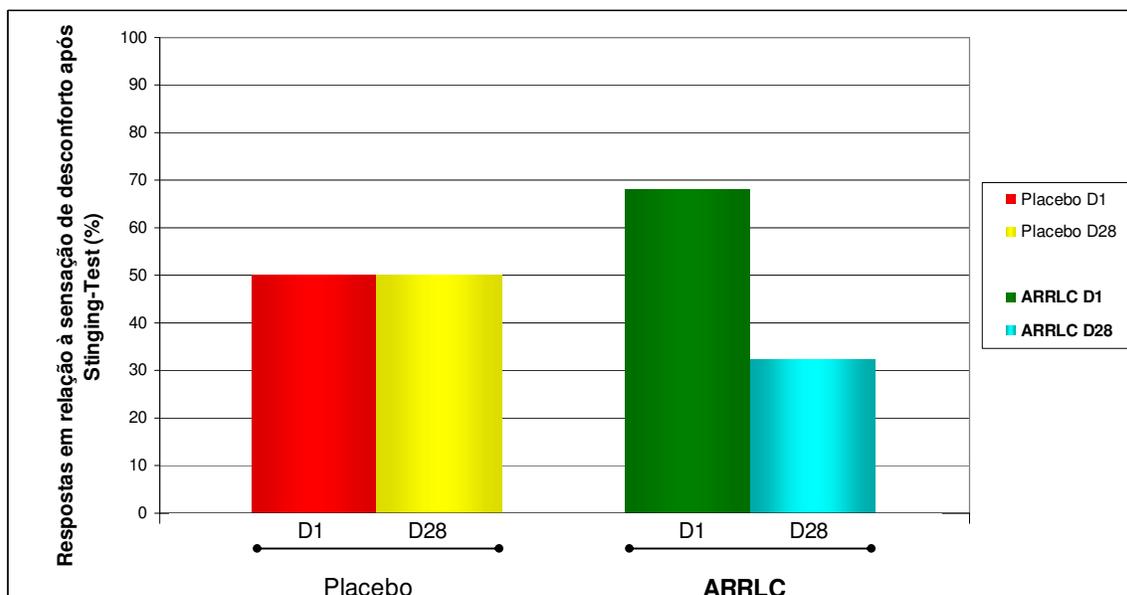
Contrastes	Nível de significância corrigido
ARRLC D1 X ARRLC D28	0,00012
Placebo D1 X Placebo D28	0,82135
ARRLC D1 X Placebo D1	0,19167
ARRLC D28 X Placebo D28	0,05339

**Tabela 13.** Contrastes entre placebo e ARRLC.

#### 4.3.1.3. Nível de Desconforto após Stinging-Test

Produto	Respostas	
	D1	D28
	prob	prob
<b>ARRLC</b>	67.74	32.26
<b>Placebo</b>	50.00	50.00

**Tabela 14.** Porcetagens estimadas de respostas por produto.



**Figura 51.** Avaliação sensorial da apreciabilidade dermocosmética de uma formulação contendo 1% da associação entre *Rhodiola rosea* e o di-peptídeo L-carnosina (ARRLC), em comparação com o placebo após *Stinging-Test*. Após 15 minutos de sauna (vaporizador na face), 2mL de uma solução de ácido láctico são

aplicados em um dos lados da região nasogeniana. Do outro lado é aplicada a mesma quantidade de uma solução de 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). O pinicamento foi avaliado pelas voluntárias, 2 e 5 minutos após a aplicação das soluções. As avaliações foram feitas 2 e 5 minutos após a aplicação de acordo com a opinião da voluntária em relação às sensações nos locais de aplicação das soluções. As comparações foram realizadas através de modelos lineares generalizados (Nelder e Wedderburn, 1972). Para considerar-se a medida repetida, empregou-se o método GEE (Generalized Estimating Equations, Liang e Zeger, 1986). A distribuição postulada para as respostas foi multinomial e as observações foram feitas em categorias. A função de ligação é o logito acumulado. Estimaram-se as proporções de respostas em cada categoria, por produto e tempo. Pode-se avaliar eventuais mudanças na distribuição das respostas no tempo por produto. Os cálculos foram feitos com o sistema SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), sob sistema operacional Linux (Mandriva). O teste para efeito de tratamento forneceu valor de p igual a 0,0447. A seguir estão apresentados os contrastes de interesse com níveis de significância corrigidos.

De acordo com os resultados obtidos nos estudos clínicos subjetivos, conforme ilustrado nos gráficos acima, é possível perceber que a emulsão contendo 1% de ARRLC apresentou resultados positivos em relação aos parâmetros melhora da sensação de conforto e do nível de ressecamento da pele após 28 dias de aplicação, quando comparamos com a percepção das voluntárias em relação à formulação placebo. Considerando como parâmetros de melhora as respostas obtidas como “muito satisfatório” e “satisfatório”, podemos observar que para o parâmetro melhora da sensação de conforto da pele, a emulsão placebo apresentou uma significativa melhora que variou de aproximadamente 38% de satisfação em D1 para 55% em D28. A formulação contendo 1% de ARRLC, por sua vez, apresentou uma melhora ainda mais significativa, que variou de aproximadamente 58% em D1 para 90% em D28.

Quando comparamos as respostas obtidas para a emulsão placebo e para aquela contendo 1% de ARRLC, pode-se observar uma melhora significativa no nível de conforto já no primeiro dia de aplicação (D1) (placebo 38% vs. ARRLC 58%), sendo esta melhora ainda mais evidente em D28 (placebo 58% vs. ARRLC 90%). Para o parâmetro nível de ressecamento, consideramos como melhora as respostas “pouco ressecada” e “não está ressecada”. Neste caso, observamos que o placebo não apresentou melhora subjetiva ao decorrer dos 28 dias de aplicação, uma vez que a melhora continuou em torno de 55%. A emulsão contendo ARRLC 1%, por sua vez, apresentou melhora ao longo do tempo, passando de aproximadamente 45% para 72%. Ao avaliarmos as respostas comparando a emulsão placebo com aquela contendo 1% de ARRLC, percebe-se que em D1 não há diferença significativa de melhora (placebo 55% vs. ARRLC 45%), porém há uma diferença consideravelmente significativa em D28 (placebo 55% vs. ARRLC 72%).

A avaliação subjetiva referente ao nível de desconforto após Stinging-Test demonstra que a emulsão placebo não apresenta uma melhora após 28 dias de aplicação, uma vez que a percepção das voluntárias foi a mesma em D1 e D28 (aproximadamente 50%). Para a emulsão contendo 1% de ARRLC, por sua vez, podemos observar que houve uma mudança de percepção quanto à sensação de desconforto após 28 dias, uma vez que aproximadamente 70% das voluntárias reportaram um menor nível de desconforto em D28.

*4.3.2. Eficácia Instrumental – Avaliação instrumental (objetiva) dos efeitos de uma formulação contendo 1% (p/p) da associação entre o extrato de Rhodiola rosea e do di-peptídeo L-carnosina (ARRLC) sobre a redução da perda de água transepidermica e sobre a melhora do relevo cutâneo (redução de rugas finas)*

4.3.2.1. Avaliação Instrumental da Perda de Água Transepidermica

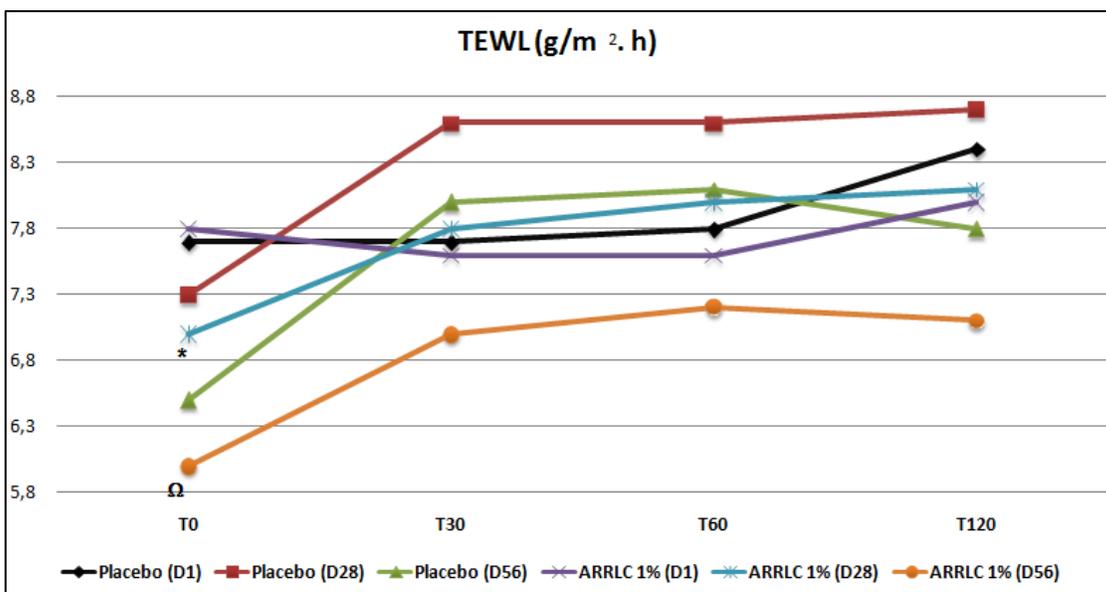
(TEWL)

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente a perda de água transepidermica de duas formulações de uso tópico – formulação contendo ARRLC 1% (p/p) *versus* Placebo. Este tipo de estudo possibilita verificar a capacidade do produto em restaurar ou reparar a barreira cutânea.

As medidas de perda de água transepidermica foram tomadas nas seguintes ocasiões: no 1º, 28º e 56º dia de estudo, antes da aplicação do produto (D1/T0, D28/T0 e D56/T0) e após 30 minutos (D1/T30min, D28/T30min e D56/T30min), 60 (D1/T60min, D28/T60min e D56/T60min) e 120 minutos (D1/T120min, D28/T120min e D56/T120min) da aplicação. Para cada tempo D1, D28 e D56, a análise foi feita ajustando modelos lineares, onde os efeitos de produto e tempo foram avaliados. As medidas são realizadas como medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais, conforme tabela e gráfico abaixo.

<b>Média ± Desvio padrão da TEWL em cada tempo experimental (g/m<sup>2</sup> h)</b>				
<b>D1</b>				
	<b>Tempo (minutos)</b>			
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>
<b>Placebo</b>	7,7±1,6	7,7±1,7	7,8±1,7	8,4±1,7
<b>ARRLC 1%</b>	7,8±1,7	7,6±1,7	7,6±1,7	8,0±1,6
<b>D28</b>				
	<b>Tempo (minutos)</b>			
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>
<b>Placebo</b>	7,3±1,8	8,6±1,7	8,6±1,8	8,7±1,8
<b>ARRLC 1%</b>	7,0±1,8*	7,8±1,7	8,0±1,7	8,1±1,8
<b>D56</b>				
	<b>Tempo (minutos)</b>			
	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>
<b>Placebo</b>	6,5±1,4	8,0±1,4	8,1±1,4	7,8±1,4
<b>ARRLC 1%</b>	6,0±1,4 <sup>Ω</sup>	7,0±1,4	7,2±1,5	7,1±1,4

**Tabela 15.** Média e desvio padrão dos valores de TEWL em cada tempo experimental.



**Figura 52.** Média dos valores de TEWL em cada tempo experimental.  $\Omega$   $P < 0,001$ , em relação ao ARRLC 1% D1/T0,  $P < 0,01$ , em relação ao ARRLC 1% D28/T0 e  $P < 0,001$ , em relação ao placebo D56/T0; \*  $P < 0,001$ , em relação ao ARRLC 1% D1/T0 e  $P < 0,001$ , em relação ao D28/T0 (SAS PROC MIXED).

De acordo com dados apresentados no gráfico 52 e tabela 16 acima, podemos observar que após 28 dias de aplicação (D28/T0) há uma diferença

significativa quando comparamos a TEWL obtida para a formulação contendo 1% de ARRLC em relação à formulação placebo. Em D56 (D56/T0), o efeito foi ainda mais evidente, sendo que o produto contendo 1% de ARRLC foi capaz de reduzir a TEWL em aproximadamente 10%, quando comparada à formulação placebo. Cabe ressaltar que além da diferença obtida entre os produtos, uma diferença de comportamento do produto ao longo do tempo também foi observada. Quando comparamos os valores de TEWL obtidos para a formulação contendo 1% de ARRLC nos três períodos avaliados (D1/T0, D28/T0 e D56/T0), pode-se notar uma redução significativa de TEWL com o uso prolongado do produto, o que reforça o efeito protetor de barreira com o tempo de uso. Esta diferença também foi significativa quando comparamos o perfil da TEWL provocada pelo placebo ao longo do tempo, porém a diferença foi bem menos evidente. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é que os valores obtidos após 120 minutos de aplicação nos períodos avaliados (D1/T120, D28/T120 e D56/T120), pode-se notar que a formulação contendo 1% de ARRLC praticamente manteve a os níveis de TEWL, enquanto que o grupo placebo apresenta um aumento da perda neste período.

#### 4.3.2.2. Avaliação Instrumental do Efeito na Redução de Linhas

##### Finas (Melhora do Relevo Cutâneo)

Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente a eficácia de duas formulações tópicas – formulação contendo ARRLC 1% (p/p) *versus* Placebo – no micro-relevo cutâneo, através dos parâmetros Ra, Rm e Rz.

As avaliações instrumentais do micro-relevo cutâneo foram realizadas nas seguintes ocasiões: no 1º, 28º e 56º dia de estudo, antes da aplicação dos produtos (D1/T0, D28/T0 e D56/T0), levando em consideração a melhora das rugas. Os resultados das medidas instrumentais encontram-se na tabela e gráfico abaixo:

<i>Média ± Desvio padrão em cada tempo experimental</i>			
D1			
	Parâmetros		
	Rm	Rz	Ra
<b>Placebo</b>	0,116±0,023	0,091±0,017	0,019±0,004
<b>ARRLC 1%</b>	0,121±0,021	0,096±0,017	0,023±0,003
D28			
	Parâmetros		
	Rm	Rz	Ra
<b>Placebo</b>	0,109±0,015	0,088±0,012	0,018±0,003
<b>ARRLC 1%</b>	0,110±0,018	0,088±0,014	0,018±0,003
D56			
	Parâmetros		
	Rm	Rz	Ra
<b>Placebo</b>	0,113±0,013	0,090±0,010	0,018±0,003
<b>ARRLC 1%</b>	0,111±0,013	0,089±0,011	0,018±0,001 <sup>Ω</sup>

**Tabela 16. Médias e desvios padrões dos valores de Rm, Rz e Ra em cada tempo experimental.** Ω  $P < 0,001$ , em relação ao ARRLC 1% D1/parâmetro Ra,  $P < 0,05$ , em relação ao placebo D56/parâmetro Ra (SAS PROC MIXED).

De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, podemos observar que para o parâmetro Ra (média aritmética das rugosidades) houve uma diminuição significativa para a formulação contendo 1% de ARRLC aolongo

do tempo, indicando melhora das linhas finas. Em comparação com o produto placebo, a formulação contendo 1% de ARRLC também apresentou melhor desempenho após 56 dias de aplicação, uma vez que reduziu a média das rugosidades quando comparada aos valores obtidos no início do estudo (D1).



# ***Discussão***

## **5. DISCUSSÃO**

---

Envelhecimento, um complexo processo que define as alterações observadas no organismo ao longo da vida, permanece ainda um enigma para a área médica científica (Yaar, 2002). Um grande progresso tem sido realizado nos últimos cinquenta anos na tentativa de aproximar-se da perfeita compreensão das alterações fisiológicas que ocorrem em decorrência do envelhecimento. Estudos realizados recentemente na área da gerontologia têm se voltado às buscas pelo perfeito entendimento, através de mecanismos bioquímicos que acompanham o indivíduo ao longo da vida, da então chamada “biologia do envelhecimento”. Progressos no campo da farmacologia, da bioquímica e da genética também têm sido observados em estudos relacionados diretamente à compreensão deste fenômeno.

Sabe hoje que o processo de envelhecimento não representa um mecanismo de seleção natural entre as espécies. Trata-se de um complexo processo no qual, fatores intrínsecos e extrínsecos, levam progressivamente à perda da integridade estrutural e das funções fisiológicas orgânicas (Friedman, 2005; Farage et al., 2008). Devido a sua localização anatômica e ampla diversidade funcional, a pele é o único órgão capaz de evidenciar as inevitáveis alterações que ocorrem no organismo em decorrência do processo de envelhecimento (McCullough e Kelly, 2006).

O envelhecimento cutâneo é tido como um complexo fenômeno biológico no qual ocorrem importantes alterações nos diferentes constituintes da pele. É resultado de dois processos independentes, clínica e biologicamente distintos,

que afetam a pele simultaneamente. Ao primeiro, conhecido como “relógio biológico”, damos o nome de envelhecimento intrínseco, o qual afeta a pele na mesma proporção em que órgãos internos são afetados, como por exemplo, a lenta e irreversível degeneração tecidual (Uitto e Bernstein, 1998, El-Domyati et al., 2002). O segundo, denominado envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento, é resultado da exposição da pele a agentes agressores ambientais, primeiramente radiação ultravioleta (RUV) (Gilchrest, 1995, El-Domyati et al., 2002).

Em decorrência do envelhecimento, as principais funções da pele, tais como proteção, excreção, secreção, absorção, termo-regulação, pigmentação, percepção sensorial e regulação dos processos imunológicos são alteradas significativamente. Mudanças fisiológicas incluem disfunção da barreira cutânea, redução do número de queratinócitos e fibroblastos e redução da rede vascular – particularmente próximo aos bulbos capilares e glândulas – resultando em fibrose e atrofia, diminuição do crescimento capilar e ungueal, retardo na síntese de vitamina D, declínio na densidade das células de Langerhans e conseqüente redução das respostas imunológicas específicas e inespecíficas (Ramos-e-Silva e Carneiro, 2001). Além disso, observa-se um aumento considerável na produção e ação de radicais livres, juntamente com um aumento da permeabilidade de substâncias químicas, enquanto a capacidade do estrato córneo de reter água é diminuída consideravelmente (Kurban e Bhawan, 1990; Ramos-e-Silva e Carneiro, 2001). Estas alterações representam uma atrofia generalizada com poucas alterações estruturais após os 50 anos, seguida por

lenta deterioração. Em contraste, a exposição solar – especificamente à RUV –, inicia uma cascata de respostas celulares e moleculares que leva à rápida e dinâmica desordem cutânea metabólica e estrutural denominada fotoenvelhecimento (McCallion e Li, 1993; Farage et al., 2008).

Os efeitos da radiação solar sobre a pele são profundos e estima-se que são responsáveis por aproximadamente 90% dos sinais visíveis do envelhecimento cutâneo (Sudell et al., 2005), especialmente nos casos onde há distúrbio nos parâmetros naturais de proteção, como por exemplo nos casos de indivíduos portadores de dermatites e demais reações imunológicas ou inflamatórias da pele que geram distúrbio na barreira cutânea, ou naqueles que apresentam níveis aumentados de melanócitos na pele (Robinson, 1999).

Como sabemos, a RUV (radiação ultravioleta) é composta de três diferentes tipos de radiação. UVC é amplamente bloqueado pela camada de ozônio, tendo pouco impacto sobre a pele. UVB, cujos comprimentos de onda variam de 290-320 nm, por sua vez, penetram somente na epiderme, sendo responsável pelo eritema associado às queimaduras solares. Devido a sua alta penetração na derme, UVA está diretamente relacionado à maioria dos danos relacionados ao fotoenvelhecimento (Gilchrest, 1996).

Sobre o impacto da RUV, especialmente RUVA e RUVB, a pele passa por inúmeras alterações, incluindo hiperpigmentação, fotodano, alterações histológicas e imunológicas (Misery, 2000).

Tendo em vista a complexidade do envelhecimento cutâneo, especialmente relacionada ao fotoenvelhecimento, podemos dividir este trabalho

em duas partes, para melhor compreensão e discussão dos resultados encontrados. A primeira parte consistiu em avaliar os efeitos da RUV sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele através da mensuração de parâmetros específicos em culturas de fibroblastos e queratinócitos humanos. Os parâmetros avaliados antes e após a exposição das culturas celulares à RUV (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia) foram: produção de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos POMC-derivados, atividade do sistema de homeostase redox, síntese de componentes da matriz extracelular, atividade das enzimas metaloproteinases e de seu inibidor tecidual. Após a realização dos experimentos propostos para a primeira parte deste trabalho, passamos a considerar para a segunda etapa, a possível ação *in vitro* e *in vivo* de compostos aqui selecionados sobre a reversão ou controle dos efeitos deletérios da RUV sobre a pele.

Dentro do contexto da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele, o envolvimento do sistema imunológico no fotoenvelhecimento tem sido relatado por muitos autores que demonstraram o papel crucial das citocinas na resposta modulada à foto-exposição aguda e crônica da pele à RUVA e B (Schwarz, 2002; Kondo, 2000; Ichihashi et al., 2003; Krutmann, 2000; Terui e Tagami, 2000; Yaar e Gilchrest, 2001).

Citocinas são produzidas por quase todas as células nucleadas, quando ativadas ou estimuladas, incluindo queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans na epiderme, e fibroblastos, mastócitos e outras células inflamatórias na derme (Kondo, 2000). Todas elas são capazes de produzir várias citocinas, muitas das quais são principalmente induzidas pela RUVB;

porém ambas as radiações UVA e UVB regulam suas ações (Kondo, 2000). Todavia, pouco é conhecido sobre os efeitos específicos da RUVA sobre a indução na produção de citocinas por células da pele (Kondo, 2000). Por este motivo, não distinguimos neste trabalho os efeitos dos raios UVA e UVB sobre a resposta imunológica da pele frente à foto-exposição.

Utilizando o modelo experimental de cultura de queratinócitos humanos *in vitro*, avaliamos o perfil de resposta destas células frente à exposição aguda e crônica à radiação ultravioleta (RUVA/B, 100mJ/cm<sup>2</sup>/dia). Segundo Damian et al. (1998), durante 5 dias de exposição à RUVA/B, culturas celulares de pele humana cultivadas *in vitro*, respondem diferentemente ao longo do tempo, simulando os efeitos agudos e crônicos da pele à exposição solar (Damian et al., 1998). Desta forma, para que pudéssemos estudar o comportamento das células durante o fotoenvelhecimento, submetemos as culturas celulares à RUVA/B durante 5 dias consecutivos, avaliando dia-a-dia, a concentração das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Estudos indicam que a exposição aguda da pele à RUV, especialmente RUVB, leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , as quais levam à vasodilatação, produção seqüencial de histamina e demais peptídeos vasoativos, com conseqüente eritema e aumento da sensibilidade cutânea (Hruza e Pentland, 1993; Schwartz, 1998; Terui e Tagami, 2000). Nossos achados corroboram com estes estudos, uma vez que queratinócitos humanos expostos à RUVA/B apresentaram, a curto prazo, níveis aumentados destas citocinas no sobrenadante das culturas. Tanto para IL-1 $\alpha$ ,

TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , o que pudemos observar é que houve um aumento significativo em relação ao controle não-exposto durante os dois primeiros dias de exposição. Ainda considerada exposição aguda, o terceiro dia de exposição, demonstrou níveis aumentados em relação ao controle, porém já evidenciando uma queda em relação aos dois primeiros dias de exposição. Considerados dias de exposição crônica, os quarto e quinto dias de exposição à RUVAB, demonstraram neste estudo os efeitos do fotoenvelhecimento sobre o sistema imunológico da pele, uma vez que níveis significativamente diminuídos destas citocinas em relação ao controle não-exposto foram encontrados.

Esta queda considerável nos níveis destas citocinas pró-inflamatórias fundamentais em vários processos homeostáticos da pele, encontrada na pele foto-exposta, demonstra a imunossupressão que acompanha o fotoenvelhecimento. De acordo com Kondo (2000), as alterações histológicas observadas no fotoenvelhecimento, as quais caracterizam-se por mudanças na espessura da pele associadas à importantes atipias nucleares nos queratinócitos, são consequência, dentre outros aspectos, da redução nos níveis de citocinas imunoestimulantes, dentre elas IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Kondo, 2000).

De maneira geral, independente do grau de exposição da pele à RUV, um descontrole nos níveis basais das citocinas é observado, o que resulta em consequências drásticas na fisiologia cutânea. Alterações nas condições normais da barreira cutânea de uma pele não foto-exposta induzida por agentes agressores químicos ou físicos, por exemplo, leva à estimulação de uma resposta metabólica homeostática nas camadas nucleadas da epiderme que

resulta em uma rápida restauração das funções normais da barreira. Por outro lado, quando a barreira cutânea de uma pele fotoenvelhecida é agredida, uma capacidade diminuída de restauração é observada. Em um estudo realizado por Ye et al. (2002), foi demonstrado que, em uma pele jovem normal não foto-exposta, quando a barreira cutânea é agredida, há uma estimulação na liberação de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  na epiderme, citocinas reguladoras fundamentais na comunicação célula à célula, que resulta em um restabelecimento da barreira cutânea (Ye et al., 2002). Estes achados demonstram a importância da manutenção do equilíbrio nos níveis basais destas citocinas na pele fotoenvelhecida.

Da mesma forma em que o sistema imunológico da pele – representado principalmente por trocas nos níveis basais de citocinas –, sofre mudanças no processo do fotoenvelhecimento, outras alterações importantes ocorrem nos sistemas neuronal e endocrinológico da pele.

Conexões entre fibras nervosas, células imunológicas e cutâneas têm sido demonstradas na pele, onde neurotransmissores produzidos localmente são capazes de modular importantes funções cutâneas através de receptores de membrana localizados nestas e em outras células dérmicas e epidérmicas (Misery, 2000). Esta próxima relação entre a pele, o sistema imunológico e o sistema nervoso sugere a existência de um sistema unificado denominado sistema neuro-imuno-endocrinológico cutâneo (Misery, 1997; Misery, 2000). Este complexo sistema é consideravelmente afetado pela RUV (Paus et al., 2006),

respondendo de forma diferente de acordo com o grau da exposição (Scholzen et al., 1999; Misery, 2000).

De acordo com Toyoda et al. (1998), as funções neuronais epidérmicas aumentam com a severidade do fotodano, uma vez que as terminações celulares nervosas são mais numerosas na pele foto-exposta (Toyoda et al., 1998). Ambos queratinócitos e células de Langerhans são fontes potenciais de neuropeptídeos, os quais desempenham importante papel no fotoenvelhecimento (Luger, 1998; Scholzen et al., 1999; Misery, 2000).

Dentre os principais neuropeptídeos liberados na pele após contato com estímulos nocivos, destacam-se substância P, CGRP, neuropeptídeo Y, galanina, somatostatina e os peptídeos derivados proopiomelanocortina (POMC), os quais têm sido amplamente detectados na pele após exposição solar (Scholzen et al., 1998; Luger et al., 1997). De estrutura e efeitos analgésicos e sedativos similares à morfina, os POMC-peptídeos são formados por uma combinação seqüencial N-terminal de aminoácidos específicos (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met ou Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu).  $\beta$ -endorfina origina-se a partir da clivagem da molécula POMC, uma proteína com 267 resíduos aminoácidos, cujas terminações nitrogenadas ligam-se fortemente a um dos três receptores opióides descritos – mu, kappa e delta – levando aos efeitos similares aqueles da administração do ópio (Bigliardi et al., 2002). A ligação da  $\beta$ -endorfina ao seu receptor produz analgesia central e periférica, levando à inibição dos sinais emitidos pelas células nervosas nociceptoras para o cordão espinhal (Bigliardi et al., 2004).  $\beta$ -endorfina e encefalina apresentam afinidade aos receptores

opióides localizados na membrana plasmática das células imunocompetentes, parecendo estar intimamente envolvidos na regulação da resposta imunológica. (Panerai e Sacerdote, 1997). Além disso, fortes evidências sugerem a conexão dos POMC-peptídeos aos centros do prazer no sistema nervoso central (Schmid e Zulli, 2005).

Peptídeos POMC-derivados são gerados na pele, a partir da ação de alguns estímulos celulares, tais como  $IL-1\alpha$ ,  $TNF-\alpha$ , RUV, espécies reativas de oxigênio e polissacarídeos inflamatórios (Teofoli et al., 1997). Sob o impacto agudo da RUV, queratinócitos produzem níveis consideráveis destes neuropeptídeos na tentativa de reduzir a sensibilidade da pele gerada pelo início da resposta oxidativa e inflamatória (Panerai e Sacerdote, 1997). Além disso, a  $\beta$ -endorfina desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio entre as respostas de Th1 e Th2, crucial no controle da homeostasia local (Misery, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado a existência da funcionalidade da ligação da  $\beta$ -endorfina aos seus receptores mu-opiíides em melanócitos, queratinócitos e fibroblastos. Estes achados indicam um importante envolvimento deste POMC-peptídeo sobre a regulação da melanogênese, dendricidade e proliferação de melanócitos e estimulação da migração e proliferação de queratinócitos (Kauser et al., 2004). Além disso, a  $\beta$ -endorfina parece estar envolvida no processo de reepitelização, regeneração tecidual e cicatrização (Bigliardi et al., 2003).

Evidências apontam também o impacto envelhecimento sobre os níveis e atividade da  $\beta$ -endorfina na pele. Segundo Slominski et al. (2000), níveis séricos de  $\beta$ -endorfina encontram-se reduzidos em idosos e em situações crônicas de estresse (Slominski et al., 2000). Na pele, cortes histológicos de pele fotoenvelhecida marcados com anti-corpo específico evidenciaram menores concentrações deste POMC-peptídeo quando comparados à amostras de pele não foto-expostas, bem como àquelas submetidas à exposição aguda.

Na tentativa de demonstrar os efeitos da foto-exposição sobre os níveis de  $\beta$ -endorfina na pele, realizamos neste trabalho a exposição de queratinócitos humanos cultivados *in vitro*, durante cinco dias consecutivos, à RUVA/B (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia).

Nossos resultados demonstram que um pico na produção de  $\beta$ -endorfina ocorreu no primeiro dia de exposição, indicando uma resposta imediata das células na tentativa de reverter os danos iniciais causados pela RUV. Os segundos e terceiros dias de exposição apresentaram ainda uma produção aumentada de  $\beta$ -endorfina em relação ao controle não-irradiado. Estes achados supõem uma resposta ainda positiva quanto à tentativa de manutenção da homeostasia celular. No entanto, com a cronicidade da exposição ocorre uma redução considerável nos níveis de  $\beta$ -endorfina em relação à condição basal, o que demonstra a incapacidade das células em manter o equilíbrio cutâneo durante o fotoenvelhecimento. Estes achados corroboram com os estudos citados acima e contribuem para a potencialização dos achados histológicos e clínicos da pele fotoenvelhecida.

Além da avaliação da resposta de queratinócitos humanos quanto à produção de  $\beta$ -endorfina após estresse solar, estudamos neste trabalho o envolvimento da Leu-encefalina, um importante peptídeo opióide endógeno, que apresenta atividades similares à  $\beta$ -endorfina (Nissen et al., 1998). De acordo com Nissen et al. (1999), a Leu-encefalina é capaz de modular a resposta imunológica e os processos inflamatórios na pele (Nissen et al., 1999). Da mesma forma que ocorre para os demais POMC-peptídeos, níveis aumentados de Leu-encefalina são encontrados na pele após exposição solar aguda, enquanto que níveis reduzidos são observados em decorrência da exposição crônica (Nissen et al., 1998).

Nossos resultados demonstram coerência com estes estudos, uma vez que a exposição à RUVA/B durante os dias que representam a exposição aguda – dias 1 e 2 –, níveis aumentados de Leu-encefalina foram encontrados no sobrenadante das culturas de queratinócitos humanos foto-expostos, em relação à condição basal. Cabe ressaltar que mesmo apresentando níveis superiores ao controle, o grupo foto-exposto já apresentou em D2, uma queda considerável em relação a D1. Concentrações reduzidas de Leu-encefalina foram encontradas para os dias 3, 4 e 5, o que demonstra os efeitos do fotoenvelhecimento sobre os níveis deste POMC-peptídeo.

A perda da capacidade de queratinócitos de sintetizar  $\beta$ -endorfina e Leu-encefalina, bem como outros POMC-peptídeos durante o fotoenvelhecimento, gera importantes efeitos deletérios sobre a pele, dentre eles: incapacidade de restauração perfeita da barreira cutânea, redução da habilidade de reparar

tecidos, redução da capacidade proliferativa de células dérmicas e epidérmicas, bem como redução do estímulo da síntese protéica (Roosterman et al., 2006).

Segundo Teofoli et al. (1997), um dos fatores que leva à estimulação da produção e liberação de POMC-peptídeos na pele é a presença de níveis aumentados de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Teofoli et al., 1997). Por este motivo, acreditamos que uma das causas da redução significativa dos níveis basais de  $\beta$ -endorfina e Leu-encefalina nas culturas celulares avaliadas neste trabalho, seja a redução que obtivemos também para estas citocinas pró-inflamatórias ao longo dos cinco dias, conforme apresentado acima.

Grande parte das manifestações clínicas observadas na pele fotoenvelhecida – tais como aspereza, rugosidade excessiva, perda de elasticidade e firmeza, bem como consideráveis lesões no tecido conjuntivo – é diretamente dependente da integridade da MEC (Berneburg et al., 2000).

Achados histológicos demonstram perda de MEC, representada pela redução significativa na quantidade de colágeno e elastina funcional na derme após foto-exposição sucessiva (El-Domyati et al., 2002). Danos às fibras de colágeno e elastina na derme são considerados por muitos autores a verdadeira marca da exposição solar prolongada, sendo a principal causa da aparência enrugada da pele fotoenvelhecida (Kligman e Kligman, 1985; Wlaschek et al., 1995; Fisher et al., 1996; Uitto, 2008).

Das quatro principais macromoléculas que compõem a MEC na pele, o colágeno é a mais abundante, representando aproximadamente 80% do total do peso seco da derme, e conferindo à pele proteção, sustentação e propriedades

tênseis (Tzaphlidou, 2004; Uitto, 2008). Fibras formadas pela proteína elastina representam cerca de 3% do peso total da derme, proporcionando à pele elasticidade, resistência e propriedades reparadoras (Uitto, 2008).

As alterações histológicas e clínicas observadas na pele fotoenvelhecida são devidas, em parte, ao fenômeno conhecido como elastose solar, o qual caracteriza-se pelo acúmulo de material elastótico na derme, em decorrência da degradação enzimática da elastina ativada fortemente pela exposição da pele à RUV (Bernstein et al., 1996, Sellheyer, 2003; Uitto, 2008). A quantidade de elastina é aumentada consideravelmente na pele fotoenvelhecida e todos os componentes à ela relacionados parecem estar presentes (Zimmermann et al., 1994; Bernstein et al., 1995; Kligman et al., 1985). No entanto, sua organização estrutural e sua funcionalidade encontram-se drasticamente comprometidas (Jenkins, 2002).

Em contraste ao comportamento da rede de fibras elásticas, componentes relacionados à rede colagênica, principalmente colágeno I, encontram-se reduzidos na pele foto-danificada (Bernstein et al., 1995; Kondo, 2002). Esta redução, juntamente com a degeneração tecidual acompanhada do desarranjo das fibras elásticas (Bernstein e Uitto, 1996), parece estar diretamente implicada à ação de metaloproteinases (MMPs) (Griffiths et al., 1993; Fisher et al., 1997).

MMPs formam uma ampla família de enzimas degenerativas e três delas são particularmente importantes na degradação da MEC na pele. A ação combinada entre matriz colagenase (MMP-1), gelatinase B (MMP-9) e colagenase 3 (MMP-13) pode degradar completamente os diferentes tipos de

colágeno e os componentes da rede de fibras elásticas na pele (Birkadel et al., 1993). Mais recentemente, uma elevada atividade de MMP-8 (colagenase neutrofílica) seguida da exposição à RUV tem sido descrita, mas não parece contribuir substancialmente para a degradação da MEC UV-induzida (Fisher et al., 1996).

A expressão basal destas enzimas é relativamente baixa na pele normal. Todavia, encontram-se super-expressadas após exposição à RUV *in vivo* e *in vitro* (Fisher et al., 1997). A irradiação da pele humana com uma simples dose de RUV é capaz de aumentar a atividade de MMPs, as quais têm sido relacionadas à significativa degradação de fibras de colágeno. Um trabalho realizado por Fisher et al. (1997) demonstrou que a degradação de colágeno aumentou aproximadamente 58% na pele irradiada após 24 horas da exposição (Fisher et al., 1997).

Buscando avaliar os efeitos da RUV sobre a atividade das enzimas MMP-1, MMP-9 e MMP-13 e conseqüentemente sobre a degradação de colágeno e elastina, fibroblastos humanos foram expostos à RUVA/B (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia) durante cinco dias consecutivos, e o perfil de resposta das células foi mensurado diariamente. Cabe ressaltar que este protocolo não encontra-se descrito na literatura consultada, porém mantivemos o mesmo desenho experimental que foi utilizado para avaliar o perfil de resposta de queratinócitos humanos quanto à produção de citocinas e POMC-derivados. Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com os achados acima referenciados no que diz respeito à ação da RUV sobre os componentes e atividades enzimáticas da MEC, uma vez

que os fibroblastos apresentaram uma maior produção das enzimas MMPs e conseqüentemente uma redução das proteínas dérmicas colágeno e elastina.

Quando levamos em consideração a produção de MMP-1, MMP-9 e MMP-13 pelas culturas celulares, é notório um aumento gradual ao longo dos 5 dias de exposição à RUVA/B. Cabe ressaltar que já no primeiro dia (D1) ocorre um aumento considerável na atividade das três enzimas avaliadas, o que segundo alguns autores é considerada a principal causa da degradação aguda da MEC (Fisher et al., 1998; Uitto e Bernstein 1998; Jenkins, 2002). Os dias subseqüentes mantiveram o constante aumento na produção de MMPs, apresentando como pico os valores obtidos em D5.

Estes achados são diretamente proporcionais aos resultados obtidos na mensuração da concentração de colágeno e elastina durante os cinco dias de foto-exposição das culturas de fibroblastos humanos. Como era de se esperar, uma vez que o número e a atividade desta célula dérmica majoritária são consideravelmente reduzidos no fotoenvelhecimento (Francis e Robert, 1984; Uitto, 2008), a síntese destas proteínas apresentou-se reduzida dia após dia, atingindo níveis mínimos no quinto dia de exposição (D5).

O impacto da RUV sobre as propriedades do tecido conectivo são tão intensos que estudos em animais demonstram que a foto-exposição de ratos, especialmente em decorrência da cronicidade da exposição à RUVA, leva ao aumento da atividade de MMPs equivalente aos valores obtidos para animais envelhecidos cronologicamente durante 24 meses (Labat-Robert et al., 2000).

Todas as MMPs são reguladas por muitos níveis moleculares, incluindo transcrição, estabilidade do RNAm, compartimentalização enzimática, ativação de pró-enzimas ou endocitose. Nos espaços extra ou pericelulares estas enzimas são reguladas, principalmente, por inibidores tissulares denominados TIMPs (inibidor tecidual de metaloproteinases) (Hornebeck, 2003). Dos quatro TIMPs descritos até o momento, TIMP-1 é o principal e mais abundante e parece estar relacionado à inibição de quase todas as MMPs, com exceção das subfamílias de MMPs, normalmente localizadas nas membranas celulares (Baker et al., 2002).

Estudos relacionados ao envelhecimento cutâneo demonstram que ambas as formas de envelhecimento – intrínseca e extrínseca – apresentam menor produção e atividade de TIMP-1 (Rhie et al., 2001).

Com o intuito de complementar os efeitos da cronicidade da exposição à RUV sobre o metabolismo dérmico, avaliamos neste trabalho o perfil de resposta de fibroblastos humanos mantidos em cultura mediante impacto da RUVA/B durante cinco dias consecutivos. Em decorrência da foto-exposição crônica, nossos achados demonstram que a atividade de TIMP-1 reduz consideravelmente, enquanto que de forma aguda ocorre um ligeiro aumento na produção deste inibidor tecidual, supostamente como resposta das células ao aumento exacerbado dos níveis de MMPs, já nos dias iniciais da foto-exposição. Cabe ressaltar que nos três primeiros dias de exposição (D1, D2 e D3) houve um aumento gradual na produção de TIMP-1, sendo que uma queda brusca ocorreu no quarto dia. O quinto dia de foto-exposição apresentou níveis

reduzidos de TIMP-1 em relação ao controle em condição basal, o que demonstra os efeitos do fotoenvelhecimento sobre a atividade deste inibidor tecidual de metaloproteinases.

Outro aspecto de grande importância observado neste estudo diz respeito à interação entre os níveis de citocinas e a atividade de MMPs e TIMPs na pele. Neste sentido, alguns autores afirmam que tanto MMPs quanto TIMPs são modulados por citocinas (Dayer et al., 1985; Bauer et al., 1985; Postlethwaite et al., 1988; Edwards et al., 1987; Mauviel et al., 1993; Kondo et al., 2000). A produção de MMP-1 por fibroblastos humanos é induzida por IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como por TGF- $\beta$ , enquanto que a síntese e atividade de TIMP-1 são reguladas especificamente por IL-1 $\alpha$  (Dayer et al., 1985; Postlethwaite et al., 1988; Wlaschek et al., 1994; Kondo, 2000). Nossos achados corroboram com estes estudos, uma vez que, conforme demonstrado anteriormente, após exposição aguda à RUVA/B ocorre um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Este aumento pode estar diretamente relacionado ao aumento na atividade das MMPs, bem como ao aumento na produção de TIMP-1 após a foto-exposição aguda.

Além do envolvimento de citocinas, POMC-peptídeos, MMPs e integridade dos componentes da MEC, outro importante aspecto relacionado ao fotoenvelhecimento consiste no crucial envolvimento do estresse oxidativo induzido pela exposição aguda e crônica da pele à RUV (Yamamoto, 2001). Para muitos autores, a ação de radicais livres (RL), especialmente na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS), desempenha um papel central na iniciação

e perpetuação na sinalização dos eventos que levam à resposta celular em consequência da foto-exposição (Yamamoto, 2001; Wlaschek et al., 2001; Jenkins, 2002; Nishigori et al., 2003; Kregel e Zhang, 2007). Após exposição da pele à RUV ocorre um aumento significativo nos níveis de peróxido de hidrogênio e de outras ROS (Jurkiewicz e Buettner, 1996; Barber et al., 1998; Brenneisen et al., 1998; Yasui and Sakurai, 2000), bem como uma redução das enzimas antioxidantes naturais de defesa (Yamamoto, 2001). Estes achados são também observados na pele cronologicamente envelhecida (Jenkins, 2002), sendo que enquanto baixos níveis de ROS são continuamente produzidos *in vivo* e estão envolvidos em processos fisiológicos, evidências apontam para os efeitos deletérios das altas concentrações destas moléculas geradas *in vitro* e *in vivo* após exposição da pele à RUVA/B (Masaki et al., 1995; Jurkiewicz e Buettner, 1996; Yasui e Sakurai, 2000). Em ambos os casos, este aumento na produção de ROS leva às alterações genéticas, estruturais e funcionais das proteínas dérmicas da MEC, especialmente colágeno, levando ao dano cutâneo muitas vezes irreversível (Jenkins, 2002).

A ação de ROS tem sido reportada por seu papel crucial no metabolismo dos colágenos (Wlaschek et al., 2001). ROS não apenas destroem o colágeno intersticial, como também inativam TIMPs e induzem a síntese e ativação das MMPs (Scharffetter-Kochanek et al., 1993). MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-13 apresentam-se super-estimuladas em culturas celulares de fibroblastos humanos após exposição à RUVA/B, especificamente pelo aumento induzido das

concentrações de ROS (Wlaschek et al., 1994; Herrmann et al., 1996; Brenneisen et al., 1997; Wenk et al., 1999).

Na tentativa de reverter o dano oxidativo gerado pelo excesso de ROS, a epiderme humana possui notáveis e eficientes mecanismos antioxidantes, que são superiores aqueles encontrados em muitos tecidos, sendo a redução na eficiência destes sistemas proposta como fator crucial no fotoenvelhecimento (Kohen e Gati, 2000). Estes mecanismos incluem aumento da estabilidade física contra o dano oxidativo, prevenção da formação de ROS endógenas, eficientes mecanismos de reparação e o sistema de homeostase redox (Kohen e Gati, 2000).

Juntamente com antioxidantes não-enzimáticos de baixo peso molecular, o sistema de homeostase redox conta com a ampla participação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase e glutathione redutase (Kohen e Gati, 2000; Yamamoto, 2001; Kregel e Zhang, 2007), as quais apresentam-se evidentemente reduzidas no fotoenvelhecimento (Jenkins, 2002).

Tomando como base a importância das enzimas antioxidantes SOD e CAT no processo de manutenção da homeostase local e sistêmica, bem como a queda na sua atividade durante o fotoenvelhecimento, buscamos neste trabalho compreender o perfil de resposta das células epidérmicas após exposição aguda e crônica à RUVA/B no que diz respeito à atividade enzimática. Com relação à enzima SOD, nossos resultados demonstram que após o primeiro dia (D1) de exposição há um ligeiro e significativo aumento na sua atividade, o que parece

estar relacionado à tentativa das células em reverter o excesso de ROS gerado pela exposição súbita e aguda à RUV. Estes resultados são condizentes com o aumento na atividade de SOD gerado após exposição aguda da pele de camundongos à RUVB (Akhalaya et al., 2006). Akhalaya et al. (2006), demonstrou neste mesmo estudo, que após exposição crônica uma queda considerável na atividade de SOD é observada (Akhalaya et al., 2006). No segundo dia (D2) de foto-exposição, pudemos observar em nosso estudo, que a produção de SOD pelas culturas celulares começa a reduzir consideravelmente, retornando ao níveis apresentados pelo grupo controle não foto-exposto. Os terceiro (D3), quarto (D4) e quinto (D5) dias de exposição apresentaram níveis continuamente reduzidos de SOD em relação à condição basal, o que demonstra os efeitos prejudiciais da cronicidade da exposição solar sobre a atividade de SOD.

Com relação à atividade da enzima CAT, pudemos constatar outro perfil de resposta de queratinócitos humanos após a foto-exposição. A queda na produção desta enzima foi significativamente reduzida já no primeiro dia, sendo que a queda foi gradual ao longo dos cinco dias. Cabe ressaltar que a queda mais acentuada na atividade de CAT foi observada no quinto dia de exposição à RUVA/B.

De forma evidente, estes resultados demonstram solidamente os efeitos do fotoenvelhecimento sobre a redução da habilidade intrínseca do sistema de homeostase redox da pele, o que resulta no agravamento das alterações clínicas e histológicas observadas na pele foto-danificada.

De acordo com o exposto acima, incluindo os resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho, podemos concluir que parâmetros imunológicos, endocrinológicos e neuronais estão diretamente envolvidos no fotoenvelhecimento. Assim sendo, muitos mecanismos têm sido propostos como alternativa no controle das alterações que ocorrem na pele durante este complexo processo, uma vez que o envelhecimento intrínseco é geneticamente programado e as suas alterações são inevitáveis e praticamente irreversíveis (McCullough e Kelly, 2006).

Endógenos mecanismos trabalham na tentativa de proteger a pele contra os danos induzidos pela RUV, dentre eles alterações na espessura da epiderme (Soter, 1995), pigmentação (Rijken et al., 2004), mecanismos de reparação do DNA (Ichihashi et al., 2003), apoptose (Matsumura et al., 2004), TIMPs (Fisher et al., 1997), bem como ação de antioxidantes (Shindo et al., 1994). No entanto, na maioria das vezes, em parte devido ao aumento da incidência dos raios solares sobre a Terra, estes mecanismos isoladamente são insuficientes e incapazes de evitar o fotodano (Gilchrest, 1996; Pincelli e Bonté, 2004).

Dada toda esta complexidade bioquímica a cerca do fotoenvelhecimento, juntamente com o crescente aumento da expectativa de vida nos grandes centros, avanços na área farmacêutica e cosmética têm sido evidenciados nos últimos anos, onde algumas alternativas têm sido utilizadas pelos indivíduos como forma de melhorar a aparência da pele ou protegê-la contra os danos da radiação solar (McCullough e Kelly, 2006). Dentre as principais estratégias propostas para a prevenção e/ou tratamento tópico da pele fotoenvelhecida,

destacam-se principalmente retinóides e derivados, antioxidantes, hormônios estrogênicos, fatores de crescimento, alfa-hidróxiácidos, microdermoabrasivos, mio-relaxantes, miocontratores, hidratantes e os repositores do manto hidrolipídico (Yaar e Gilchrest, 2007).

Este arsenal dermatológico disponível hoje atua de forma específica sobre determinados parâmetros, sendo incapaz de proporcionar um mecanismo mais completo de ação. Além disso, os compostos mais utilizados atualmente na medicina estética, principalmente retinóides e alfa-hidroxiácidos, promovem efeitos adversos de relevante importância clínica.

Diante destas circunstâncias, novos compostos que possuam atividades antioxidantes, imunomoduladoras, reguladoras da homeostase cutânea, bem como aquelas que possam modular a atividade do complexo sistema neuro-imuno-endocrinológico da pele podem contribuir para atenuar as manifestações estéticas decorrentes do processo de envelhecimento foto-acelerado.

Neste sentido, avaliamos neste trabalho os efeitos da associação entre o extrato de *Rhodiola rosea* (ERR) e o dipeptídeo L-carnosina (LC) sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele, especificamente sobre os parâmetros avaliados na primeira etapa deste trabalho. Cabe ressaltar que ERR e LC foram avaliados separadamente e em associação nos estudos conduzidos *in vitro*. Para os estudos clínicos, dada a complexidade do desenho experimental realizado e o alto custo envolvido nos estudos em humanos, apenas os efeitos da associação foram avaliados.

A escolha dos ativos utilizados neste trabalho foi realizada com base em suas propriedades farmacológicas descritas, bem como em indícios de seus efeitos biológicos relevantes que pudessem estar diretamente relacionados à resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele. Outro aspecto de extrema importância consiste no fato de buscarmos obter um composto cujas propriedades pudessem ser complementares, dada a complexidade da resposta biológica frente à foto-exposição.

*Rhodiola rosea* L., uma das principais espécies das 200 pertencentes ao gênero *Rhodiola*, é conhecida nos seus países de origem por suas atividades adaptógenas, estimulantes do sistema nervoso central e imunoestimulantes (Petkov et al., 1986; Kelly, 2001; Yousef et al., 2006). A L-carnosina, por sua vez, destaca-se como um peptídeo endógeno polipotente, capaz de desempenhar funções biológicas importantes, tais como interação com radicais-livres, síntese de ácidos nucleicos, co-enzimas e proteínas, além de gerar subprodutos que desempenham papéis fundamentais no mecanismo inflamatório (Boldyrev e Severin, 1990; Gariballa e Sinclair, 2000).

Um dos resultados mais expressivos obtidos neste estudo consiste nos efeitos da associação entre *Rhodiola rosea* e *L-carnosina* (ARRLC) sobre diferentes parâmetros da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele. Dentre estes resultados destaca-se o aumento da produção de neuropeptídeos opióides (POMC-peptídeos) *in vitro*, após o tratamento das culturas celulares com diferentes doses de ARRLC, antes e após estresse solar. Nossos achados demonstraram que ARRLC é capaz de aumentar a produção de  $\beta$ -endorfina, de

forma dose-dependente, em todas as doses avaliadas, tanto em condição basal, quanto após estresse solar. Os resultados obtidos para ARRLC foram similares aqueles obtidos apenas com ERR se levarmos em consideração a equivalência de doses. Estes achados demonstraram que não houve potencialização de efeito após associação de ERR com LC, mesmo que LC tenha apresentado um efeito discreto no aumento dos níveis de  $\beta$ -endorfina em condição basal. Este pequeno aumento obtido com LC não apresentou-se de forma dose-dependente, sendo muito similar em todas as doses avaliadas. Neste parâmetro específico, atribuímos o efeito de ARRLC especificamente à presença de ERR, uma vez que estes achados condizem com outros autores, conforme descrito na literatura consultada. Estudos realizados com diferentes extratos de raízes de *R. rosea*, padronizados em seus principais constituintes fitoquímicos, tais como rosavins e salirosídeo, revelam sua ação antidepressiva e estresse-protetora, como consequência da elevação das concentrações de norepinefrina, dopamina, serotonina e endorfinas no cérebro, além de atuar como um agonista nicotínico colinérgico no SNC (Lazarova et al., 1986).

Pertencente também à classe dos peptídeos POMC-relacionados, a Leu-encefalina apresentou-se aumentada após a adição de ARRLC às culturas de queratinócitos humanos, sendo este aumento obtido de forma dose-dependente. Neste caso, ARRLC apresentou perfil similar à ERR, sendo que LC, diferentemente do que ocorreu no parâmetro  $\beta$ -endorfina, não apresentou efeito sobre a produção de Leu-encefalina. Acreditamos que os efeitos de ARRLC tanto no aumento da produção de  $\beta$ -endorfina, como de Leu-encefalina se deva

exclusivamente à presença de ERR, que conforme referenciado acima possui importantes efeitos conhecidos sobre a estimulação da produção de neurotransmissores e moléculas relacionadas.

Além disso, alguns estudos relacionam o aumento na produção de POMC-peptídeos aos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (Teofoli et al., 1997). Desta forma, cabe aqui relacionar os resultados obtidos para ARRLC sobre os níveis de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em cultura de queratinócitos humanos.

Conforme resultados descritos anteriormente, níveis significativamente reduzidos destas citocinas são encontrados na pele após exposição crônica à RUV. Esta imunossupressão compromete a homeostase cutânea e é considerada uma das principais causas das alterações das funções de barreira que ocorrem na pele foto-exposta (Ye et al., 2002). Na tentativa de reverter a imunossupressão, ARRLC promoveu, nas duas maiores doses avaliadas (2,0 e 1,0 mg/mL), um restabelecimento dos níveis normais destes mediadores após exposição à RUVA/B (100 mJ/cm<sup>2</sup>) por 5 dias consecutivos. Para IL-1 $\alpha$ , diferente do que observamos para os POMC-peptídeos, os efeitos obtidos para LC foram similares aos efeitos obtidos para ERR, sendo que as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR e a dose de 1,0 mg/mL de LC foram capazes de promover o completo restabelecimento dos níveis basais deste mediador. Os efeitos de ARRLC não apresentaram resultado diferente daquele obtido para os compostos isolados, o que indica a não potencialização da ação dos compostos quando utilizados concomitantemente, sendo que as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL do composto

apresentaram os mesmos resultados obtidos com as maiores doses de ERR e LC. Quando avaliamos a resposta de LC e ERR separadamente, podemos observar que para os parâmetros TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  houve uma diferença de resposta das células, sendo que os efeitos de ERR foram mais pronunciados que aqueles observados após tratamento com LC, apresentando o mesmo perfil de resposta da associação. A restauração dos níveis destes mediadores após estresse solar, bem como a ausência de alteração da resposta celular basal promovida por ARRLC pode ser devida a ação adaptógena do composto, que demonstrou-se efetivamente ativo quando da presença do estresse solar. Estes efeitos são fundamentais em produtos utilizados na prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento, uma vez que uma queda considerável nos níveis destas citocinas pró-inflamatórias, comum na pele foto-exposta, demonstra a imunossupressão que acompanha o fotoenvelhecimento, sendo considerada uma das principais causas das alterações histológicas observadas neste processo (Kondo, 2000).

Outro importante aspecto a ser levado em consideração ao avaliarmos a eficácia de produtos para cuidados da pele fotoenvelhecida, diz respeito à integridade da MEC, uma vez que muitas das manifestações clínicas comuns do fotoenvelhecimento, como rugosidades e perda de elasticidade e firmeza, são decorrentes do desarranjo do tecido conjuntivo e dos danos às fibras de colágeno e elastina (Berneburg et al., 2000; El-Domyati et al., 2002; Uitto, 2008).

Considerando os efeitos da exposição crônica da pele à RUV, avaliamos neste trabalho os efeitos de ARRLC e de seus ingredientes em separado, sobre

a síntese de colágeno e elastina em cultura de fibroblastos humanos foto-expostos à RUVA/B (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia) durante 5 dias consecutivos.

Nossos resultados demonstraram que a incubação dos fibroblastos com ARRLC na faixa de concentração que variou de 0,25 a 2,0 mg/mL promoveu aumentos significativos na síntese destes componentes da MEC. Esta resposta foi observada tanto em condição basal, quanto em condição de estresse solar, nas quais ARRLC apresentou basicamente o mesmo perfil de resposta. Quando avaliamos a resposta obtida para ERR e LC separadamente podemos observar que tanto para colágeno quanto para elastina, houve um efeito mais pronunciado nos grupos tratados com LC. No entanto, em ambos os parâmetros os resultados obtidos para ARRLC foram superiores aqueles obtidos para as frações aplicadas isoladamente, justificando a associação de ambos. Cabe ressaltar que em culturas celulares, ARRLC apresentou uma resposta concentração-dependente, sendo os efeitos mais pronunciados com a dose de 2,0 mg/mL.

A redução na quantidade de colágeno, elastina e demais constituintes da MEC na pele fotoenvelhecida deve-se em grande parte à habilidade das enzimas MMPs em aumentar consideravelmente a sua atividade em decorrência da foto-exposição aguda e crônica (Bernstein e Uitto, 1996; Griffiths et al., 1993; Fisher et al., 1997).

Nossos resultados apresentados na primeira etapa deste trabalho, conforme mencionado anteriormente, demonstraram que a produção e a atividade de determinadas MMPs aumentam consideravelmente ao longo dos

cinco dias de exposição das células à RUVA/B (100 mJ/cm<sup>2</sup>/dia), acelerando assim a degradação de fibras colagênicas e elastênicas. Avaliando a capacidade de ARRLC em reverter a atividade de algumas das principais MMPs descritas na pele, pudemos observar um perfil relativamente parecido para as MMPs 1 e 9. Em ambos os casos ARRLC não apresentou resultados significativos em condição basal, porém os efeitos foram muito pronunciados quando as culturas celulares sofreram agressão solar e foram tratadas com o composto. De forma dose-dependente, ARRLC foi capaz de inibir a produção de MMP-1 e MMP-9, sendo que para MMP-9 os efeitos foram ainda mais pronunciados, levando seus níveis a valores similares aqueles encontrados para o controle não foto-exposto. Quando levamos em consideração a resposta obtida para MMP-13, podemos observar evidências de efeito do composto mesmo na ausência de estresse solar. Para todas as MMPs avaliadas, os efeitos de ARRLC foram similares ou pouco superiores aqueles obtidos para LC aplicada separadamente nas culturas celulares, enquanto ERR apresentou efeito, porém discreto, na inibição de algumas destas enzimas. No entanto, a associação pode ser justificada pelos resultados obtidos com a dose de 2,0 mg/mL de ARRLC, uma vez que são significativamente superiores aqueles obtidos para a dose equivalente de ERR ou LC.

Segundo Giacomoni e Rein (2004), enquanto níveis aumentados de MMPs são produzidos durante a foto-exposição, níveis reduzidos de seus inibidores teciduais são encontrados na pele fotoenvelhecida (Giacomoni e Rein, 2004). Parte dos resultados obtidos para ARRLC sobre a inibição de MMPs, bem

como sobre a estimulação da produção de colágeno e elastina, pode ser devido à sua capacidade de estimular a atividade de TIMP-1, o principal inibidor tecidual endógeno de MMPs. Nossos resultados demonstram que mesmo na ausência do estresse solar (condição basal), ARRLC apresentou efeitos muito significativos, sendo estes mantidos após foto-exposição crônica. Os resultados obtidos foram mais pronunciados para as doses de 2,0 e 1,0 mg/mL de ARRLC, as quais não apresentaram-se significativas entre si, provavelmente por serem doses ótimas para ação do composto, quando levamos em consideração este parâmetro específico.

A atividade de ARRLC sobre o metabolismo dérmico, representado pela sua habilidade em reduzir os níveis e atividade de MMP-1, MMP-9 e MMP13, bem como em aumentar a concentração de TIMP-1, e conseqüentemente, os níveis de colágeno e elastina funcional na derme, é de fundamental importância no controle das alterações protéicas que decorrem do fotoenvelhecimento. Fibroblastos foto-estimulados apresentam uma maior produção das enzimas MMPs, uma perda da habilidade intrínseca dos TIMPs e conseqüentemente uma alteração considerável da estrutura protéica na derme (Bernstein et al., 1996, Sellheyer, 2003; Uitto, 2008). Estes resultados obtidos para ARRLC podem ser considerados importantes ferramentas na tentativa de recompor a atividade metabólica celular normal, acarretando a longo prazo na melhora da aparência estética da pele fotoenvelhecida.

Estudos relacionados ao envelhecimento cutâneo apontam, além da participação crucial de citocinas, POMC-peptídeos e enzimas de degradação

dérmica, os radicais livres (RL) como os agentes mais envolvidos neste processo, participando, direta ou indiretamente, de todas as etapas que determinam a sinalização e ativação da resposta celular (Epe, 1998; Yamamoto, 2001; Dröge, 2002).

Induzidos especialmente pela ação da RUV sobre moléculas cromóforas orgânicas, os radicais-livres formados são capazes de causar danos diretos e indiretos a várias moléculas constitutivas, incluindo danos irreversíveis ao DNA celular e às demais estruturas protéicas na pele (Sander et al., 2002).

Cabe ressaltar que durante o fotoenvelhecimento, há uma considerável diminuição dos níveis plasmáticos dos antioxidantes endógenos, dentre eles as enzimas SOD e CAT, enquanto um aumento dos marcadores de danos oxidativos é observado (Nuttall et al., 1998; Pincemail et al., 2001).

Neste sentido, a atividade seqüestrante de radicais livres (DPPH) de ARRLC, bem como a sua capacidade estimuladora da produção e atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT foram avaliadas. Utilizando o método químico de DPPH, uma curva dose-resposta (0,003 a 100 mg/mL) foi observada pela habilidade de ARRLC de seqüestrar estes radicais livres altamente reativos. Neste estudo, a atividade anti-radicalar produzida por ARRLC se mostrou mais pronunciada do que aquela observada com ERR e LC separadamente, sugerindo um efeito potencializado quando utilizados concomitantemente. A atividade de ARRLC também foi avaliada através da resposta de queratinócitos humanos quanto à produção de SOD e CAT antes e após foto-exposição (RUVA/B). ARRLC, em todas as concentrações avaliadas, demonstrou um

aumento na atividade enzimática de ambas as enzimas antioxidantes, tanto em condição basal quanto após estresse solar. Neste caso, também foi observada uma resposta concentração-dependente, sendo os efeitos mais pronunciados com a dose de 2,0 mg/mL. Cabe ressaltar que ERR e LC também apresentaram efeitos positivos, tanto na atividade anti-radicaís DPPH, quanto no aumento da atividade das enzimas antioxidantes, porém os efeitos foram mais pronunciados quando da associação (ARRLC), possibilitando-nos concluir que a atividade antioxidante foi potencializada.

O envolvimento da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele durante o fotoenvelhecimento, bem como os possíveis efeitos de ARRLC sobre o perfil histológico da pele também foram evidenciados neste trabalho. Amostras de pele humana obtidas de cirurgias blefaroplásticas de pacientes saudáveis do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas foram mantidas em condição basal e tratadas com ARRLC ou foram irradiadas durante 3 dias consecutivos e posteriormente tratadas com ARRLC. Ao compararmos os resultados obtidos do tratamento com ARRLC em condição basal é possível notar uma melhora visualmente significativa no aspecto geral da pele, caracterizado principalmente pelo aumento da espessura da epiderme, pelo aumento do número de queratinócitos nucleados na camada basal, bem como pela compactação da camada córnea, aparentemente não uniforme no controle não tratado. Após a exposição dos fragmentos de pele à RUVA/B, ARRLC foi capaz de reverter o aspecto visual significativamente danificado, representado pela redução do número de camadas na epiderme, redução do número de

queratinócitos viáveis, bem como por maior descompactação do estrato córneo, causados pela foto-exposição crônica. Após tratamento dos fragmentos com ARRLC 2,0 mg/mL, ocorre uma restauração do aspecto geral da pele, com aumento no número de camadas e queratinócitos viáveis, bem como uma menor perda de compactação do estrato córneo.

Estes achados são fundamentais para a comprovação dos efeitos *in vitro* obtidos para ARRLC, conforme demonstrados anteriormente, bem como para ilustrar de forma subjetiva os efeitos de ARRLC sobre a pele. Sabe-se que após a foto-exposição, especialmente de forma crônica, ocorre um comprometimento da barreira cutânea, com conseqüente alteração nos mecanismos fisiológicos normais da pele, incluindo redução no número de células viáveis da epiderme basal e desarranjo da arquitetura dérmica (Sudel et al., 2005). Estes efeitos sobre a barreira cutânea, bem como sobre a viabilidade celular e resposta homeostática da pele são resultados, em parte, da combinação de alterações que ocorrem em decorrência da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele frente à foto-exposição (Scholzen et al., 1999; Misery, 2000). Por este motivo, a habilidade de ARRLC em restaurar a estrutura da barreira cutânea e restabelecer as características da epiderme basal são fundamentais para a aparência geral da pele.

Possíveis explicações para os resultados obtidos para a eficácia *in vitro* de ARRLC podem ser atribuídas à sua rica composição. Análises por HPLC realizadas em nosso laboratório indicam que ARRLC apresenta um teor de aproximadamente 1,5% (p/p) de rosavins totais, 0,5% (p/p) de salirosídeo –

ambos provenientes do ERR – e 44,5% de  $\beta$ -alanil-L-histidina (L-carnosina). Estudos atribuem os efeitos farmacológicos descritos para extratos de *Rodhiola rosea* especialmente à presença dos rosavins – rosavin, rosin e rosarin – e salirosídeos (Spasov et al., 2000; Majewska et al., 2006). Estudos em cultura de células, animais e humanos realizados com extratos da planta padronizados nestes fitoquímicos têm revelado importantes atividades, tais como anti-fadiga (Darbinyan et al., 2000), anti-estresse (Spasov et al., 2000), anti-hipóxica e cardioprotetora (Maslova et al., 1994), anti-câncer (Udintsev e Schakhov, 1991), antioxidante (Ohsugi et al., 1999), imunoestimulante (Panossian et al., 1999) e estimulante sexual masculino (Saratikov e Krasnov, 1984). Cabe ressaltar que até o momento não haviam sido descritos estudos com extratos de Rodela rosea em cultura de células da pele humana. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho corroboram com alguns dos estudos realizados com os extratos da planta, conforme referenciados anteriormente.

Além do importante papel do ERR nos efeitos obtidos para ARRLC, muitas das atividades observadas *in vitro* podem ser atribuídas à presença de altas concentrações de LC no composto, uma vez que muitos estudos apontam os papéis biológicos relevantes deste peptídeo. A atividade tamponante da LC na musculatura esquelética pode ser a principal causa de sua atividade próton-ligante e antioxidante, conforme descrito por Abe (1995) (Abe, 1995). A LC atua também como um potente agente quelante capaz de neutralizar os danos causados por metais pesados como cobre, ferro e cobalto, além de ser um potente antioxidante especialmente contra radicais hidroxila e aniões superóxido

(Boldyrev, 1998; Dupin et al., 1984; Boldyrev et al., 1987; Aruoma et al., 1989; Boldyrev et al., 1999). Nossos resultados, tanto para LC quanto para o composto ARRLC corroboram com alguns destes estudos, uma vez que importantes efeitos foram observados em culturas celulares de queratinócitos e fibroblastos humanos, destacando a atividade antioxidante e a habilidade de inibir a atividade de determinadas MMPs.

De acordo com os resultados apresentados, bem como com base em estudos anteriores realizados com ERR e LC por outros pesquisadores, utilizando modelos experimentais diferentes, podemos concluir que a associação ARRLC apresenta importantes efeitos sobre o equilíbrio da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele. Estes efeitos encontrados nos estudos *in vitro*, juntamente com as fortes evidências dos efeitos de ARRLC sobre a pele humana, demonstrados pelos resultados obtidos nos ensaios histológicos, nos encorajaram a avaliar a possível eficácia clínica deste composto, a fim de possibilitar o uso dermatológico no tratamento e prevenção do fotoenvelhecimento.

Os estudos realizados em voluntários humanos sadios seguiram os mais reconhecidos e referenciados métodos para a avaliação de produtos dermatológicos e cosméticos. Cabe ressaltar que todos os estudos clínicos realizados neste trabalho foram conduzidos em voluntários que obedeceram um minucioso critério de inclusão, sendo que todos, sem exceção, foram submetidos ao pré-teste do ácido láctico (Stinging-Test), um ensaio capaz de selecionar painéis de voluntários portadores de pele sensível. Este cuidado foi adotado

para que pudéssemos mimetizar os efeitos do fotoenvelhecimento, uma vez que este processo aumenta consideravelmente a sensibilidade cutânea. O possível efeito protetor ou restaurador da barreira cutânea de uma emulsão contendo 1% (p/p) de ARRLC foi avaliado através da medida da perda de água transepidérmica (TEWL) após 56 dias de aplicação (2 vezes/dia), em comparação com a formulação placebo, sendo as medidas tomadas em D1, D28 e D56, nos tempos T0, T30, T60 e T120 minutos após a aplicação, nos respectivos dias. Os resultados obtidos demonstram que a formulação contendo ARRLC foi capaz de reduzir a TEWL quando comparada à formulação placebo já no primeiro dia de aplicação. O efeito protetor de barreira foi ainda mais evidente após 28 e 56 dias de aplicação, demonstrando o efeito do produto com o tempo de tratamento.

Estes resultados são de extrema importância, uma vez que além de todas as alterações bioquímicas apresentadas na pele fotoenvelhecida, observa-se um aumento considerável da permeabilidade de substâncias químicas na pele, enquanto a capacidade do estrato córneo de reter água é diminuída consideravelmente (Kurban e Bhawan, 1990; Ramos-e-Silva e Carneiro, 2001). A medida da TEWL, obtida pela medida instrumental da água perdida por evaporação, tem sido descrita como sendo uma importante e sensível ferramenta para avaliação da integridade do estrato córneo em estudos de eficácia de produtos anti-envelhecimento (Roskos e Guy, 1989; Brandner et al., 2006; Faurschou et al., 2007). Desta forma, os efeitos obtidos com a formulação contendo ARRLC nos permitem concluir que o uso do composto pode ser uma

importante ferramenta na melhora do aspecto geral da pele fotoenvelhecida, bem como na integridade funcional da pele como barreira à entrada de agentes agressores extrínsecos.

Na tentativa de complementar as medidas instrumentais que pudessem evidenciar os efeitos anti-envelhecimento de ARRLC, realizamos neste trabalho a avaliação da capacidade do produto em melhorar o aspecto do relevo cutâneo após 56 dias de aplicação da formulação testada pelas voluntárias incluídas no estudo. As medidas instrumentais do micro-relevo cutâneo foram realizadas quantitativamente por análise de imagens das réplicas com o uso do Skin Visiometer™ SV500 (Courage-Khazaka Electronic GMBH, Germany) em D1, D28 e D56, levando em consideração a melhora das rugas. A melhora do relevo cutâneo através desta técnica profilométrica pode evidenciar a redução das rugas finas na área tratada, sendo modelo experimental amplamente empregado na avaliação instrumental de compostos com apelos hidratante e anti-envelhecimento (Hatzis, 2004; Lee et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que ao longo do tempo (D0 x D28 x D56), houve diferença significativa entre os efeitos obtidos com a formulação contendo 1% de ARRLC e a formulação placebo, quando levamos em consideração a média aritmética das rugosidades (parâmetro Ra). Desta forma, a aplicação de uma formulação contendo ARRLC pode melhorar consideravelmente o relevo cutâneo através da redução das rugas finas, o que possibilita o seu uso na prevenção e tratamento tópico do fotoenvelhecimento.

Estudos de eficácia clínica instrumental, conforme descrito acima, são consideradas medidas objetivas fundamentais na confirmação e comprovação da real funcionalidade do produto avaliado (Rona et al., 2004; Koehler et al., 2006). No entanto, estudos subjetivos de apreciabilidade e aceitabilidade vêm ganhando espaço nos protocolos de eficácia clínica de produtos dermatológicos e cosméticos, uma vez que traduzem a real opinião de uma parcela representativa da população, considerada como consumidor final (Kligman et al., 2006).

Assim sendo, optamos neste trabalho pela realização de estudos que contemplassem a eficácia subjetiva, através de questionários direcionados às voluntárias, que pudessem evidenciar a melhora de parâmetros considerados cruciais no tratamento tópico da pele fotoenvelhecida. Para isto, grupos diferentes de voluntárias aplicaram ou placebo ou uma formulação contendo 1% de ARRLC, avaliando ao final do estudo os parâmetros sensação de ressecamento e melhora do conforto da pele. Complementando este estudo, um questionário comparativo entre a sensação de desconforto após Stinging-Test em D1 e D28 também foi aplicado na tentativa de avaliar a redução da sensibilidade cutânea, característica comum da pele exposta cronicamente à RUV. Nossos achados demonstram que aproximadamente 90% das voluntárias reportaram nível aumentado do conforto da pele após 28 dias de aplicação da emulsão contendo ARRLC, enquanto que das voluntárias que utilizaram uma emulsão placebo apenas 50% reportaram melhora. Além disso, já em D1 podemos observar uma melhora significativa de ARRLC em relação ao placebo.

Resultados positivos também foram obtidos para a melhora do nível de ressecamento da pele, uma vez que aproximadamente 75% das voluntárias reportaram redução na sensação de ressecamento da pele após 28 dias de tratamento com, enquanto que daquelas que utilizaram a formulação placebo apenas 50% relataram melhora. Finalizando os estudos clínicos subjetivos, ressaltamos aqui os resultados no questionário binário comparando a intensidade de desconforto da pele após Stinging-Test, onde observamos que o placebo não promoveu mudança no perfil de resposta das voluntárias, enquanto que naquelas que utilizaram a formulação contendo ARRLC, a grande maioria relatou que a sensação de desconforto era menor em D28, o que demonstra um efeito considerável do produto com o uso prolongado.

Os importantes efeitos obtidos para ARRLC no que diz respeito à restauração da resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele pode ser fundamental na recuperação da pele fotoenvelhecida ou prevenção e controle do fotoenvelhecimento. Estes efeitos bioquímicos parecem ser, provavelmente, os grandes responsáveis pelo excelente desempenho de ARRLC nos ensaios clínicos objetivos e subjetivos.

O completo mecanismo pelo qual ARRLC exerce seus efeitos biológicos ainda não está totalmente elucidado. No entanto, embora complexos mecanismos não avaliados neste estudo estejam envolvidos na fisiopatologia do fotoenvelhecimento, a melhora clínica apresentada por ARRLC apresentada neste trabalho, associada aos resultados obtidos nos estudos histológicos e *in vitro*, nos encorajam a afirmar que este composto pode ser utilizado como uma

alternativa eficaz em produtos para os cuidados gerais da pele, particularmente aqueles destinados à pele fotoenvelhecida, a qual apresenta-se demasiadamente sensível, esteticamente perturbada e consideravelmente imunossuprimida.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram o depósito de patente de aplicação para o composto ARRLC solicitada ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), sob o número PI 0700701-9.



## ***Conclusão***

## 6. CONCLUSÃO

---

O presente estudo demonstrou, dentre outras coisas, os efeitos da RUV sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele frente à foto-exposição aguda e crônica da pele à RUV. Os resultados encontrados nos permitem concluir que:

- A foto-exposição aguda promoveu um aumento inicial e gradual nos níveis das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , representados até o segundo ou terceiro dias de exposição de queratinócitos humanos à RUVA/B;
- Os níveis de  $\beta$ -endorfina encefalina também encontraram-se aumentados nos primeiros dias de exposição das culturas celulares à RUVA/B, sendo que os quarto e quinto dias de exposição demonstram os efeitos drásticos da foto-exposição sobre os níveis destes opióides endógenos;
- A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase reduz consideravelmente com a cronicidade da exposição;
- Fibroblastos humanos perdem a capacidade de sintetizar colágenos e elastina funcional durante a foto-exposição crônica, demonstrando perda de sustentação e elasticidade da pele com o fotodano;
- A atividade das enzimas metaloproteinases (MMP-1, MMP-9 e MMP-13) aumenta de forma gradual e severa com a cronicidade

da fotodano, enquanto a habilidade do seu inibidor tecidual (TIMP-1) apresentou-se significativamente reduzida;

- Estes achados demonstram *in vitro* as alterações que ocorrem na pele em decorrência do fotoenvelhecimento;
- A capacidade da pele de modular a resposta neuro-imuno-endocrinológica ao longo do fotoenvelhecimento é perdida com a cronicidade da exposição, onde mecanismos antioxidantes, reparadores, promotores de bem-estar e imunológicos são severamente danificados.

Além de evidenciar os efeitos da RUV sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele em decorrência do fotoenvelhecimento, este trabalho possibilitou a avaliação da eficácia de uma nova associação com forte potencial para atuar sobre a prevenção e o controle do fotoenvelhecimento. Os resultados apresentados aqui nos permitem concluir que:

- O ERR, em condição basal, não altera a resposta de queratinócitos humanos no que diz respeito à produção de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , demonstrando seu efeito adaptógeno;
- Os níveis destas citocinas após exposição crônica das culturas, especialmente com as doses de 1,0 e 0,5 mg/mL de ERR, retornam à condição basal;
- A LC também não alterou a produção de citocinas nas células em condição basal;

- A LC promoveu uma melhora no perfil de resposta das células quanto à produção de citocinas após irradiação crônica, no entanto, mesmo com as maiores doses, apresentou efeitos mais discretos que o ERR;
- A associação ARRLC não apresentou efeitos potencializados, quando comparamos aos efeitos obtidos para as frações em separado no que diz respeito à produção de citocinas, mantendo, com as maiores doses, resultados similares aos da ERR utilizada isoladamente;
- ERR e LC proporcionaram, especialmente com as maiores doses, efeitos positivos na recuperação do sistema de homeostase redox da pele após a foto-exposição crônica das culturas celulares;
- ERR e LC induziram aumento da atividade de SOD e CAT mesmo em condição basal, possibilitando assim a preparação da pele para deter futuras agressões;
- ARRLC, neste caso, apresentou efeitos potencializados na associação, onde pudemos observar aumento significativo na atividade enzimática quando comparado aos valores obtidos apenas com ERR ou LC isoladamente;
- Um painel similar foi observado para a síntese de proteínas da MEC, onde ARRLC, nas doses de 2,0 e 1,0 mg/mL, apresentou efeito superior aos compostos utilizados separadamente;

- No padrão enzimático de MMPs, houve uma melhor resposta nos grupos tratados com LC, sendo que as duas maiores doses deste peptídeo geraram uma forte inibição na atividade de MMP-1, MMP-9 e MMP-13;
- A ERR também inibiu a atividade das MMPs, especialmente após agressão solar, porém com capacidade inferior à encontrada para LC;
- A associação, na maior dose aplicada, demonstrou efeito aditivo quando comparado ao uso de LC isoladamente;
- ERR é capaz de aumentar de forma muito significativa a produção de POMC-peptídeos, uma vez que induziu um aumento de até 4 vezes na produção de  $\beta$ -endorfina e encefalina, mesmo em condição de estresse solar;
- A LC não promoveu aumento considerável nos níveis de  $\beta$ -endorfina;
- ARRLC, no parâmetro opióides endógenos, apresentou muito discreto efeito aditivo quando comparado ao uso de ERR isoladamente;
- Os estudos clínicos conduzidos demonstraram que a formulação contendo ARRLC 1% melhorou consideravelmente, mesmo quando comparada ao placebo, a sensação de conforto da pele, reduziu a sensação de ressecamento da pele e reduziu a sensibilidade após Stinging-Test;

- ARRLC 1%, aplicado em uma formulação dermocosmética, apresentou excelente resposta na melhora do relevo cutâneo, na reparação de barreira e redução de perda de água transepidérmica, bem como um discreto incremento na firmeza e elasticidade da pele;
- Estes achados foram muito superiores ao grupo que utilizou a formulação placebo, indicado o efeito pronunciado da associação, mesmo sendo a formulação placebo um creme hidratante;
- De acordo com o apresentado e discutido neste trabalho, podemos concluir que ARRLC pode ser considerada uma importante ferramenta no controle, prevenção e tratamento da pele fotoenvelhecida, uma vez que apresentou efeitos importantes sobre a resposta neuro-imuno-endocrinológica da pele, fortemente alterada no fotoenvelhecimento.



# ***Referências Bibliográficas***

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Abe H. Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function. In: Hochachka PW & Mommsen TP editors. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Vol. 5. New York: Elsevier Science Publishers; 1995. p.310-333.
- Abidov M, Crendal F, Grachev S et al. Effect of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola crenulata* (Crassulaceae) roots on ATP content in mitochondria of skeletal muscles. Bull Exp Biol Med 2003; 136: 585-87.
- Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez I, Gou Y, Bennin B, Reichel M, Randall MB. In: lehndorff H & Leiner C editors. Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases. Second edition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.350-51.
- Ackermann D, Timpe O, Poller K. Uber das Anserin, einen neun Bestandteil der Vogelmuskulatur. Z Physiol Chem 1929; 183: 1-10.
- Akhalaya MY, Goncharenko EN, Baizhumanov AA. Effect of ultraviolet B irradiation on immobilization stress-induced changes in the protective systems of C57Bl/6 mice. Bull Exp Biol Med 2006; 141: 180-83.
- Alabovsky VV et al. Effect of histidine containing dipeptides on rat heart under ischemia/reperfusion conditions. Biochemistry 1997; 62: 91-102.
- Andrews, GA. Los desafíos del proceso de envejecimiento en las sociedades de hoy y del futuro. In: Encuentro Latinoamericano y caribeño sobre las personas de Edad, 1999, Santiago. Santiago: CELADE, 2000. p. 247-256.
- Aruoma OL, Laughton MJ, Halliwell B. Carnosine, homocarnosine, and anserine: could they act as antioxidants in vivo? Biochem J 1989; 264: 863-69.
- Ashcroft G, Horan M, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson MWJ. Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. Cell Tissue Res 1997; 290: 581-91.

- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719–27.
- Barber LA, Spandau DF, Rathman SC, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW et al. Expression of the platelet-activating receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J Biol Chem* 1998; 273: 18891-97.
- Bauer EA, Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4132–6.
- Benedetto A. The environment and skin aging. *Clin Dermatol* 1998; 16: 129-39.
- Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondria electron transfer alteration as a factor involved in the brain ageing. *Neurobiol Aging*, 1992; 13: 361-8.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in ageing, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-6.
- Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 239-44.
- Bernstein EF, Brown DB, Urbach F, Forbes D, DeMonaco M, Wu M et al. Ultraviolet Radiation Activates the Human Elastin Promoter in Transgenic Mice: A Novel In Vivo and In Vitro Model Of Cutaneous Photoaging. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 269-73.
- Bernstein EF, Fisher LW, Li K, LeBaron RG, Tan EML, Uitto J. Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin: comparison by immunohistochemical and Northern analysis. *Lab Invest* 1995; 72: 662-69.
- Bernstein EF, Uitto J. The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* 1996; 14: 43-51.

- Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol* 1996; 125: 255.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 64-102.
- Besné I, Descombes E, Breton L. Effect of Age and Anatomical Site on Density of Sensory Innervation of Human Epidermis. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1445-50.
- Bieth J. Elastases: structure, function and pathological role. In: Bieth J, Collin-Lapind GM & Robert L editors. *Frontiers of matrix biology*. Volume 6. Basel: Karger; 1978. p. 1-82.
- Bigliardi PL, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Specific Stimulation of Migration of Human Keratinocytes by  $\mu$ -Opiate Receptor Agonists. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2002; 22: 191-99.
- Bigliardi PL, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M. Different Expression of  $\mu$ -Opiate Receptor in Chronic and Acute Wounds and the Effect of  $\beta$ -Endorphin on Transforming Growth Factor Type II Receptor and Cytokeratin 16 Expression. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 145-152.
- Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL.  $\mu$ -Opiate Receptor and Beta-Endorphin Expression in Nerve Endings and Keratinocytes in Human Skin. *Dermatology* 2004; 209: 183-89.
- Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 728-35.
- Blalock JE. Molecular basis for bidirectional communication between the immune and the neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; 69: 1-32.
- Boh EE, Millikan LE. Vesiculobullous diseases with prominent immunologic features. *JAMA* 1992; 268: 2893-98.

- Boldyrev A, Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul* 1990; 30: 175-94.
- Boldyrev AA et al. Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Molec Neurobiol* 1997; 17: 259-71.
- Boldyrev AA et al. Carnosine prevents neurons from excitotoxic effects of NMDA and kainate. Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia. In: Ito U, Fieschi C, Orzi F, Kuroiwa T & Klatzo I editors. Springer; 1998; p. 320-329.
- Boldyrev AA et al. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int* 1987; 15: 1105-13.
- Boldyrev AA, Gallant SC, Sukhich GT. Carnosine, the protective, anti-aging peptide. *Biosc Reports* 1999; 19: 6.
- Boldyrev AA. Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int J Biochem* 1993; 25: 1101-07.
- Boldyrev AA. Retrospectives and perspectives on the biological activity of histidine contain-ing dipeptides. *Int J Biochem* 1990; 22: 129-32.
- Bologna JL. Aging Skin. *Am J Med* 1995, 98: 99-103.
- Brandner JM, Behne MJ, Huesing B, Moll I. Caffeine improves barrier function in male skin. *Int J Cosm Sci* 2006; 28: 343-47.
- Breathnach AS. Aspects of epidermal ultrastructure. *J Invest Dermatol* 1975; 65: 2-15.
- Brekhman II, Dardymov IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol* 1969; 9: 419-30.
- Brenneisen P, Briviba K, Wenk J, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 515-24.

- Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T et al. Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273: 5279-87.
- Briney C. Industry Growth on the Horizon. *Global Cosm Ind* 2005; 41-42.
- Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 2008; 88: 249-86.
- Brown RP, Gerbarg PL, Ramazanov Z. *Rhodiola rosea*: A Phytomedicinal Overview. *J Am Botan Counc* 2002; 56: 40-52.
- Buffoni F, Pino R, Dal Pozzo A. Effect of tripeptide-copper complexes on the process of skin wound healing and on cultured fibroblasts. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995; 330: 345-60.
- Bulteau AL, Moreau M, Nizard C, Friguet B. Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 1157-70.
- Césarini JP, Michel L, Maurette JM, Adhoute H, Béjot M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: 182-89.
- Conconi M, Friguet B. Proteasome upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Reports* 1997; 24: 45-50.
- Corsini E; Galli CL. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* 2000; 142: 203-11.
- Costin GE; Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 2007; 21: 1-19.
- Crush KG. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp Biochem Physiol* 1970; 34: 3-30.

- Damian D, Halliday GM, Taylor CA, Barnetson RS. Ultraviolet radiation induced suppression of Mantoux reactions in humans. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 824-27.
- Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, Gabrielian E, Wikman G, Wagner H. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue: a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty. *Phytomedicine* 2000; 7: 365-71.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin: tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162: 2163-8.
- Draelos ZD. Botanicals as Topical Agents. *Clin Dermatol* 2001; 19: 474-77.
- Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Dupin AM et al. Carnosine protects Ca-transporting system from factors inducing lipid peroxidation. *Bull Exp Biol Med* 1984; 97: 186-88.
- Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6:1899-904.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 2002; 11: 398-405.
- Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays* 1999; 21: 940-9.
- Epe B. DNA damage induced by photosensitizers and other photoreactive compounds. In: Epe B. DNA and free radicals: Techniques, Mechanisms & Applications. London: OICA Internat. St Lucia; 1998. p.1-20.

- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosm Sci* 2008; 30: 87-95.
- Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosm Sci* 2008; 30: 87-95.
- Faurschou A, Wiegell SR, Wulf HC. Transepidermal water loss after photodynamic therapy, UVB radiation and topical corticosteroid is independent of inflammation. *Skin Res Technol* 2007; 13: 202-20.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 196; 379: 335-39.
- Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337: 1419-29.
- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. In: Fitzpatrick TB. *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw Hill; 1993. p. 157-199.
- Fitzpatrick TB, Pathak M, Parrish JA. Protection of human skin against the effects of the sunburn ultraviolet (290-320nm). In: Fitzpatrick TB. *Sunlight and Man, normal and abnormal photobiological responses*. Tokyo: University of Tokyo Press; 1994. p.751.
- Friedman O. Changes associated with the aging face. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2005; 13: 371-80.
- Friguet B, Szweda LI. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Letters* 1997; 405: 21-5.
- Fukagawa NK. Aging: Is oxidative stress a marker or is it causal? *PSEBM* 1999; 222: 293-98.
- Furmanowa M, Skopinska-Rozewska E, Rogala E, Hartwich M. *Acta Soc Bot Pol* 1998; 67: 69-73.

- Gallant S, Semyonova M, Yuneva M. Carnosine as a Potential Anti-senescence Drug. *Biochemistry* 2000; 65: 866-68.
- Galli E et al. Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr Mol Med* 2003; 3: 127-38.
- Gariballa SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* 2000; 29: 207-10.
- Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF. A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem Photobiol* 1998; 68: 243-56.
- Giacomoni PU, Rein G. A mechanistic model for the aging of human skin. *Micron* 2004; 35: 179-84.
- Gilchrest B A. Biochemical and molecular changes in photodamaged skin. In: Gilchrest B A. *Photodamage*. Cambridge: Blackwell Science; 1995. p.168-84.
- Gilchrest BA. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br Assoc Dermatol* 1996; 135: 867-75.
- Glogau, RG. Cosmetic Dermatology: No Apologies, a Few Regrets. *Arch Dermatol* 1998;134:1204-06.
- Goldsmith LA. Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin. In: Goldsmith LA. *New York: Oxford University Press; 2003. p.12-27.*
- González FJ et al. Participation of T lymphocytes in cutaneous allergic reactions to drugs. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 3-6.
- Grando SA, Horton RM. The keratinocyte cholinergic system with acetylcholine as an epidermal cytotransmitter. *Curr Opin Dermatol* 1997; 4: 462-68.
- Grando SA. Physiology of endocrine skin interrelations. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 981-92.
- Griffiths CEM, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med* 1993; 329: 530-35.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell B & Gutteridge JMC. Second edition. Oxford UK: Clarendon; 1989. p. 115-29.
- Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* 2000; 22: 21-52.
- Hatzis J. The wrinkle and its measurement – a skin surface profilometric method. *Micron* 2004; 35: 201-19.
- Herrmann G, Wlaschek M, Bolsen K, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K. Pathogenic implication of matrix-metalloproteinases (MMPs) and their counteracting inhibitor TIMP-1 in the cutaneous photodamage of human porphyria cutanea tarda (PCT). *J Invest Dermatol* 1996; 107: 398-403.
- Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mechan Age Develop* 2001; 122: 1431-45.
- Hipkiss AR. Carnosine, a protective anti-aging agent? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 863-68.
- Holbrook KA. The biology of human fetal skin at ages related to prenatal diagnosis. *Pediatr Dermatol* 1: 97-111, 1983.
- Holick MF. Vitamin D–new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 619-30.
- Homsy R, Pelletier-Lebon P, Robert L, Hornebeck W. Fibroblast elastase(s). In: Robert L, Hornebeck W, editors. *Elastin and elastases*. Volume 2. New York: CRC Press; 1989. p.57-62.
- Hornebeck W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol* 2003; 51: 569-73.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil dos Idosos Responsáveis por Residências no Brasil 2000. Rio de Janeiro: IBGE; 2002.

- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M et al. UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003; 189: 21-39.
- Isnard N, Péterszegi G, Robert AM, Robert L. Regulation of elastase-type endopeptidase activity, MMP-2 and MMP-9 expression and activation in human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich polysaccharide. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 258-64.
- Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mec Age Develop* 202; 123: 801-10.
- Jurkiewicz BA, Buettner GR. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 918-22.
- Jurkiewicz BA, Buettner GR. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 918-22.
- Kadunce DP, Krueger GG. Pathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin* 1995; 13: 723–37.
- Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6:199-213.
- Kalyanker GD, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related  $\beta$ -alanyl and  $\gamma$ -aminobutyryl peptides. *J Biol Chem* 1959; 234: 3210-18.
- Kanta SS et al. Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 278-82.
- Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL, Tobin DJ.  $\beta$ -Endorphin as a Regulator of Human Hair Follicle Melanocyte Biology. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 184-95
- Keller SJ, Levin RH, Fang J. Isolation and characterization of a tissue respiratory factor from bakersí yeast. *J Cell Biol* 1991; 304: 21.
- Kelly GS. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. *Altern Med Rev* 2001; 6: 293-302.

- Keogh BP, Allen RG, Pignolo R, Horton J, Tresini M, Cristofalo J. Expression of hydrogen peroxide and glutathione metabolizing enzymes in human skin fibroblasts derived from donors of different ages. *J Cell Physiol* 1996; 167: 512-22.
- Khorrarnizadeh M, Tredget E et al. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 1999; 194: 99-108.
- Kligman AM, Sadiq I, Zhen Y, Crosby M. Experimental studies on the nature of sensitive skin. *Skin Res Technol* 2006; 12: 217-22.
- Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM. The contributions of UVA and UVB to connective tissue damage in hairless mice. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 272-76.
- Kligman LH. Intensification of ultraviolet-induced dermal damage by infrared radiation. *Arch Dermatol Res* 1982; 272: 229-38.
- Koehler MJ, König K, Elsner P, Bückle R, Kaatz M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Optics Letters* 2006; 31: 2879-81.
- Kohen R, Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 2000; 148: 149-57.
- Kohen RY et al. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscles and brain. *Proc Nat Acad Sci* 1988; 85: 3175-79.
- Kondo S. The roles of cytokines in photoaging. *J Dermatol Sci* 2000; 23: 30-6.
- Kragballe K, Fogh K, Larsen CG. Vitamin D: actions and applications in dermatology. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 1-114.
- Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2007; 18-36.

- Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci* 2000; 23: 22-26.
- Kupper TS; Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature* 2004; 4: 211-22.
- Kurban RS, Bhawan J. Histologic changes in skin associated with aging. *J Dermatol Surg Oncol* 1990; 16: 908-14.
- Kurkin VA, Zapisochnaya GG, Dubichev AG, Vorontsov ED, Aleksandrova IV, Panova RV. *Khim Prir Soedin* 1991; 4: 481-90.
- Kvam E, Tyrrell RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2379-84.
- Labat-Robert J, Fourtanier A, Boyer-Lafargue B, Robert L. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. *J Photochem Photobiol* 2000; 57: 113-118.
- Lahmann C, Bergemann J, Harrison G, Young AR. Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* 2001; 357: 935-6.
- Laidlaw S, Kopple JD. Newer concepts of the indispensable amino acids. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 593-605.
- Lazarova MB, Petkov VD, Markovska VL, Petrok VV, Mosharrof A. Effects of meclofenoxate and extr. *Rhodiola roseae* L. on electroconvulsive shock-impaired learning and memory in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 198; 8(9): 547-552.
- Lavker RM, Gerberick GF, Veres D, Irwin CJ, Kaidbey KH. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 53-62.

- Lee HK, Seo YK, Baek JH, Koh JS. Comparison between ultrasonography (Dermascan C version 3) and transparency profilometry (Skin Visiometer SV600). *Skin Res Technol* 2008; 14: 8-12.
- Lowe NJ, Shaath NA, Pathak MA. Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects. In: Lowe NJ. New York: Marcel Dekker. Second edition; 1997. p.792.
- Luger T, Paus R, Slominski A, Lipton J. Cutaneous neuromodulation: the proopiomelanocortin system. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 1-479.
- Luger TA, Lotti T. Neuropeptides: role in inflammatory skin diseases. *J EAV* 1998; 10: 207-11.
- Luger TA, Scholzen T, Grabbe S: The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 87-93.
- Luger TA. Immunomodulation by UV light: role of neuropeptides. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 198-99.
- Luger TA. Neuromediators – a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 87-93.
- Lupo MP, Cole AL. Cosmeceutical peptides. *Dermatol Ther* 2007; 20: 343-49.
- Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 592-99.
- Majewska A, Grazyna H, Mirosława F, Natalia U, Agnieszka P, Alicja G et al. Antiproliferative and antimetabolic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 43-52.
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in culture of chick astrocytes and neurons:

- evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 1994; 62: 45-53.
- Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 474-79.
- Maslova LV, Kondratev BI, Maslov LN, Lishmanov IB. The cardioprotective and antiadrenergic activity of an extract of *Rhodiola rosea* in stress. *Eksp Klin Farmakol* 1994; 57: 61-3.
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195: 298-308.
- Mattila L, Airola K, Ahonen M, Hietarinta M, Black C, Saarialho-Kere U, et al. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 416-21.
- Mauch C, Herron GS, Bauer EA. Regulation of connective tissue turnover by matrix metalloproteinases. In: Freinkel RK and Woodley D. *The Biology of the Skin*. New York: The Parthenon Publishing Group Inc; 2001. p. 353-64.
- Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993; 53: 288-95.
- McCallion R, Po LW. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther* 1993; 18: 15-32.
- Mccullough JL, Kelly KM. Prevention and Treatment of Skin Aging. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 323-31.
- McDonagh AJ, Messenger AG. The pathogenesis of alopecia areata. *Dermatol Clin* 1996; 14: 661-70.
- McKenzie RC, Sauder DN. The role of keratinocytes cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 1055-75.

- Millikan LE. Cosmetology, Cosmetics, Cosmeceuticals: Definitions and Regulations. *Clin Dermatol* 2001; 19: 371-74.
- Milstone LM, Edelson RL. Endocrine, metabolic and immunologic functions of keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 548: 1-366.
- Misery L. Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol* 1997; 137: 843-50.
- Misery L. The neuro-immuno-cutaneous system and ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 78-81.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274-78.
- Nishigori C, Hattori Y, Arima Y, Miyachi Y. Photoaging and oxidative stress. *Exp Dermatol* 2003; 12: 18-21.
- Nissen JB, Avrach WW, Hansen ES, Stengaard-Pedersen K, Kragballe K.: Decrease in Enkephalin Levels in Psoriatic Lesions after Calcipotriol and Mometasone Furoate Treatment. *Dermatology* 1999; 198: 11-17.
- Nissen JB, Avrach WW, Hansen ES, Stengaard-Pedersen K, Kragballe K. Increased levels of enkephalin following natural sunlight (combined with salt water bathing at the Dead Sea) and ultraviolet A irradiation. *Br J Dermatol* 1998; 139: 1012-19.
- Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall MJ. Glutathione in sickness and in health. *Lancet* 1998; 351: 645-6.
- Ohsugi M et al. Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 111-19.
- Pageon H, Asselineau D. An in Vitro Approach to the Chronological Aging of Skin by Glycation of the Collagen - The Biological Effect of Glycation on the Reconstructed Skin Model. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 529-32.
- Panerai AE, Sacerdote P.  $\beta$ -endorphin in the immune system: a role at last? *Immunol Today* 1997; 18: 317-19.

- Panosian A, Wikman G, Wagner H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine* 1999; 6: 287-300.
- Paus R, Theoharides TC, Arck PC. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends Immunol* 2006; 27:1-18.
- Pennisi E. Tracing molecules that make the brain-body connection. *Science* 1997; 275: 930-31
- Petkov VD et al. Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rosea* L. roots on learning and memory. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1986; 12: 3-16.
- Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996; 76: 127-73.
- Pickart L et al. Growth-modulating plasma tripeptide may function by facilitating copper uptake into cells. *Nature* 1980; 288: 715-17.
- Pincelli C, Bonté F. The 'beauty' of skin neurobiology. *J Cosm Dermatol* 2004; 2: 195-98.
- Pincemail J, Heusele C, Bonté F, Limet R, Defraigne JO. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act Med Int* 2001; 4: 18-23.
- Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83: 358-66.
- Postlethwaite AE, Raghov R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol* 1988; 106:311-18.
- Pourzand C, Tyrrell RM. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 1999; 70: 380-90.

- Quatresooz P, Pierard-Franchimont C, Kharf M, Rustom KA, Chian CA. Skin in maturity: the endocrine and neuroendocrine Pathways. *Int J Cosm Sci* 2007; 29: 1-6.
- Quinn PJ, Bilyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, function and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1990; 13: 379-84.
- Ramos-e-Silva, M ; Carneiro, S. . Cosmetics for the elderly. *Clin Dermatol* 2001; 19: 413-423.
- Ramos-e-Silva M, Carneiro SCS, Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. *J Cosm Dermatol* 2007; 6: 40-50.
- Rattan SIS. Synthesis, modifications and turnover of proteins during ageing. *Exp Gerontol* 1996; 31: 33-47.
- Rego AC, Oliveira CR. Dual effect of lipid peroxidation on the membrane order of retinal cells in culture. *Arch Biochem Biophys* 1995; 321: 127-36.
- Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH et al. Aging and Photoaging-Dependent Changes of Enzymic and Nonenzymic Antioxidants in the Epidermis and Dermis of Human Skin In Vivo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1212-17.
- Rijken F, Bruijnzeel PLB, van Weelden H, Kiekens RCM. Responses of black and white skin to solar-simulating radiation: differences in DNA photodamage, infiltrating neutrophils, proteolytic enzymes induced, keratinocyte activation, and IL-10 expression. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1448-55.
- Robert L, Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Robert AM. Effect of L-fucose and fucose-rich polysaccharides on elastin biosynthesis, in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 123-28.
- Robert L, Fodil-Bourahla I, Bizbiz L, Robert AM. Effects of L-fucose and fucose-rich oligo- and polysaccharides (FROP-s) on collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. Modulation of the effect of retinol, ascorbate and alfa-tocopherol. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 65-70.

- Robert L. Les protéases de type élastases. *Pathol Biol* 1988; 36: 1101-7.
- Robinson MK. Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Cont Derm* 1999; 41: 65-79.
- Rocquet C, Bonté F. Molecular aspects of skin ageing - recent data. *Dermatovenerol* 2002; 11: 1-35.
- Rona C, Vailati F, Berardesca E. The cosmetic treatment of wrinkles. *J Cosm Dermatol* 2004; 3: 26-34.
- Roskos KV, Guy RH. Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age. *Pharm Res* 1989; 6: 949-53.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiol Rev* 2006; 86: 1309-79.
- Sander CS, Chang H, Salzman S, Müller CSL, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P et al. Photoageing is associated with protein oxidation in human skin in vivo, *J Invest Dermatol*, 2002; 118: 618-25.
- Sano I. Simple peptides in brain. *Int Rev Neurobiol* 1970; 12: 235-63.
- Saratikov AS, Krasnov EA. Chapter III: Stimulative properties of *Rhodiola rosea*. In: Saratikov AS, Krasnov EA editors. *Rhodiola rosea* is a valuable medicinal plant (Golden Root). Tomsk, Russia: Tomsk State University; 1987. p. 69-90.
- Schallreuter KU, Lemke KR, Pittelkow MR, Wood JM, Korner C, Malik R. Catecholamines in human keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 953-57.
- Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke R, Rodl W et al. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994; 263: 1444-46.

- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 1993; 331: 304-6.
- Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: 228-34.
- Schmid D, Muggli R, Züllli F. Collagen glycation and skin aging. *Cosm Toilett* 2002; 118-24.
- Schmid D, Züllli F. Role of Beta-Endorphin in the Skin. *Int J App Sci* 2005; 31: 2-4.
- Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 1998; 7: 81-96.
- Scholzen TE, Brzoska T, Kalden DH, O'Reilly F, Armstrong CA, Luger TA et al. Effect of Ultraviolet Light on the Release of Neuropeptides and Neuroendocrine Hormones in the Skin: Mediators of Photodermatitis and Cutaneous Inflammation. *J Inv Dermatol Symp Proced* 1999; 4: 55-60.
- Schwarz T. Photoimmunosuppression. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18: 141-45.
- Sellheyer K. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cut Pathol* 2003; 30: 123-27.
- Shapiro S. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 602-8.
- Shevtsov VA et al. A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work. *Phytomedicine* 2003; 10: 95-105.

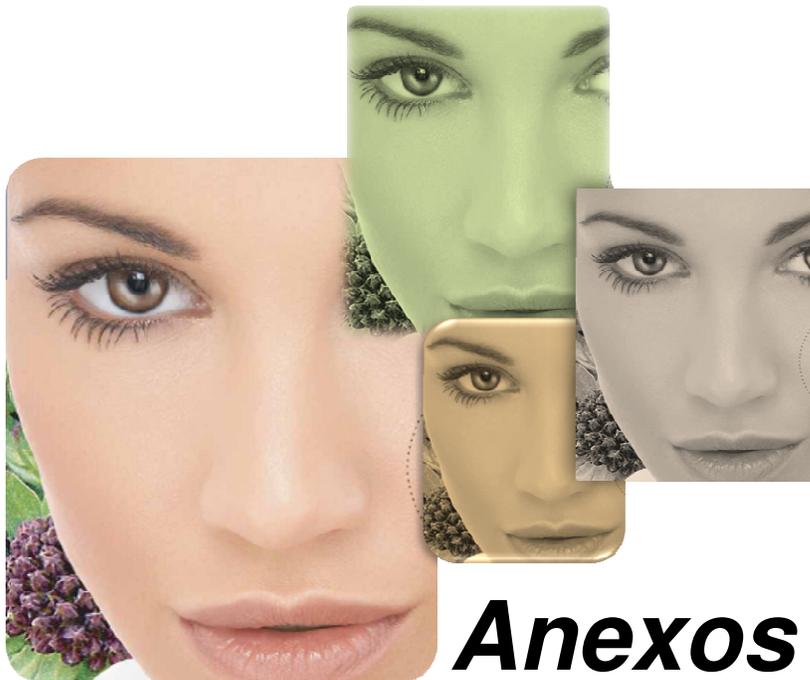
- Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 122-4.
- Simpson J, Weiner, eds. *Oxford English Dictionary*. Second edition. Oxford, England: oxford University Press; 1989.
- Skulachev VP. Membrane-link energy buffering as the biological function of Na/K-gradient. *FEBS Lett* 1978; 87: 171-79.
- Slominski A, Ermak G, Mazurkiewicz JE, Baker J, Wortsman J. Characterization of corticotropin releasing hormone (CRH) in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1020-24.
- Slominski A, Mihm MC. Potential mechanism of skin response to stress. *Int J Dermatol* 1996; 35: 849-51.
- Slominski A, Paus R, Schaderdorf D. Melanocytes are sensory and regulatory cells in the epidermis. *J Theor Biol* 1993; 164: 103-20.
- Slominski A, Paus R. Are L-tyrosine and L-dopa hormone-like bioregulators? *J Theor Biol* 1990; 143: 123-38.
- Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol* 1998; 16: 503-15.
- Slominski A, Roloff B, Curry J, Dahiya M, Szczesniewski A, Wortsman J. The skin produces urocortin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 815-23.
- Slominski A, Wortsman J, Paus R, Luger T, Salomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 2000; 80: 979-1020.
- Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the Skin. *Endocrine Rev* 2000; 21: 457-87.
- Soter NA. Sunburn and suntan: immediate manifestations of photodamage. In: Gilchrest BA editor. *Photodamage*. Cambridge: Blackwell Science; 1995. p. 12-25.

- Spasov AA, Mandrikov VB, Mironova IA. The effect of the preparation rhodiosin on the psychophysiological and physical adaptation of students to an academic load. *Eksp Klin Farmakol* 2000; 63: 76-8.
- Spasov AA, Wikman G, Mandrikov VB et al. A double-blind, placebo-controlled pilot study of the stimulating and adaptogenic effect of *Rhodiola rosea* SHR-5 extract on the fatigue of students caused by stress during an examination period with a repeated low-dose regimen. *Phytomedicine* 2000; 7: 85-9.
- Sudel KM et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 581-87.
- Teofoli P, Motoki K, Lotti TM, Uitto J, Mauviel A. Proopiomelanocortin (POMC) gene expression by normal skin and keloid fibroblasts in culture: modulation by cytokines. *Exp Dermatol* 1997; 6: 111-15.
- Terui T, Tagami H. Mediators of inflammation involved in UVB erythema. *J Dermatol Sci* 2000; 23: 1-5.
- Tolonen A, Hohtola A, Jalonen J. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization techniques in the analysis of the main constituents from *Rhodiola rosea* extracts by liquid chromatography/mass spectroscopy. *J Mass Spectrom* 2003a; 3: 845-53.
- Tolonen A, Pakonen M, Hohtola A, Jalonen J. Phenylpropanoid Glycosides from *Rhodiola rosea*. *Chem Pharm Bull* 2003b; 51: 467-70.
- Toyoda M, Hara M, Bhawan J. Epidermal innervation correlates with severity of photodamage. *Exp Dermatol* 1996; 5: 260-66.
- Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 573-7.
- Tzaphlidou, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron* 2004; 35: 173-77.

- Udintsev SN, Schakhov VP. Decrease of cyclophosphamide haematotoxicity by *Rhodiola rosea* root extract in mice with Ehrlich and Lewis transplantable tumors. Eur J Cancer 1991; 27: 1182.
- Uitto J, Bernstein E F. Molecular mechanisms of cutaneous aging: Connective tissue alterations in the dermis. J Invest Dermatol Symp Proc 1998; 3: 41-44.
- Uitto J, Fazio MJ, Olsen DR. Molecular mechanisms of cutaneous ageing: age associated connective tissue alterations in the dermis. J Am Acad Dermatol 1989; 21: 614-22.
- Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. Drugs Dermatol 2008; 7: 12-6.
- Varani J, Spearman D, Perone P, Fligel SEG, Datta SC, Wang ZQ et al. Inhibition of Type I Procollagen Synthesis by Damaged Collagen in Photoaged Skin and by Collagenase-Degraded Collagen *in Vitro* Am J Pathol 2001; 158: 931-39.
- Vinson JA, Howard TB. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. Nat Biochem 1996; 7: 659-63.
- Walker TB, Robergs RA. Does *Rhodiola Rosea* Possess Ergogenic Properties? Int J Sport Nutr Exerc Metabol 2006; 16: 305-15.
- Wallace DC, Melov S. Radicals aging, Nature Genetics, 1998; 19: 105-10.
- Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. J Am Acad Dermatol 2001; 44: 767-74.
- Wang X, BI Z. UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1 $\alpha$  indirectly increase MAP Kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts. Chin Med J 2006; 199: 827-31.

- Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharffetter-Kochanek K. Stable overexpressing of man ganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 25869-76.
- Wentzell JM. Sunscreens: the ounce of prevention. *Am Fam Physician* 1996; 53: 1713-19.
- West, MD. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol* 1994; 130: 87-95.
- William IR, Kupper TS. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 1996; 58: 1485-1507.
- Winnick RE, Winnick T. Carnosine – anserine synthetase of muscle. *Biochim Biophys Acta* 1959; 31: 47-55.
- Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase: MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 550-6.
- Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 2001; 63: 41-51.
- Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol* 2007; 157: 874-87.
- Yaar M, Gilchrist BA. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 583-91.
- Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J Dermatol Sci* 2001; 27: 1-4.

- Yasui H, Sakurai H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 131-36.
- Ye J, Garg A, Calhoun C, Feingold KR, Elias PM, Ghadially R. Alterations in cytokine regulation in aged epidermis: implications for permeability barrier homeostasis and inflammation. I. IL-1 gene family. *Exp Dermatol* 2002; 11: 209-16.
- Young-Min SA, Beeton C, Laughton R, Plumpton T, Bartram S, Murphy G et al. Serum TIMP-1, TIMP-2, and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon, and in normal controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 846-51.
- Yousef GG, Grace MH, Cheng DM, Belolipov IV, Raskin I, Lila MA. Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. *Phytochemistry* 2006; 67: 2380-91.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163-76.
- Zhang G, Moore DJ, Mendelsohn R, Flach CR. Vibrational Microspectroscopy and Imaging of Molecular Composition and Structure During Human Corneocyte Maturation. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1088-94.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M, Bruckner-Tuderman L. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 1994; 124: 817-25.



**Anexos**

**Tabela 17.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de IL-1 $\alpha$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	13,60	12,38	15,74	21,11	18,61	10,02	6,44
2	12,16	13,60	17,53	22,19	14,67	7,87	5,01
3	11,09	11,81	18,25	21,83	16,10	8,59	5,72
4	11,81	11,09	17,89	22,19	15,74	7,51	6,80
5	13,95	13,24	18,97	22,90	15,39	8,23	4,65
6	11,45	11,81	16,46	21,11	14,31	9,30	4,65
<b>Média</b>	12,34	12,32	17,47	21,88	15,80	8,58	5,54
<b>D.P.</b>	1,17	0,95	1,18	0,69	1,52	0,93	0,92

**Tabela 18.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de IL-1 $\alpha$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	12,38	14,31	14,67	8,23	13,24	12,16	10,37	11,81	11,09	12,88	12,88	10,37	11,81
2	13,60	12,16	10,37	11,09	12,88	11,81	9,30	11,09	12,88	12,16	10,02	11,09	13,60
3	11,81	11,81	12,16	10,37	11,81	10,73	8,94	9,66	11,81	10,37	11,81	10,02	11,09
4	11,09	11,09	11,09	10,37	12,16	10,37	11,09	10,02	12,88	9,66	10,37	9,66	11,81
5	13,24	10,73	11,81	11,09	12,88	9,30	11,45	9,66	11,45	11,81	11,09	11,09	12,88
6	11,81	10,73	10,73	14,31	13,24	10,73	10,73	12,88	11,45	11,09	11,09	13,95	12,52
<b>Média</b>	12,32	11,80	11,81	10,91	12,70	10,85	10,31	10,85	11,92	11,32	11,21	11,03	12,28
<b>D.P.</b>	0,95	1,35	1,55	1,97	0,59	1,03	0,99	1,31	0,77	1,19	1,03	1,54	0,89
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	6,44	13,60	13,60	7,87	7,51	12,52	10,37	10,37	7,87	12,52	11,45	8,59	7,51
2	5,01	11,09	14,67	8,94	8,23	11,81	9,66	10,37	7,15	13,60	12,88	9,30	6,44
3	5,72	11,09	12,88	9,66	7,15	12,16	10,37	8,59	7,51	14,67	11,45	8,94	6,80
4	6,80	13,95	11,81	10,37	6,80	14,67	11,09	9,30	7,15	11,45	13,60	8,59	7,15
5	4,65	12,16	11,09	8,59	8,23	11,81	10,73	10,02	8,23	11,09	10,00	8,23	6,08
6	4,65	12,52	12,52	9,30	7,87	13,24	10,02	9,66	6,80	10,73	8,59	9,30	6,80
<b>Média</b>	5,54	12,40	12,76	9,12	7,63	12,70	10,37	9,71	7,45	12,34	11,32	8,82	6,79
<b>D.P.</b>	0,92	1,21	1,27	0,86	0,98	1,10	0,50	0,70	0,52	1,55	1,83	0,43	0,50

**Tabela 19.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	964,56	972,01	1675,43	1651,85	1238,73	833,68	627,06
2	1020,39	991,01	1681,63	1644,41	1223,85	838,02	681,08
3	1014,19	1027,83	1695,90	1656,20	1210,82	867,79	642,01
4	956,50	955,88	1674,18	1613,40	1199,66	809,49	645,11
5	988,75	983,79	1663,02	1640,07	1185,39	813,83	681,08
6	985,65	963,32	1715,74	1439,71	1183,53	816,93	673,64
<b>Média</b>	988,34	982,44	1684,31	1607,60	1206,99	829,95	658,33
<b>D.P.</b>	25,62	25,81	18,78	83,60	21,80	21,72	23,18

**Tabela 20.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	972,01	988,13	950,29	936,03	935,41	964,56	993,10	999,92	929,82	937,89	956,50	931,69	939,75
2	991,01	936,03	957,12	988,13	932,93	985,65	976,35	935,41	997,44	993,10	945,33	935,41	1005,50
3	1027,83	958,36	954,64	985,65	963,32	935,41	939,13	964,56	975,73	996,82	940,00	936,03	985,03
4	955,88	944,71	930,45	978,83	954,02	978,21	936,03	963,94	976,97	988,75	939,13	945,33	981,93
5	983,79	994,96	953,40	971,38	990,61	975,73	944,09	954,02	939,75	939,13	989,37	938,51	956,50
6	963,32	952,78	974,49	959,60	976,97	951,54	953,40	993,10	947,81	947,81	935,41	990,61	948,43
<b>Média</b>	982,44	962,49	953,39	969,93	958,87	965,18	957,01	968,49	961,25	967,25	950,95	946,26	969,52
<b>D.P.</b>	25,81	23,83	14,11	19,57	22,81	18,83	22,87	24,22	26,06	28,41	20,19	22,19	25,25
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	627,06	951,54	923,62	860,35	746,84	755,52	691,01	681,08	627,12	916,18	950,91	879,58	817,55
2	681,08	950,91	928,58	870,90	728,32	805,76	736,29	647,59	618,43	935,41	974,49	921,14	860,35
3	642,01	947,19	959,60	829,96	693,49	798,32	691,63	630,84	672,40	951,54	929,20	923,00	867,79
4	645,11	1003,64	989,99	811,97	727,61	808,25	743,11	640,76	628,98	942,23	923,62	888,26	828,10
5	681,08	960,22	986,89	858,49	702,79	816,93	740,01	637,04	680,46	944,09	940,99	892,61	805,76
6	673,64	967,04	975,11	826,23	743,73	789,64	735,05	673,64	686,05	939,13	955,26	903,77	800,80
<b>Média</b>	658,33	963,42	960,63	842,98	723,79	795,73	722,85	651,82	652,24	938,09	945,74	901,39	830,05
<b>D.P.</b>	23,18	20,98	28,84	23,38	21,55	21,76	24,58	20,64	30,53	12,02	18,59	17,82	28,10

**Tabela 21.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de IFN- $\gamma$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	130,35	125,78	221,83	242,41	192,10	109,77	70,89
2	128,06	132,64	212,68	237,84	182,95	96,05	77,75
3	125,78	132,64	217,25	233,26	166,94	102,91	64,03
4	134,92	134,92	210,39	244,70	180,66	100,62	66,32
5	132,64	134,92	208,11	249,27	173,80	100,62	75,46
6	130,35	128,06	205,82	253,84	176,09	128,06	82,32
<b>Média</b>	130,35	131,49	212,68	243,55	178,75	104,43	72,79
<b>D.P.</b>	3,23	3,75	5,96	7,47	8,60	7,46	6,99

**Tabela 22.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de IFN- $\gamma$  (pg/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	125,78	137,16	134,88	137,16	132,59	114,30	112,02	125,73	123,45	114,30	148,59	125,73	125,73
2	132,64	114,30	128,02	148,59	134,88	137,16	141,74	134,88	114,00	128,02	123,45	144,02	132,59
3	132,64	128,02	139,45	134,88	137,16	130,30	144,02	134,88	139,45	123,45	139,45	132,59	148,59
4	134,92	134,88	144,02	128,02	134,88	125,73	109,73	139,45	118,87	130,30	141,74	139,45	132,59
5	134,92	118,87	137,16	123,45	118,87	125,73	139,45	144,02	137,16	137,16	134,88	125,73	130,30
6	128,06	130,30	114,30	125,73	137,16	141,74	121,16	114,30	132,59	132,59	132,59	141,74	139,45
<b>Média</b>	131,49	127,25	132,97	132,99	132,59	129,16	128,02	132,21	127,58	127,63	136,78	134,87	134,88
<b>D.P.</b>	3,75	8,99	10,56	9,30	6,93	9,67	15,57	10,66	10,34	7,97	8,60	8,05	8,00
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	70,89	139,45	130,30	112,02	98,30	100,58	93,73	82,30	70,87	116,59	116,59	109,73	89,15
2	77,75	123,45	137,16	107,44	96,01	109,73	91,44	80,01	75,44	125,73	123,45	100,58	91,44
3	64,03	132,59	134,88	100,58	98,30	112,02	89,15	75,44	84,58	134,88	128,02	107,44	102,87
4	66,32	128,02	114,30	105,16	91,44	98,30	94,58	75,44	78,30	123,45	114,30	98,30	82,30
5	75,46	125,73	116,59	102,87	93,73	102,87	82,30	82,30	91,44	144,02	116,59	105,16	86,87
6	82,32	132,59	121,16	107,44	86,87	107,44	86,87	70,87	82,30	137,16	112,02	98,30	89,15
<b>Média</b>	72,79	130,30	125,73	105,91	94,10	105,15	89,67	77,72	80,48	130,30	118,49	103,25	90,29
<b>D.P.</b>	6,99	5,78	9,69	4,00	4,43	5,41	4,61	4,57	7,24	10,12	6,03	4,88	6,89

**Tabela 23.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de  $\beta$ -endorfina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	60,46	62,35	127,54	91,01	76,84	49,12	42,83
2	61,41	60,15	121,56	88,81	75,58	45,66	44,09
3	62,35	62,35	122,82	94,79	73,03	47,23	41,57
4	62,67	63,93	123,13	92,90	73,69	46,92	41,25
5	59,83	59,83	119,35	90,69	72,43	47,55	41,88
6	60,15	67,39	118,41	94,47	75,89	48,18	43,77
<b>Média</b>	61,34	62,66	122,13	92,11	74,57	47,44	42,56
<b>D.P.</b>	2,14	2,77	3,24	2,34	1,76	1,17	1,18

**Tabela 24.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de  $\beta$ -endorfina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	62,35	213,52	197,14	169,43	134,79	125,65	121,87	129,43	121,87	210,05	197,14	165,65	135,73
2	60,15	209,42	190,84	170,37	138,56	122,82	123,13	124,08	126,60	198,72	190,84	167,22	136,04
3	62,35	201,87	193,99	163,13	131,64	127,86	124,71	125,02	123,45	203,12	193,99	163,76	134,16
4	63,93	199,66	193,68	165,65	130,69	126,91	128,17	124,39	125,65	196,20	193,68	163,44	129,75
5	59,83	194,94	193,83	164,07	126,28	125,97	127,23	125,34	126,28	185,17	193,83	161,87	128,49
6	67,39	196,83	190,53	154,39	131,01	123,76	124,71	125,65	124,39	187,69	190,53	164,39	135,73
<b>Média</b>	62,66	202,70	193,33	166,17	132,16	125,49	124,97	125,65	124,70	196,82	193,83	164,38	133,31
<b>D.P.</b>	2,77	7,30	2,42	3,01	4,15	1,89	2,38	1,94	1,82	9,35	2,82	1,85	3,34
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	42,83	153,68	138,88	96,05	95,73	41,88	45,66	44,72	43,46	147,07	135,41	96,05	94,47
2	44,09	150,22	136,99	97,94	97,31	43,46	42,83	43,77	44,83	150,22	127,86	99,83	91,32
3	41,57	148,96	133,21	105,18	90,06	40,62	41,25	43,46	41,25	148,33	134,16	98,25	90,69
4	41,25	151,16	135,10	97,94	71,48	41,25	39,36	43,46	46,60	142,34	136,36	96,36	92,58
5	41,88	145,49	135,10	100,46	88,49	39,68	42,83	41,25	42,83	139,51	130,06	99,51	91,64
6	43,77	145,18	135,73	102,98	93,53	41,57	40,94	42,83	45,66	148,01	133,53	100,44	91,01
<b>Média</b>	42,56	149,11	135,83	100,09	89,43	41,41	42,14	43,24	43,77	145,91	132,89	98,41	91,95
<b>D.P.</b>	1,18	3,31	1,92	3,46	9,41	1,27	2,15	1,15	1,99	4,09	3,27	1,85	1,39

**Tabela 25.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de encefalina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	3,27	3,35	10,26	6,860	3,40	2,40	10,26
2	3,52	3,62	9,93	6,910	3,37	2,49	9,93
3	3,42	3,35	10,00	6,930	3,34	2,39	10,00
4	3,35	3,44	10,04	7,000	3,47	2,35	10,04
5	3,29	3,22	9,81	6,980	3,45	2,30	9,81
6	3,25	3,23	9,76	7,070	3,42	2,44	9,76
<b>Média</b>	3,35	3,37	9,96	6,96	3,41	2,39	1,86
<b>D.P.</b>	0,10	0,15	0,18	0,08	0,05	0,07	0,06

**Tabela 26.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de encefalina (ng/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	3,35	34,08	23,59	15,48	7,71	3,61	3,37	3,39	3,40	33,08	23,40	16,79	7,03
2	3,62	33,80	23,93	15,36	8,20	3,49	3,34	3,44	3,62	28,76	22,55	15,26	7,53
3	3,35	33,90	23,38	15,70	8,07	3,35	3,52	3,42	3,84	28,45	22,89	15,60	7,22
4	3,44	34,15	24,13	15,02	8,36	3,32	3,61	3,68	3,40	33,25	24,08	15,09	7,30
5	3,22	34,37	23,87	14,99	7,64	3,34	3,66	3,62	3,37	28,84	22,38	14,92	6,81
6	3,23	33,88	23,98	15,31	7,24	3,47	3,54	3,66	3,32	28,93	21,53	15,43	7,05
<b>Média</b>	3,36	34,03	23,81	15,31	7,87	3,43	3,5	3,53	3,49	30,21	22,8	15,51	7,15
<b>D.P.</b>	0,14	0,21	0,27	0,27	0,41	0,11	0,12	0,13	0,19	2,28	0,87	0,66	0,24
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	1,78	21,72	15,28	11,83	3,62	2,61	2,30	1,98	1,83	20,35	15,12	12,10	3,62
2	1,89	21,65	15,24	11,78	3,79	2,62	2,25	1,89	1,74	21,36	14,00	11,95	3,79
3	1,93	21,40	14,94	12,07	4,08	2,74	2,12	1,93	1,78	22,21	13,78	11,90	4,08
4	1,84	21,18	13,82	12,07	3,69	2,56	2,13	1,95	1,84	23,06	13,63	12,07	3,69
5	1,88	21,30	14,09	11,95	3,88	2,57	2,17	1,83	1,88	23,06	13,75	12,02	3,88
6	1,81	21,25	14,16	12,19	3,96	2,66	2,15	1,88	1,81	23,33	13,82	12,02	3,96
<b>Média</b>	1,85	21,41	14,58	11,98	3,83	2,62	2,18	1,91	1,81	22,22	14,01	12,01	3,83
<b>D.P.</b>	0,05	0,22	0,64	0,15	0,17	0,06	0,07	0,05	0,04	1,17	0,55	0,07	0,17

**Tabela 27.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de colágeno (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	75,45	76,55	67,18	57,270	45,15	28,08	21,47
2	77,65	79,30	64,43	51,210	44,60	26,43	18,17
3	79,85	82,05	68,29	53,970	45,15	27,53	19,27
4	81,50	79,85	65,53	49,560	48,46	24,23	18,72
5	80,95	78,75	62,78	53,420	46,81	25,33	21,47
6	76,55	76,00	60,02	52,310	47,91	26,43	20,37
<b>Média</b>	78,65	78,75	64,7	52,95	46,34	26,33	19,91
<b>D.P.</b>	2,47	2,22	3,01	2,64	1,61	1,4	1,4

**Tabela 28.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de colágeno (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	76,55	108,49	92,52	89,76	91,97	94,72	103,53	100,78	91,97	122,26	111,79	109,04	99,68
2	79,30	103,53	94,72	89,21	95,27	96,37	105,74	100,23	95,27	128,32	112,89	108,49	104,08
3	82,05	102,98	93,62	88,66	94,72	95,27	105,18	99,68	94,72	122,81	114,00	108,49	103,53
4	79,85	99,13	94,17	93,07	93,07	95,27	102,43	99,58	93,07	124,46	110,69	106,84	100,78
5	78,75	100,78	94,72	91,97	91,97	98,02	103,53	99,58	91,97	131,62	110,69	106,29	100,23
6	76,00	107,39	95,27	86,46	91,42	98,58	104,08	99,68	91,42	125,56	113,45	107,94	99,68
<b>Média</b>	78,75	103,71	94,17	89,85	93,07	115,74	104,08	99,92	93,07	125,83	112,25	107,84	101,33
<b>D.P.</b>	2,22	3,64	0,98	2,37	1,59	2,72	1,2	0,48	1,59	3,56	1,41	1,06	1,96
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	21,47	95,27	85,36	83,16	87,01	106,84	96,92	94,17	87,01	115,10	104,08	101,88	94,72
2	18,17	93,07	85,91	78,75	87,56	104,08	96,37	89,76	87,56	112,89	105,74	98,58	96,37
3	19,27	94,17	87,01	88,66	88,66	104,08	96,92	88,66	88,66	111,79	102,98	96,92	95,27
4	18,72	96,37	84,26	91,42	87,01	107,94	94,72	91,42	87,01	116,20	106,29	99,68	95,27
5	21,47	94,17	89,76	91,97	89,76	105,18	99,68	91,97	89,76	114,00	107,94	100,23	98,02
6	20,37	96,37	84,81	90,87	84,81	105,74	94,72	90,87	84,81	113,45	107,39	99,68	98,58
<b>Média</b>	19,91	94,9	86,18	87,47	87,46	105,64	96,55	91,14	87,46	113,9	105,73	99,49	96,37
<b>D.P.</b>	1,4	1,33	1,99	5,35	1,68	1,53	1,83	1,9	1,68	1,57	1,91	1,65	1,59

**Tabela 29.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de elastina (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	32,53	33,52	27,97	24,20	19,63	12,10	7,73
2	33,52	32,33	26,18	23,60	16,86	11,90	6,54
3	33,92	31,93	26,77	22,61	19,44	13,68	6,74
4	34,31	34,71	26,97	22,01	18,05	11,50	6,34
5	35,50	35,11	27,37	22,41	17,65	12,49	6,54
6	34,71	34,31	25,38	23,01	17,45	12,10	7,33
<b>Média</b>	34,08	33,65	26,77	22,97	18,18	12,29	6,87
<b>D.P.</b>	1,02	1,29	0,9	0,8	0,11	0,75	0,54

**Tabela 30.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de elastina (mg/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	76,55	108,49	92,52	89,76	91,97	94,72	103,53	100,78	91,97	122,26	111,79	109,04	99,68
2	79,30	103,53	94,72	89,21	95,27	96,37	105,74	100,23	95,27	128,32	112,89	108,49	104,08
3	82,05	102,98	93,62	88,66	94,72	95,27	105,18	99,68	94,72	122,81	114,00	108,49	103,53
4	79,85	99,13	94,17	93,07	93,07	95,27	102,43	99,58	93,07	124,46	110,69	106,84	100,78
5	78,75	100,78	94,72	91,97	91,97	98,02	103,53	99,58	91,97	131,62	110,69	106,29	100,23
6	76,00	107,39	95,27	86,46	91,42	98,58	104,08	99,68	91,42	125,56	113,45	107,94	99,68
<b>Média</b>	33,65	35,33	34,9	34,9	34,64	33,65	41,91	36,52	33,09	47,7	42,74	39,7	35,27
<b>D.P.</b>	1,29	0,65	0,51	0,52	0,56	0,62	0,56	0,75	0,67	0,1	0,57	0,68	0,71
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	7,73	36,10	34,71	30,74	22,41	39,87	29,75	18,44	14,87	47,21	40,66	38,28	24,59
2	6,54	37,29	34,71	29,75	23,40	39,47	30,74	17,85	14,48	46,22	40,26	38,08	25,58
3	6,74	36,89	34,31	29,55	23,01	39,27	30,35	16,66	14,28	49,19	41,06	37,49	25,98
4	6,34	36,69	35,11	27,77	21,82	38,48	30,15	17,65	13,68	46,81	40,07	37,49	26,38
5	6,54	37,69	34,91	26,38	22,21	39,27	29,95	16,26	13,48	46,61	39,67	39,87	25,19
6	7,33	37,09	33,52	29,75	21,62	38,68	30,54	16,86	13,88	47,41	40,46	39,67	24,99
<b>Média</b>	6,87	36,95	34,54	28,99	22,41	39,17	30,24	17,28	14,11	47,24	40,36	38,48	25,45
<b>D.P.</b>	0,54	0,54	0,56	1,6	0,68	0,51	0,36	0,82	0,52	1,04	0,48	1,05	0,66

**Tabela 31.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de catalase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,40	0,43	0,43	0,35	0,32	0,23	0,19
2	0,43	0,44	0,41	0,35	0,31	0,21	0,16
3	0,45	0,44	0,38	0,36	0,31	0,22	0,18
4	0,44	0,44	0,41	0,34	0,30	0,24	0,17
5	0,43	0,43	0,43	0,34	0,29	0,24	0,19
6	0,49	0,46	0,44	0,34	0,28	0,21	0,16
<b>Média</b>	0,44	0,44	0,42	0,35	0,30	0,23	0,18
<b>D.P.</b>	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01

**Tabela 32.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de catalase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	0,43	0,60	0,57	0,51	0,43	0,59	0,56	0,52	0,43	0,64	0,60	0,54	0,45
2	0,44	0,60	0,57	0,51	0,43	0,58	0,55	0,51	0,43	0,64	0,61	0,54	0,45
3	0,44	0,59	0,56	0,52	0,44	0,58	0,56	0,52	0,43	0,63	0,59	0,53	0,45
4	0,44	0,61	0,56	0,51	0,44	0,60	0,55	0,51	0,44	0,62	0,60	0,53	0,46
5	0,43	0,61	0,56	0,51	0,44	0,60	0,54	0,52	0,44	0,63	0,59	0,55	0,46
6	0,46	0,60	0,56	0,52	0,43	0,60	0,56	0,53	0,44	0,64	0,60	0,54	0,46
<b>Média</b>	0,44	0,605	0,568	0,519	0,439	0,596	0,557	0,522	0,44	0,638	0,603	0,543	0,46
<b>D.P.</b>	0,02	0,007	0,005	0,005	0,006	0,007	0,007	0,006	0,005	0,007	0,0062	0,006	0,004
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	0,19	0,57	0,53	0,45	0,34	0,56	0,52	0,43	0,33	0,60	0,55	0,47	0,40
2	0,16	0,59	0,53	0,44	0,35	0,57	0,53	0,44	0,34	0,59	0,55	0,48	0,40
3	0,18	0,58	0,52	0,45	0,34	0,56	0,52	0,45	0,35	0,58	0,56	0,49	0,41
4	0,17	0,59	0,51	0,44	0,34	0,55	0,51	0,46	0,35	0,57	0,55	0,48	0,41
5	0,19	0,57	0,52	0,45	0,35	0,55	0,53	0,47	0,36	0,57	0,55	0,49	0,39
6	0,16	0,57	0,52	0,47	0,35	0,57	0,53	0,48	0,34	0,59	0,55	0,50	0,39
<b>Média</b>	0,18	0,579	0,523	0,452	0,345	0,56	0,524	0,455	0,346	0,583	0,549	0,485	0,404
<b>D.P.</b>	0,01	0,009	0,008	0,01	0,018	0,01	0,007	0,016	0,012	0,012	0,003	0,01	0,008

**Tabela 33.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de superóxido dismutase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,046	0,045	0,052	0,048	0,042	0,036	0,033
2	0,045	0,046	0,053	0,047	0,042	0,037	0,032
3	0,046	0,046	0,050	0,046	0,041	0,037	0,032
4	0,047	0,046	0,049	0,046	0,041	0,036	0,031
5	0,045	0,045	0,050	0,047	0,041	0,035	0,030
6	0,046	0,047	0,052	0,046	0,041	0,035	0,029
<b>Média</b>	0,046	0,051	0,047	0,041	0,036	0,032	0,047
<b>D.P.</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

**Tabela 34.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de superóxido dismutase (UI/mL) em cultura de queratinócitos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	0,045	0,063	0,059	0,054	0,045	0,062	0,058	0,054	0,046	0,067	0,063	0,056	0,048
2	0,046	0,062	0,060	0,053	0,045	0,061	0,057	0,053	0,045	0,067	0,064	0,057	0,047
3	0,046	0,062	0,059	0,054	0,046	0,061	0,058	0,054	0,046	0,066	0,062	0,055	0,047
4	0,046	0,064	0,058	0,054	0,046	0,062	0,058	0,054	0,046	0,065	0,063	0,056	0,048
5	0,045	0,064	0,059	0,054	0,046	0,063	0,057	0,055	0,046	0,066	0,062	0,057	0,048
6	0,047	0,062	0,059	0,055	0,046	0,062	0,059	0,055	0,047	0,067	0,062	0,057	0,048
<b>Média</b>	0,045	0,063	0,059	0,054	0,045	0,062	0,058	0,054	0,046	0,066	0,062	0,056	0,047
<b>D.P.</b>	0,001	0,0007	0,0004	0,0004	0,0005	0,0007	0,0007	0,0006	0,0005	0,0007	0,0006	0,0006	0,0004
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	0,033	0,059	0,055	0,047	0,035	0,058	0,054	0,045	0,034	0,062	0,057	0,049	0,042
2	0,032	0,061	0,055	0,046	0,036	0,060	0,055	0,046	0,035	0,062	0,057	0,050	0,042
3	0,032	0,061	0,054	0,047	0,035	0,058	0,054	0,047	0,037	0,060	0,058	0,051	0,043
4	0,031	0,061	0,053	0,046	0,035	0,057	0,053	0,048	0,036	0,059	0,057	0,050	0,043
5	0,030	0,059	0,054	0,047	0,037	0,057	0,055	0,048	0,038	0,059	0,057	0,050	0,041
6	0,029	0,059	0,054	0,049	0,036	0,060	0,055	0,049	0,035	0,061	0,057	0,051	0,041
<b>Média</b>	0,032	0,06	0,054	0,047	0,036	0,058	0,054	0,047	0,036	0,06	0,057	0,05	0,042
<b>D.P.</b>	0,001	0,0009	0,0007	0,0010	0,0005	0,0011	0,0007	0,0017	0,0012	0,0012	0,0003	0,0009	0,0008

**Tabela 35.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 1 (MMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	41,125	39,838	73,953	87,945	109,931	120,965	137,283
2	44,876	45,040	74,227	92,791	111,957	126,222	139,309
3	44,684	44,766	74,857	93,311	106,837	128,056	133,368
4	41,043	42,220	73,899	89,998	108,890	125,921	134,545
5	43,288	43,644	73,406	88,027	108,753	125,154	133,970
6	43,616	43,507	75,733	89,122	109,657	125,756	136,982
<b>Média</b>	43,09	43,16	74,34	90,19	109,33	125,34	135,9
<b>D.P.</b>	1,68	1,92	0,83	2,34	1,68	2,36	2,3

**Tabela 36.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 1 (MMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	39,838	38,551	40,659	38,414	46,765	35,129	36,826	38,414	44,219	38,031	36,059	38,414	43,835
2	45,040	39,865	38,551	45,862	39,783	35,621	38,031	40,440	43,890	38,661	41,043	40,440	41,234
3	44,766	39,372	42,631	41,727	45,642	38,277	37,538	40,303	43,781	38,359	39,728	40,303	41,043
4	42,220	39,482	41,289	44,191	45,259	37,428	39,646	39,017	38,086	37,456	39,208	39,017	41,481
5	43,644	39,126	41,535	42,631	43,781	33,157	35,813	38,332	39,865	38,140	39,044	38,332	42,028
6	43,507	42,795	41,672	42,959	41,234	38,277	38,442	39,263	38,825	41,015	39,811	39,263	41,864
<b>Média</b>	43,16	39,86	41,05	42,62	43,74	36,3	37,71	39,29	41,44	38,6	39,14	39,29	41,91
<b>D.P.</b>	0,19	1,49	1,38	2,51	2,72	2,03	1,32	0,9	2,82	1,24	1,67	0,9	1,01
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	137,28	125,12	137,03	130,90	136,84	82,441	95,857	110,01	121,81	85,207	98,239	110,01	127,83
2	139,30	125,92	136,38	131,09	128,74	88,191	93,229	112,23	123,45	87,643	95,912	112,23	128,71
3	133,36	125,15	127,72	129,06	131,72	84,413	95,529	114,53	125,86	84,549	95,200	114,53	127,39
4	134,54	125,07	126,19	131,80	134,60	82,058	94,598	115,02	125,20	82,551	93,065	115,02	126,63
5	133,97	127,34	129,37	132,19	132,05	81,456	95,775	120,44	123,18	82,386	93,777	120,44	126,44
6	136,98	128,33	129,75	134,60	137,39	84,467	95,912	117,95	125,97	85,316	94,105	117,95	126,16
<b>Média</b>	135,9	126,15	131,07	131,6	133,55	83,83	95,14	115,03	124,24	84,6	95,04	115,03	127,19
<b>D.P.</b>	2,3	1,37	4,54	1,82	3,32	2,47	1,06	3,77	1,68	1,96	1,86	3,77	0,96

**Tabela 37.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	0,589	0,554	0,746	1,248	1,621	1,766	2,320
2	0,600	0,618	1,149	1,434	1,592	1,813	2,221
3	0,618	0,536	1,119	1,347	1,463	1,848	2,262
4	0,577	0,589	0,723	1,341	1,504	1,801	2,227
5	0,571	0,571	1,020	1,323	1,673	1,871	2,291
6	0,560	0,583	0,892	1,172	1,562	1,848	2,303
<b>Média</b>	0,589	0,575	0,942	1,311	1,569	1,825	2,271
<b>D.P.</b>	0,02	0,18	0,09	0,07	0,03	0,04	0,02

**Tabela 38.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	0,554	0,577	0,571	0,542	0,595	0,472	0,501	0,536	0,589	0,379	0,449	0,449	0,536
2	0,618	0,571	0,577	0,531	0,589	0,478	0,513	0,560	0,612	0,367	0,426	0,507	0,525
3	0,536	0,589	0,600	0,577	0,583	0,455	0,472	0,571	0,577	0,350	0,420	0,525	0,531
4	0,589	0,606	0,612	0,624	0,501	0,466	0,490	0,589	0,571	0,385	0,455	0,478	0,525
5	0,571	0,560	0,548	0,600	0,548	0,426	0,519	0,548	0,554	0,391	0,437	0,513	0,600
6	0,583	0,542	0,566	0,589	0,571	0,431	0,466	0,542	0,566	0,350	0,449	0,519	0,595
<b>Média</b>	0,575	0,574	0,579	0,577	0,565	0,455	0,494	0,558	0,578	0,370	0,439	0,498	0,552
<b>D.P.</b>	0,18	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	2,320	1,568	1,673	1,831	2,204	0,519	0,542	0,635	0,746	0,408	0,595	0,682	1,038
2	2,221	1,492	1,685	1,860	2,157	0,507	0,560	0,641	0,740	0,437	0,630	0,735	1,096
3	2,262	1,487	1,714	1,871	2,163	0,542	0,571	0,688	0,729	0,455	0,606	0,694	1,119
4	2,227	1,522	1,702	1,912	2,192	0,560	0,589	0,659	0,764	0,449	0,635	0,682	1,073
5	2,291	1,539	1,691	1,842	2,145	0,577	0,531	0,647	0,717	0,414	0,647	0,705	1,149
6	2,303	1,551	1,650	1,813	2,163	0,531	0,566	0,641	0,700	0,461	0,624	0,700	1,096
<b>Média</b>	2,271	1,526	1,686	1,855	2,171	0,539	0,560	0,652	0,733	0,437	0,623	0,700	1,038
<b>D.P.</b>	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03

**Tabela 39.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de matriz metaloproteinase 13 (MMP-13) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	2,381	2,395	4,669	5,247	5,657	5,890	6,515
2	2,405	2,381	4,189	5,182	5,699	5,848	5,969
3	2,367	2,433	4,613	5,159	5,676	5,923	6,468
4	2,642	2,745	4,091	5,168	5,625	5,942	6,440
5	2,437	2,358	4,199	5,224	5,587	5,886	6,025
6	2,791	2,796	4,297	5,219	5,555	5,914	6,501
<b>Média</b>	2,504	2,518	4,343	5,200	5,633	5,900	6,320
<b>D.P.</b>	0,17	0,17	0,24	0,03	0,05	0,03	0,25

**Tabela 40.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de matriz metaloproteinase 13 (MMP-13) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	2,395	1,934	2,279	2,386	2,488	1,813	1,985	2,474	2,586	1,323	1,603	1,873	2,153
2	2,381	2,027	2,321	2,349	2,568	1,841	2,120	2,297	2,605	1,351	1,673	1,915	2,195
3	2,433	2,055	2,204	2,339	2,577	1,734	2,106	2,405	2,647	1,384	1,813	1,994	2,227
4	2,745	2,092	2,214	2,400	2,521	1,757	2,046	2,460	2,395	1,412	1,668	2,018	2,251
5	2,358	2,125	2,227	2,428	2,540	1,729	2,064	2,442	2,493	1,389	1,766	1,981	2,120
6	2,796	2,158	2,311	2,465	2,521	1,785	2,092	2,395	2,512	1,244	1,757	2,008	2,158
<b>Média</b>	2,518	2,065	2,259	2,394	2,536	1,813	2,069	2,412	2,540	1,351	1,713	1,965	2,184
<b>D.P.</b>	0,17	0,07	0,05	0,04	0,03	0,04	0,05	0,06	0,09	0,06	0,07	0,05	0,04
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	6,515	3,113	3,360	4,157	5,210	1,887	2,833	3,872	4,208	1,473	1,887	2,726	3,677
2	5,969	3,034	3,420	4,115	5,378	1,920	2,791	3,952	4,236	1,528	1,929	2,824	3,765
3	6,468	3,122	3,518	4,138	5,303	1,827	2,782	4,124	4,273	1,487	1,962	2,745	3,658
4	6,440	3,090	3,504	4,031	5,280	1,855	2,763	3,928	4,301	1,496	1,957	2,367	3,719
5	6,025	3,038	3,462	4,073	5,317	1,878	2,810	3,966	4,259	1,556	2,041	2,852	3,723
6	6,501	3,024	3,537	4,091	5,340	1,859	2,721	3,952	4,278	1,482	2,055	2,325	3,742
<b>Média</b>	6,320	3,070	3,467	4,101	5,305	1,887	2,784	3,966	4,259	1,504	1,972	2,640	3,714
<b>D.P.</b>	0,25	0,04	0,06	0,04	0,05	0,03	0,03	0,08	0,03	0,03	0,06	0,23	0,04

**Tabela 41.** Efeitos da exposição à RUV (UVA/UVB) durante 5 dias consecutivos sobre a produção de inibidor tecidual de metaloproteínas 1 (TIMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos.

Grupos	CONTROLE (CTRL)		RUV (UVA/UVB)				
	D1	D5	D1	D2	D3	D4	D5
1	2,408	2,426	3,240	4,163	4,194	2,670	1,761
2	2,316	2,207	3,398	3,966	4,222	2,894	1,737
3	2,223	2,239	3,525	4,006	4,258	2,928	1,912
4	2,356	2,378	3,450	4,170	4,381	3,007	1,967
5	2,348	2,356	3,394	3,974	4,236	3,029	1,975
6	2,305	2,338	3,291	4,196	4,167	2,777	1,878
<b>Média</b>	2,326	2,324	3,383	4,079	4,243	2,884	1,872
<b>D.P.</b>	0,06	0,08	0,1	0,1	0,07	0,13	0,1

**Tabela 42.** Efeitos da exposição crônica (5 dias consecutivos) à RUV (UVA/UVB) sobre a produção de inibidor tecidual de metaloproteína 1 (TIMP-1) (ng/mL) em cultura de fibroblastos humanos tratados com ERR, LC e ARRLC.

Condição Basal após 5 dias consecutivos de incubação (D5)													
Grupos	CTRL (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	2,426	5,949	3,605	2,638	2,384	7,690	6,199	3,986	3,170	8,184	7,894	4,192	3,376
2	2,207	5,592	3,595	2,733	2,513	7,402	6,374	3,948	3,182	8,168	7,811	4,345	3,386
3	2,239	5,639	3,730	2,745	2,426	7,545	6,505	3,932	3,007	8,135	7,944	4,123	3,174
4	2,378	5,560	3,738	2,712	2,416	7,565	6,509	4,002	2,825	7,938	7,718	4,176	3,210
5	2,356	5,580	3,773	2,690	2,247	7,757	6,572	3,904	2,890	7,944	7,976	4,347	3,240
6	2,338	5,806	3,627	2,755	2,430	7,531	6,328	4,198	2,902	7,962	7,992	4,170	3,224
<b>Média</b>	2,324	5,688	3,678	2,712	2,403	7,582	6,415	3,995	2,996	8,055	7,889	4,226	3,268
<b>D.P.</b>	0,06	0,15	0,07	0,04	0,08	0,12	0,14	0,1	0,16	0,11	0,1	0,09	0,09
Condição de estresse solar após 5 dias consecutivos de RUV (D5)													
Grupos	RUV (D5)	ERR (mg/mL) (D5)				LC (mg/mL) (D5)				ARRLC (mg/mL) (D5)			
		1,0	0,5	0,25	0,125	1,0	0,5	0,25	0,125	2,0	1,0	0,5	0,25
1	1,761	5,739	3,371	2,598	2,015	7,059	6,592	3,525	2,130	6,838	5,911	3,736	1,995
2	1,737	5,582	3,309	2,594	1,973	7,287	6,507	3,583	2,239	6,747	6,169	3,529	2,003
3	1,912	5,755	3,378	2,636	2,138	7,285	6,461	3,607	2,035	6,737	5,951	3,384	2,180
4	1,967	5,824	3,569	2,618	2,060	7,210	6,485	3,519	2,158	6,741	6,128	3,408	2,039
5	1,975	5,788	3,555	2,648	2,035	7,168	6,578	3,442	2,013	6,566	6,142	3,551	2,037
6	1,878	5,921	3,541	2,757	1,993	6,983	6,642	3,458	2,068	6,505	6,155	3,559	2,185
<b>Média</b>	1,872	5,768	3,454	2,642	2,036	7,165	6,544	3,522	2,107	6,689	6,076	3,528	2,073
<b>D.P.</b>	0,1	0,11	0,11	0,05	0,05	0,12	0,07	0,06	0,08	0,12	0,11	0,12	0,08

**Tabela 43.** Características Tipológicas das Voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).

Características Tipológicas das Voluntárias								
Voluntários		Idade	Sexo F=Feminino	Fototipo*	Pele íntegra	Usuário de produtos cosméticos da mesma categoria	Pele sensível ( <i>Stinging Test</i> Positivo)	Pele normal à seca
Ref.	Nome e Sobrenome							
1	LUIZ B	48	F	IV	X	X	X	S
2	MIRA L	49	F	III	X	X	X	N
3	CRIS M	48	F	III	X	X	X	S
4	CLAU P	53	F	III	X	X	X	N
5	RAQU B	50	F	III	X	X	X	N
6	VILM G	53	F	IV	X	X	X	N
7	APAR D	50	F	III	X	X	X	S
8	SUEL F	47	F	III	X	X	X	S
9	NEUS G	50	F	II	X	X	X	N
10	ISAB C	51	F	III	X	X	X	N
11	DEUS A	50	F	III	X	X	X	N
12	GLOR S	53	F	III	X	X	X	N
13	APAR S	54	F	III	X	X	X	N
14	ONDI S	47	F	III	X	X	X	N
15	ANAM L	50	F	III	X	X	X	N
16	ANTO M	50	F	III	X	X	X	S
17	DEIS S	54	F	III	X	X	X	S
18	ANGE S	53	F	III	X	X	X	N
19	ANGE SI	49	F	III	X	X	X	S
20	TERE S	53	F	III	X	X	X	N
21	MADA P	53	F	III	X	X	X	S
22	MAME D	54	F	III	X	X	X	S
23	ELIZ D	53	F	III	X	X	X	N
24	APAR B	46	F	III	X	X	X	S
25	LIDI M	53	F	IV	X	X	X	N

26	RAQU P	40	F	III	X	X	X	N
27	FATI R	46	F	IV	X	X	X	S
28	AMEL V	54	F	III	X	X	X	S
29	MARI M	54	F	III	X	X	X	S
30	LUIZ C	49	F	III	X	X	X	S
31	NUNE L	52	F	III	X	X	X	N
32	IREN X	40	F	III	X	X	X	N
33	EMIL S	52	F	III	X	X	X	N
34	ANAM M	53	F	III	X	X	X	N
35	DIRC O	50	F	III	X	X	X	R
36	IRAC R	53	F	III	X	X	X	N
37	MARG C	50	F	III	X	X	X	R
38	MARL F	51	F	II	X	X	X	R
39	LUCI F	52	F	IV	X	X	X	N
40	IARA F	52	F	III	X	X	X	N
41	ADRI R	41	F	III	X	X	X	N
42	ELIA S	40	F	II	X	X	X	R
43	ROSE S	46	F	III	X	X	X	N
44	ORAI S	44	F	III	X	X	X	N
45	MARI S	48	F	III	X	X	X	N
46	REGI P	52	F	III	X	X	X	S
47	GLOR S	54	F	III	X	X	X	N
48	SAND F	50	F	III	X	X	X	N
49	LUCI M	52	F	II	X	X	X	N
50	EDNA F	53	F	III	X	X	X	N
51	ELID M	40	F	III	X	X	X	N
52	ELIS T	40	F	III	X	X	X	N
53	LOUR S	49	F	III	X	X	X	N
54	ALIC S	54	F	III	X	X	X	N
55	ALBE S	40	F	IV	X	X	X	N
56	CECI S	48	F	III	X	X	X	S

57	MARC R	53	F	III	X	X	X	N
58	LILI F	40	F	III	X	X	X	N
59	DAIA M	45	F	III	X	X	X	N
60	MARC A	43	F	III	X	X	X	N
61	SORA R	50	F	III	X	X	X	R
62	MARI SI	53	F	III	X	X	X	N

**Legenda:** /= não; X = sim

**Tipo de Pele:** N= Normal; S= Seca

Desistência

Exclusão

**Tabela 44.** Controles de Observação – Modalidades de Aplicação das voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).

<b>Controle de Observação</b>		
<b>Modalidades de Aplicação</b> (60 resultados extrapolados)	<b>Número</b> de voluntários que respeitaram as modalidades	<b>Porcentagem</b> de voluntários que respeitaram as modalidades
<b>Área experimental:</b> Face e antebraço Desvios: nenhum	60	100%
<b>Modo de uso do produto:</b> Antes da utilização dos produtos, lavar a área. Aplicar cada produto em um dos lados da face e antebraço, conforme identificado no frasco. Na face e na área dos olhos, os produtos deverão ser espalhados sempre com a mesma mão (direita – destros ou esquerda – canhotos). Entre a aplicação de cada produto, lavar as mãos com água e sabão. Desvios: nenhum	60	100%
<b>Frequência de aplicação em casa:</b> Duas vezes ao dia Desvios: nenhum	60	100%
<b>Duração de aplicação em casa:</b> 56 dias Desvios: nenhum	60	100%
<b>Não utilização do produto por outra pessoa</b> Desvios: Nenhum	60	100%

**Tabela 45.** Controles de Observação – Restrições das voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).

<b>Controle de Observação</b>		
<b>Restrições</b> (60 resultados extrapolados)	<b>Número</b> de voluntários que respeitaram as modalidades	<b>Porcentagem</b> de voluntários que respeitaram as modalidades
<b>Aplicação de outros produtos na área experimental</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Alteração dos hábitos de higiene</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Exposição intensa ao sol ou à UVA (lâmpadas UV) durante o estudo</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Realizar tratamento com medicamentos vitamina A ácida ou seus derivados, peróxido de benzoíla, eritromicina, ácido azeláico, etc, durante o período do estudo.</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Realizar tratamento antialérgico e/ou antiinflamatório durante o estudo</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Alteração dos hábitos de dieta</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Alteração/início de tratamento hormonal</b> Desvios: Nenhum	60	100%
<b>Alteração do método contraceptivo oral corrente</b> Desvios: Nenhum	60	100%

**Tabela 46.** Tabela de Aleatorização para aplicação das formulações placebo e ARRLC 1% pelas voluntárias que participaram dos Estudos Objetivos/Instrumentais (Relevo Cutâneo e Perda de Água Transepidérmica).

Aleatorização						
Voluntário	Lado	Produto		Voluntário	Lado	Produto
1	Direito	Placebo		32	Direito	ARRLC
1	Esquerdo	ARRLC		32	Esquerdo	Placebo
2	Direito	Placebo		33	Direito	ARRLC
2	Esquerdo	ARRLC		33	Esquerdo	Placebo
3	Direito	ARRLC		34	Direito	Placebo
3	Esquerdo	Placebo		34	Esquerdo	ARRLC
4	Direito	Placebo		35	Direito	Placebo
4	Esquerdo	ARRLC		35	Esquerdo	ARRLC
5	Direito	ARRLC		36	Direito	Placebo
5	Esquerdo	Placebo		36	Esquerdo	ARRLC
6	Direito	ARRLC		37	Direito	Placebo
6	Esquerdo	Placebo		37	Esquerdo	ARRLC
7	Direito	Placebo		38	Direito	Placebo
7	Esquerdo	ARRLC		38	Esquerdo	ARRLC
8	Direito	Placebo		39	Direito	ARRLC
8	Esquerdo	ARRLC		39	Esquerdo	Placebo
9	Direito	ARRLC		40	Direito	Placebo
9	Esquerdo	Placebo		40	Esquerdo	ARRLC
10	Direito	ARRLC		41	Direito	ARRLC
10	Esquerdo	Placebo		41	Esquerdo	Placebo
11	Direito	ARRLC		42	Direito	ARRLC
11	Esquerdo	Placebo		42	Esquerdo	Placebo
12	Direito	ARRLC		43	Direito	ARRLC
12	Esquerdo	Placebo		43	Esquerdo	Placebo
13	Direito	ARRLC		44	Direito	Placebo
13	Esquerdo	Placebo		44	Esquerdo	ARRLC
14	Direito	Placebo		45	Direito	Placebo
14	Esquerdo	ARRLC		45	Esquerdo	ARRLC
15	Direito	ARRLC		46	Direito	ARRLC
15	Esquerdo	Placebo		46	Esquerdo	Placebo
16	Direito	ARRLC		47	Direito	ARRLC
16	Esquerdo	Placebo		47	Esquerdo	Placebo
17	Direito	ARRLC		48	Direito	Placebo
17	Esquerdo	Placebo		48	Esquerdo	ARRLC
18	Direito	ARRLC		49	Direito	ARRLC
18	Esquerdo	Placebo		49	Esquerdo	Placebo
19	Direito	ARRLC		50	Direito	ARRLC
19	Esquerdo	Placebo		50	Esquerdo	Placebo
20	Direito	Placebo		51	Direito	Placebo
20	Esquerdo	ARRLC		51	Esquerdo	ARRLC
21	Direito	ARRLC		52	Direito	Placebo
21	Esquerdo	Placebo		52	Esquerdo	ARRLC
22	Direito	ARRLC		53	Direito	ARRLC
22	Esquerdo	Placebo		53	Esquerdo	Placebo
23	Direito	ARRLC		54	Direito	Placebo
23	Esquerdo	Placebo		54	Esquerdo	ARRLC
24	Direito	Placebo		55	Direito	Placebo
24	Esquerdo	ARRLC		55	Esquerdo	ARRLC
25	Direito	ARRLC		56	Direito	ARRLC
25	Esquerdo	Placebo		56	Esquerdo	Placebo
26	Direito	Placebo		57	Direito	Placebo
26	Esquerdo	ARRLC		57	Esquerdo	ARRLC
27	Direito	Placebo		58	Direito	Placebo
27	Esquerdo	ARRLC		58	Esquerdo	ARRLC
28	Direito	Placebo		59	Direito	ARRLC
28	Esquerdo	ARRLC		59	Esquerdo	Placebo
29	Direito	ARRLC		60	Direito	Placebo

29	Esquerdo	Placebo
30	Direito	ARRLC
30	Esquerdo	Placebo
31	Direito	Placebo
31	Esquerdo	ARRLC

60	Esquerdo	ARRLC
61	Direito	Placebo
61	Esquerdo	ARRLC
62	Direito	ARRLC
62	Esquerdo	Placebo

**Tabela 47.** Avaliação Instrumental da Redução da Perda de Água Transepidérmica (TEWL) de uma formulação contendo ARRLC 1% em comparação com o respectivo placebo em voluntárias humanas sadias.

Formulação contendo ARRLC 1%												
VOL	D1				D28				D56			
	T0	T30'	T60'	T120'	T0	T30'	T60'	T120'	T0	T30'	T60'	T120'
1	4,5	5,2	5,4	5,7	4,5	8,9	9,7	9,5	8,2	10,0	10,1	9,8
2	3,9	6,3	4,7	7,2	6,3	8,6	8,3	8,3	5,7	6,0	6,1	6,2
3	4,6	7,6	8,3	7,0	7,5	8,7	7,7	7,7	5,3	9,6	9,8	8,2
4	10,0	11,1	12,0	12,5	7,4	12,0	9,3	9,1	8,9	9,3	9,3	8,0
5	8,6	8,4	7,2	7,7	9,0	6,7	8,0	8,5	7,3	10,4	8,7	8,7
6	8,0	6,2	8,2	9,6	6,4	6,4	9,8	8,8	3,5	4,2	5,0	4,5
7	11,0	10,2	9,8	11,1	9,2	10,9	13,9	13,0	9,5	11,8	14,6	12,6
8	9,1	9,4	7,5	10,8	10,0	8,8	9,5	9,9	8,7	10,4	9,0	7,7
9	11,0	11,2	11,3	11,8	10,1	8,9	10,5	10,5	9,5	7,6	7,5	10,2
10	6,1	7,5	6,3	8,1	3,4	5,1	6,8	6,4	3,9	4,0	4,9	7,9
11	11,0	9,7	10,5	8,2	8,6	7,4	10,0	9,7	5,9	7,2	6,4	7,6
12	9,3	8,6	7,8	7,3	7,6	7,2	6,8	8,3	3,5	5,9	6,5	5,8
13	8,7	8,3	7,2	6,8	8,9	7,9	7,4	7,4	7,5	8,4	8,0	8,6
14	5,5	6,8	7,5	5,8	3,1	4,3	3,3	4,7	5,5	11,3	12,1	9,7
15	11,3	9,9	11,2	10,2	6,8	10,3	9,7	8,1	4,5	7,7	6,7	9,3
16	11,2	10,0	10,7	12,3	8,2	9,5	12,2	8,4	7,5	7,4	6,9	9,0
17	5,7	5,6	6,2	6,6	8,3	8,7	9,4	10,8	5,8	6,3	8,9	8,4
18	10,4	9,0	10,7	11,9	11,3	10,0	12,1	13,3	5,8	5,0	5,0	6,4
19	4,6	5,1	5,7	8,0	4,4	4,1	4,4	4,2	3,9	4,2	6,4	4,9
20	9,9	9,6	8,2	6,3	7,9	9,1	11,1	12,3	6,5	6,1	8,6	8,0
21	5,0	6,9	8,0	6,4	5,5	5,5	5,3	5,4	4,5	6,7	7,4	6,5
22	6,6	7,2	7,0	8,4	8,6	8,4	5,6	6,4	4,4	7,1	7,6	6,5
23	4,9	5,0	5,5	6,0	5,0	4,5	5,5	6,5	5,6	7,3	6,4	6,4
24	5,4	6,4	6,4	6,2	7,9	8,1	6,2	8,2	5,8	7,9	7,6	7,5
25	8,3	7,3	7,7	7,3	5,6	7,1	8,1	7,2	6,3	10,1	9,0	8,9
33	3,5	3,7	3,8	4,1	5,1	6,0	5,6	6,5	3,5	3,7	4,5	4,7
34	8,8	8,7	8,0	7,5	7,6	7,6	9,7	10,0	8,2	7,8	9,1	9,4
39	9,5	8,5	8,3	4,4	2,4	6,7	4,1	3,8	3,8	6,7	4,8	4,5
40	10,8	8,1	9,5	11,1	8,1	10,6	8,5	9,0	5,0	5,4	5,6	5,0
41	13,9	11,1	10,1	9,5	9,9	15,0	12,3	11,1	8,9	10,3	9,5	9,9
46	3,9	6,2	5,3	5,3	6,2	5,9	5,1	5,4	4,8	7,7	6,6	5,9
47	3,7	3,8	4,1	4,6	4,9	4,3	4,3	3,5	3,2	3,2	3,5	3,2
49	6,3	6,5	5,6	7,2	7,7	7,7	8,3	9,1	5,7	5,6	5,6	5,6
50	4,9	5,4	6,6	6,1	4,5	5,1	4,6	4,9	4,6	4,6	4,7	4,6
51	12,5	8,1	7,8	10,3	6,8	8,7	6,0	7,2	5,3	5,3	6,0	6,4
52	4,5	4,2	4,6	5,2	3,1	5,4	5,8	5,1	5,2	4,9	4,8	4,5
53	3,8	4,6	4,8	6,2	3,5	4,3	4,2	4,0	4,4	4,1	4,0	3,9
54	3,4	5,4	5,1	6,4	3,8	4,0	4,4	5,1	3,7	5,3	5,3	5,4
55	4,8	6,0	5,5	4,9	3,9	4,2	4,4	5,1	4,0	4,8	4,8	4,6
<b>Média</b>	<b>7,8</b>	<b>7,6</b>	<b>7,6</b>	<b>8,0</b>	<b>7,0</b>	<b>7,8</b>	<b>8,0</b>	<b>8,1</b>	<b>6,0</b>	<b>7,0</b>	<b>7,2</b>	<b>7,1</b>
<b>DP</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,5</b>	<b>1,4</b>

Formulação Placebo												
VOL	D1				D28				D56			
	T0	T30'	T60'	T120'	T0	T30'	T60'	T120'	T0	T30'	T60'	T120'
1	5,9	6,2	5,3	5,3	4,6	9,3	10,3	10,1	6,4	10,6	10,6	9,1
2	4,3	4,5	5,1	5,8	6,3	5,6	9,5	9,4	5,7	5,2	5,3	6,5
3	7,4	8,6	8,8	7,7	7,3	10,2	10,9	10,9	7,7	8,9	8,9	9,8
4	9,3	10,4	12,7	12,3	7,8	8,3	10,9	10,9	5,5	9,7	9,7	7,8
5	8,7	9,0	8,4	9,7	9,8	11,8	9,1	9,4	7,0	10,0	9,6	9,0
6	9,0	7,7	8,0	8,3	7,0	9,2	9,3	9,1	4,5	10,6	8,5	6,3
7	9,1	9,1	8,7	9,2	7,4	9,7	11,4	11,4	10,1	9,1	9,6	10,2
8	11,2	10,8	9,1	9,9	11,4	9,7	8,8	11,4	7,9	10,7	10,4	8,0
9	8,9	10,8	9,6	10,7	12,6	11,8	10,4	10,3	7,7	10,1	10,0	9,4
10	7,9	7,6	7,7	8,4	4,7	7,9	5,5	7,1	4,5	5,2	5,2	5,4
11	7,9	9,6	7,1	10,5	7,0	7,4	9,9	11,2	5,8	8,0	7,9	7,5
12	7,6	8,1	8,9	8,7	7,2	8,2	7,5	7,1	5,3	6,5	7,7	6,7
13	9,2	7,4	6,7	7,3	7,7	8,4	8,9	9,9	6,9	9,9	9,6	9,8
14	7,3	6,2	6,8	6,8	5,3	6,8	6,5	7,2	6,8	11,3	12,4	10,7
15	7,2	9,5	9,4	9,7	8,3	8,0	8,8	8,4	6,1	6,6	6,6	7,5
16	11,4	9,7	9,1	11,2	9,5	11,0	12,7	11,3	10,2	10,4	9,7	12,0
17	6,7	6,4	7,0	7,9	7,8	10,4	9,9	10,5	6,8	5,9	8,9	10,2
18	9,6	11,3	11,6	12,0	12,8	12,6	13,4	9,5	9,7	7,5	10,8	10,4
19	5,5	6,0	5,1	8,4	4,7	6,4	5,1	4,5	4,8	5,0	6,0	6,8
20	6,7	7,8	8,4	7,0	8,3	10,0	10,4	11,8	6,6	6,9	8,2	9,2
21	7,5	8,4	8,6	8,0	5,5	5,9	5,5	6,0	4,8	8,6	8,8	7,3
22	8,3	6,5	7,2	6,7	8,2	8,2	7,9	8,2	5,5	6,9	7,4	6,7
23	4,7	6,9	6,6	6,8	5,1	5,1	7,0	7,4	6,7	9,2	8,9	6,7
24	7,2	6,3	6,9	6,3	5,7	8,4	6,1	7,4	5,8	7,4	6,1	6,8
25	8,9	7,4	8,5	7,9	8,0	7,5	7,8	8,6	7,0	8,0	8,4	9,0
33	5,4	6,4	7,1	7,2	6,1	7,4	9,5	9,6	5,6	6,5	6,7	6,3
34	8,3	7,5	7,2	7,9	8,3	9,0	7,4	8,3	8,1	11,0	9,3	8,4
39	8,1	5,9	6,8	8,5	4,6	7,4	5,1	5,2	6,4	7,1	5,9	5,6
40	4,5	4,2	7,0	7,6	6,5	10,5	8,9	7,1	6,3	6,7	6,5	6,0
41	14,6	12,1	12,9	13,9	10,2	10,6	13,8	12,9	7,8	10,4	11,8	11,5
46	4,9	5,7	6,7	6,0	6,0	7,1	6,1	7,3	5,2	7,0	6,8	7,3
47	3,7	3,8	4,4	6,8	4,3	6,2	6,4	6,5	4,8	5,6	6,5	6,1
49	5,3	6,5	5,5	6,4	7,6	8,2	8,9	9,0	5,1	5,4	7,3	6,8
50	4,5	4,6	5,8	6,7	5,8	7,3	6,8	5,6	5,4	7,3	6,1	5,9
51	10,8	9,9	10,2	11,0	8,1	8,3	8,7	7,7	7,0	8,6	8,2	6,9
52	6,3	4,3	5,6	6,7	4,6	5,7	5,5	6,5	5,4	6,2	6,0	6,3
53	5,9	5,6	4,5	5,9	4,7	6,1	4,3	4,1	5,1	4,6	5,4	5,4
54	3,9	3,9	4,5	5,1	3,7	4,0	4,3	4,1	4,0	5,2	5,1	5,0
55	5,5	8,2	7,2	7,1	5,8	7,6	5,5	5,6	4,3	6,8	4,9	4,9
Média	7,7	7,7	7,8	8,4	7,3	8,6	8,6	8,7	6,5	8,0	8,1	7,8
DP	1,6	1,7	1,7	1,7	1,8	1,7	1,8	1,8	1,4	1,4	1,4	1,4

**Tabela 48.** Avaliação Instrumental do Efeito na Redução de Linhas Finas (Melhora do Relevo Cutâneo) de uma formulação contendo ARRLC 1% em comparação com o respectivo placebo em voluntárias humanas sadias.

Formulação contendo ARRLC 1%									
Vol.	D1/T0			D28/T0			D56/T0		
	Rm	Rz	Ra	Rm	Rz	Ra	Rm	Rz	Ra
1	0,125	0,101	0,020	0,120	0,098	0,021	0,108	0,085	0,016
2	0,118	0,093	0,019	0,127	0,100	0,021	0,094	0,076	0,014
3	0,117	0,090	0,019	0,106	0,082	0,017	0,085	0,069	0,013
4	0,145	0,116	0,026	0,105	0,085	0,018	0,123	0,101	0,021
5	0,105	0,081	0,016	0,089	0,072	0,014	0,110	0,090	0,018
6	0,152	0,123	0,029	0,113	0,089	0,019	0,144	0,116	0,025
7	0,090	0,071	0,015	0,092	0,074	0,015	0,085	0,069	0,012
8	0,107	0,083	0,017	0,102	0,084	0,017	0,092	0,077	0,015
9	0,106	0,085	0,019	0,094	0,076	0,015	0,110	0,088	0,016
10	0,101	0,081	0,017	0,097	0,079	0,015	0,112	0,084	0,016
11	0,123	0,096	0,020	0,088	0,072	0,014	0,098	0,079	0,015
12	0,122	0,097	0,023	0,101	0,078	0,016	0,115	0,091	0,018
13	0,109	0,082	0,017	0,105	0,080	0,015	0,112	0,086	0,018
14	0,104	0,083	0,017	0,082	0,067	0,013	0,129	0,105	0,022
15	0,100	0,082	0,016	0,101	0,082	0,017	0,187	0,146	0,032
16	0,112	0,091	0,019	0,117	0,090	0,019	0,105	0,083	0,016
17	0,127	0,099	0,023	0,084	0,069	0,013	0,116	0,091	0,018
18	0,138	0,106	0,022	0,115	0,086	0,019	0,097	0,076	0,014
19	0,118	0,099	0,023	0,172	0,127	0,025	0,131	0,105	0,021
20	0,137	0,111	0,025	0,089	0,065	0,013	0,130	0,101	0,021
21	0,118	0,094	0,020	0,142	0,115	0,025	0,137	0,112	0,024
22	0,199	0,154	0,034	0,140	0,110	0,024	0,124	0,099	0,020
23	0,135	0,113	0,025	0,125	0,101	0,023	0,125	0,100	0,020
24	0,103	0,085	0,017	0,098	0,077	0,015	0,124	0,099	0,019
25	0,097	0,076	0,015	0,110	0,088	0,018	0,120	0,097	0,019
33	0,109	0,087	0,017	0,156	0,123	0,027	0,126	0,099	0,020
34	0,145	0,115	0,026	0,104	0,083	0,016	0,111	0,085	0,017
39	0,132	0,103	0,022	0,120	0,097	0,022	0,118	0,096	0,021
40	0,112	0,086	0,018	0,109	0,088	0,020	0,105	0,085	0,018
41	0,096	0,077	0,015	0,115	0,092	0,020	0,104	0,085	0,017
46	0,118	0,095	0,021	0,104	0,084	0,017	0,112	0,090	0,018
47	0,088	0,068	0,013	0,125	0,099	0,020	0,108	0,088	0,016
49	0,109	0,086	0,016	0,098	0,078	0,016	0,133	0,103	0,020
50	0,114	0,090	0,019	0,121	0,098	0,021	0,143	0,113	0,024
51	0,121	0,095	0,020	0,140	0,112	0,025	0,113	0,091	0,019
52	0,109	0,089	0,019	0,112	0,092	0,019	0,112	0,091	0,020
53	0,121	0,098	0,023	0,100	0,082	0,017	0,105	0,083	0,018
54	0,101	0,086	0,018	0,122	0,095	0,020	0,107	0,082	0,017
55	0,127	0,104	0,024	0,114	0,090	0,019	0,126	0,099	0,021
<b>Média</b>	<b>0,121</b>	<b>0,096</b>	<b>0,023</b>	<b>0,110</b>	<b>0,088</b>	<b>0,018</b>	<b>0,111</b>	<b>0,089</b>	<b>0,018</b>
<b>D.P.</b>	<b>0,021</b>	<b>0,017</b>	<b>0,003</b>	<b>0,018</b>	<b>0,014</b>	<b>0,003</b>	<b>0,013</b>	<b>0,011</b>	<b>0,001</b>

Formulação Placebo									
Vol.	D1/T0			D28/T0			D56/T0		
	Rm	Rz	Ra	Rm	Rz	Ra	Rm	Rz	Ra
1	0,121	0,099	0,020	0,115	0,090	0,017	0,122	0,095	0,019
2	0,127	0,100	0,020	0,104	0,082	0,016	0,119	0,097	0,019
3	0,088	0,071	0,014	0,085	0,066	0,013	0,092	0,071	0,013
4	0,095	0,077	0,016	0,109	0,085	0,017	0,122	0,097	0,021
5	0,115	0,087	0,019	0,104	0,085	0,017	0,110	0,087	0,017
6	0,147	0,118	0,027	0,110	0,091	0,021	0,122	0,095	0,020
7	0,082	0,066	0,013	0,090	0,072	0,015	0,108	0,088	0,018
8	0,112	0,089	0,019	0,105	0,086	0,017	0,118	0,095	0,019
9	0,126	0,100	0,022	0,114	0,090	0,018	0,116	0,089	0,017
10	0,133	0,103	0,022	0,106	0,083	0,018	0,104	0,085	0,016
11	0,116	0,090	0,019	0,082	0,068	0,012	0,101	0,081	0,015
12	0,107	0,083	0,019	0,101	0,081	0,017	0,092	0,073	0,014
13	0,101	0,077	0,015	0,092	0,074	0,014	0,109	0,087	0,017
14	0,107	0,087	0,018	0,089	0,073	0,015	0,177	0,140	0,031
15	0,129	0,103	0,023	0,118	0,095	0,021	0,168	0,133	0,030
16	0,121	0,092	0,021	0,132	0,107	0,022	0,104	0,086	0,017
17	0,118	0,093	0,020	0,105	0,086	0,018	0,113	0,092	0,018
18	0,125	0,097	0,020	0,108	0,087	0,019	0,106	0,086	0,017
19	0,104	0,081	0,017	0,144	0,113	0,026	0,135	0,110	0,024
20	0,126	0,093	0,020	0,095	0,078	0,016	0,135	0,107	0,023
21	0,126	0,097	0,020	0,127	0,100	0,022	0,128	0,107	0,023
22	0,212	0,155	0,031	0,128	0,105	0,024	0,133	0,098	0,020
23	0,138	0,111	0,023	0,114	0,095	0,022	0,093	0,077	0,015
24	0,109	0,087	0,017	0,100	0,079	0,015	0,115	0,095	0,020
25	0,092	0,072	0,014	0,090	0,071	0,015	0,105	0,083	0,016
33	0,120	0,093	0,019	0,127	0,101	0,023	0,099	0,080	0,015
34	0,115	0,092	0,020	0,097	0,078	0,015	0,119	0,096	0,020
39	0,102	0,080	0,016	0,125	0,103	0,023	0,119	0,092	0,020
40	0,103	0,082	0,017	0,108	0,088	0,019	0,128	0,103	0,023
41	0,130	0,100	0,019	0,099	0,081	0,018	0,100	0,082	0,018
46	0,122	0,097	0,020	0,134	0,103	0,023	0,113	0,092	0,019
47	0,093	0,072	0,015	0,105	0,087	0,018	0,107	0,088	0,017
49	0,098	0,078	0,016	0,099	0,079	0,017	0,095	0,077	0,014
50	0,118	0,090	0,018	0,106	0,084	0,018	0,104	0,085	0,018
51	0,108	0,088	0,019	0,109	0,086	0,018	0,133	0,105	0,023
52	0,094	0,078	0,017	0,110	0,090	0,019	0,095	0,076	0,016
53	0,096	0,075	0,015	0,113	0,092	0,021	0,089	0,073	0,014
54	0,097	0,078	0,015	0,105	0,086	0,018	0,122	0,100	0,021
55	0,125	0,097	0,021	0,137	0,111	0,025	0,122	0,097	0,020
<b>Média</b>	<b>0,116</b>	<b>0,091</b>	<b>0,019</b>	<b>0,109</b>	<b>0,088</b>	<b>0,018</b>	<b>0,113</b>	<b>0,090</b>	<b>0,018</b>
<b>D.P.</b>	<b>0,023</b>	<b>0,017</b>	<b>0,004</b>	<b>0,015</b>	<b>0,012</b>	<b>0,003</b>	<b>0,013</b>	<b>0,011</b>	<b>0,003</b>

**Tabela 49.** Características Tipológicas das Voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).

Voluntários		Idade	Sexo F=Feminino M=Masculino	Fototipo*	Pele sensível ( <i>Stinging Test</i> Positivo)	Usuário de produtos para tratamento facial
Ref.	Nome e Sobrenome					
1	IRAC R	52	F	III	X	X
2	IZEN A	49	F	II	X	X
3	MARC B	51	F	III	X	X
4	MARL S	50	F	III	X	X
5	SOLA O	50	F	II	X	X
6	ELEN S	45	F	III	X	X
7	JOAN L	53	F	III	X	X
8	SONI M	55	F	III	X	X
9	IVAN V	45	F	III	X	X
10	SONI N	53	F	III	X	X
11	MIRI C	49	F	III	X	X
12	ANTO A	49	F	III	X	X
13	MARL C	52	F	III	X	X
14	APAR P	47	F	IV	X	X
15	ELIS S	45	F	II	X	X
16	ISAB S	53	F	II	X	X
17	LOUR S	55	F	III	X	X
18	MARI M	46	F	IV	X	X
19	HELE F	53	F	II	X	X
20	DARC C	49	F	III	X	X
21	DEJA L	47	F	III	X	X
22	MIRL M	49	F	IV	X	X
23	LUZI R	48	F	III	X	X
24	ANAR A	53	F	III	X	X
25	RITA A	51	F	III	X	X
26	IZAB P	49	F	III	X	X
27	MARC P	46	F	IV	X	X
28	INES C	51	F	III	X	X
29	MARI A	52	F	III	X	X
30	VILM S	51	F	IV	X	X
31	MARL M	54	F	III	X	X
32	LINA F	54	F	IV	X	X

33	IRAN L	46	F	III	X	X
34	ODET S	50	F	III	X	X
35	EDNA C	45	F	IV	X	X
36	ODET R	53	F	IV	X	X
37	SUEL F	46	F	III	X	X
38	TERE P	54	F	III	X	X
39	ROSA P	46	F	IV	X	X
40	VERA S	46	F	III	X	X
41	FATI R	46	F	III	X	X
42	SAND A	48	F	III	X	X
43	MART R	47	F	III	X	X
44	LAZA N	50	F	IV	X	X
45	MARI D	45	F	III	X	X
46	KATI R	45	F	III	X	X
47	CLAU P	51	F	III	X	X
48	MEIR S	45	F	IV	X	X
49	ROSA M	53	F	IV	X	X
50	MARI C	45	F	III	X	X
51	CONC P	45	F	III	X	X
52	LOUR M	45	F	IV	X	X
53	TELM S	48	F	IV	X	X
54	JANE S	54	F	III	X	X
55	JOAN S	45	F	IV	X	X
56	MYLE Y	47	F	III	X	X
57	FRAN B	47	F	III	X	X
58	JURA B	46	F	II	X	X
59	MORG C	46	F	III	X	X
60	REGI P	52	F	III	X	X
61	SOLA S	51	F	II	X	X
62	MARC B	55	F	III	X	X
63	IZIL S	47	F	III	X	X
64	SOLA H	46	F	III	X	X
65	MIRI G	54	F	III	X	X
66	ANAM S	50	F	II	X	X
67	TELM C	47	F	III	X	X
68	APAR C	50	F	IV	X	X
69	APAR M	55	F	III	X	X
70	SAND O	47	F	III	X	X

71	MIRI C	48	F	IV	X	X
72	GENI X	47	F	III	X	X
73	NAIR R	49	F	IV	X	X
74	NELC S	48	F	II	X	X
75	ANAS K	53	F	III	X	X
76	MARI M	48	F	IV	X	X
77	MARI R	47	F	IV	X	X
78	LOUR S	47	F	III	X	X
79	VALD V	46	F	III	X	X
80	IVON L	53	F	IV	X	X
81	APAR F	47	F	III	X	X
82	CAND O	49	F	II	X	X
83	CLAR S	45	F	III	X	X
84	OLIV B	50	F	III	X	X
85	SUZI M	49	F	IV	X	X
86	BERE M	53	F	III	X	X
87	SILV R	49	F	III	X	X
88	GENI S	49	F	III	X	X
89	FATI S	48	F	III	X	X
90	CRIS M	51	F	III	X	X
91	ELZA F	45	F	III	X	X
92	ELIZ C	45	F	II	X	X
93	LOUR E	50	F	III	X	X
94	MIRI G	40	F	III	X	X
95	EDNA A	49	F	III	X	X
96	TANI S	48	F	III	X	X
97	EMIL S	50	F	IV	X	X
98	FATI M	54	F	III	X	X
99	GERA L	49	F	III	X	X
100	CELI F	45	F	III	X	X
101	APAR B	53	F	II	X	X
102	ODET G	57	F	III	X	X
103	CRIZ C	51	F	III	X	X
104	SUEL P	55	F	III	X	X
105	EUNI B	51	F	II	X	X
106	GRAÇ F	54	F	III	X	X
107	VALK F	47	F	III	X	X
108	ANAM P	54	F	III	X	X

109	TANI S	46	F	III	X	X
110	AURE R	49	F	IV	X	X
111	FATI A	46	F	III	X	X
112	LUIZ C	47	F	IV	X	X
113	MARL O	53	F	III	X	X
114	MARA G	48	F	III	X	X
115	ELIS R	46	F	III	X	X
116	LIDI O	56	F	III	X	X
117	EVEL M	46	F	III	X	X
118	CORI S	50	F	IV	X	X
119	MIRA L	48	F	IV	X	X
120	ROSE N	48	F	III	X	X
121	APAR P	48	F	III	X	X
122	ELIZ B	48	F	III	X	X
123	APAR I	47	F	III	X	X
124	SAND F	48	F	III	X	X

**Legenda:** /= não; X = sim

**Tabela 50.** Controles de Observação – Modalidades de Aplicação das voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).

<b>Controle de Observação</b>		
<b>Modalidades de Aplicação</b> (124 resultados extrapolados)	<b>Número</b> de voluntários que respeitaram as modalidades	<b>Porcentagem</b> de voluntários que respeitaram as modalidades
<b>Área experimental:</b> Face Desvios: nenhum	124	100%
<b>Modo de uso do produto:</b> Aplicação após o banho ou lavagem do rosto, antes da aplicação do creme de tratamento habitual.  Desvios: nenhum	124	100%
<b>Freqüência de aplicação em casa:</b> 28 dias Desvios: nenhum	124	100%
<b>Não utilização dos produtos por outras pessoas</b> Desvios: nenhum	124	100%
<b>Continuação dos produtos de tratamento habitual</b> Desvios: Nenhum	124	100%

**Tabela 51.** Controles de Observação-Restrições das voluntárias que participaram dos Estudos Subjetivos (Apreciabilidade após Stinging-Test).

<b>Controle de Observação</b>		
<b>Restrições</b> (124 resultados extrapolados)	<b>Número</b> de voluntários que respeitaram as modalidades	<b>Porcentagem</b> de voluntários que respeitaram as modalidades
<b>Mudança dos hábitos de higiene</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Uso de Medicamento na área experimental</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Alteração dos hábitos de dieta</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Alteração do tratamento contraceptivo oral corrente</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Realização de tratamentos esfoliante ou pelling</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Exposição solar intensa e/ou uso de câmaras de bronzeamento artificial</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Realização de limpeza de pele com esteticista</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Início de tratamento anti-alérgico ou anti-inflamatório durante o período do estudo</b> Desvios: Nenhum	124	100%
<b>Tratamento tópico contendo Vitamina A ácida ou derivados ou sistêmicos ou tratamento anti-acneico ou anti-seborréico</b> Desvios: Nenhum	124	100%

Figura 53. Laudo de análise do Extrato de *Rhodiola rosea* (ERR).

 <b>Hangzhou Skyherb Technologies Co.,Ltd.</b>			
Add: 632 Huaxing Technologies Bldg. 477 Wensan Road, Hangzhou, China 310013 Tel: 86-571-88053319, 85022320 Fax: 86-571-88054060 Website: <a href="http://www.skyherb.cn">www.skyherb.cn</a> Email: <a href="mailto:Richard@skyherb.cn">Richard@skyherb.cn</a>			
<b>CERTIFICATION OF ANALYSIS</b>			
<b>Product Name</b>	Rhodiola rosea P.E.	<b>Plant Latin Name</b>	<i>Rhodiola Rosea L.</i>
<b>Lot No.</b>	RHR200709221	<b>Quantity</b>	1000Kg
<b>Issue Date</b>	Sep.22 2007	<b>Shelf Life</b>	3 years
<b>Used Part</b>	Roots	<b>Extract solvent</b>	Ethanol, Water
<b>Description</b>	An powder extract of Rhodiola rosea root		
<b>Storage Condition</b>	Store in tightly closed plastic bag at room temperature in dry place.		
<b>Safety Precaution</b>	Avoid dusting. Irritant; Wear protective eye wear, if eye contact, flush with water for 10 minutes, wash skin with soap and water.		
<b>Identifications</b>	<b>Standards</b>	<b>Results</b>	<b>Methods</b>
<b>Appearance</b>	Light Yellow-brownish fine powder		
<b>Odor</b>	Character odor of the herb Rhodiola Rosea		
<b>Powder Size</b>	100% through 80 mesh		
<b>Rosavins</b>	≥3%	3.54%	HPLC
<b>Rosavin</b>	≥2%	2.01%	HPLC
	<i>rosarin</i>	0.79%	HPLC
	<i>rosin</i>	0.74%	HPLC
<b>Salidroside</b>	≥1%	4.45%	HPLC
<b>Sulphate Residue</b>	≤5%	3.16%	USP25
<b>Loss on Dry</b>	≤5%	4.55%	USP25
<b>Bulk Density (g/ml)</b>	0.25~0.40	Complied	
<b>Heavy Metals</b>	≤10ppm	Complied	USP25
<b>Arsenic</b>	≤2ppm	Complied	USP25
<b>Solvents residue</b>			
<b>Ethanol</b>	≤1000ppm	Complied	GC
<b>Pesticides Residue</b>	≤100ppb	Complied	GC
<b>Microbiological Specifications</b>			
<b>Total Aerobic (CFU/g)</b>	≤1000	Complied	USP25
<b>Mold and Yeast (CFU/g)</b>	≤100	Complied	USP25
<b>E. Coli</b>	Negative	Negative	USP25
<b>Salmonella</b>	Negative	Negative	USP25
<b>Irradiated Statement</b>			
Non-Irradiated			

Figura 54. Laudo de análise da L-carnosina.

广州格林泰克化学技术有限公司 <b>Greensyn™(Guangzhou) Co.,Ltd</b>											
<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>											
DATE OF REPORT: 31 JAN 2008											
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3">PRODUCT NAME: L-CARNOSINE</td> </tr> <tr> <td>BATCH NO.: 080110</td> <td colspan="2">BATCH QUANTITY: 10 KG</td> </tr> <tr> <td>MANUFACTURING DATE: 31 JAN 2008</td> <td colspan="2">EXPIRY DATE: 30 JAN 2010</td> </tr> </table>			PRODUCT NAME: L-CARNOSINE			BATCH NO.: 080110	BATCH QUANTITY: 10 KG		MANUFACTURING DATE: 31 JAN 2008	EXPIRY DATE: 30 JAN 2010	
PRODUCT NAME: L-CARNOSINE											
BATCH NO.: 080110	BATCH QUANTITY: 10 KG										
MANUFACTURING DATE: 31 JAN 2008	EXPIRY DATE: 30 JAN 2010										
<b>ITEMS</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>RESULTS</b>									
Appearance	White or almost white powder	Complies									
Odour	Characteristic	Complies									
Identification (IR)	Meets the requirements	Complies									
Loss on drying	≤1.0%	0.28%									
Heavy metals	≤10ppm	<10ppm									
Arsenic	≤1ppm	<1ppm									
Residue on Ignition	≤0.10%	0.04%									
Specification rotation	+20.0° to +22.0°	+20.6°									
Melting Point	250 ~ 265°C	Complies									
pH (in 2% water)	7.5 ~ 8.5	8.2									
L-Histidine (TLC)	≤1.0%	Complies									
β-Alanine (TLC)	≤0.1%	Complies									
Mold & Yeast	≤300/g	Not Detectable									
E.Coli	Negative	Not Detectable									
Salmonella	Negative	Not Detectable									
Hydrazine content	Not Detectable	Not Detectable									
Particle size	100% through 100mesh	Complies									
Loose bulk density		0.276g/ml									
Assay	99.0% to 101.0%	99.02%									
<hr/> <b>CONCLUSION: Conforming to the Factory Standard</b> <hr/>											

**Figura 55.** Avaliação da concentração total de rosavins em ARRLC.

