**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC**
**DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

# AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* SOBRE A PREVENÇÃO DO DANO OXIDATIVO CAUSADO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

**MARLON BARG**

**CRICIÚMA-SC**
**2010**

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC**
**DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

# AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *ILEX PARAGUARIENSIS* SOBRE A PREVENÇÃO DO DANO OXIDATIVO CAUSADO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

**MARLON BARG**

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**

**CRICIÚMA-SC**
**2010**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC**
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

# PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a argüição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata Marlon Barg sob o título "Avaliação do efeito do fotoprotetor do extrato de Ilex paraguariensis sobre a prevenção do dano oxidativo causado por radiação ultra-violeta", para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 27 de janeiro de 2010.

**Profa. Dra. Patrica F. Schuck**
Membro Relator

**Prof. Dr. Marcos Marques da S. Paula**
Membro Interno

**Prof. Dr. José Cláudio F. Moreira**
Membro Externo

**Prof. Dr. Emilio L. Streck**
Orientador

**Prof. Dr. João Luciano de Quevedo**
Coordenador do PPGCS

**“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”**

Charles Chaplin

**RESUMO**

A radiação ultravioleta demonstrou ser capaz de causar danos a maior parte do DNA, podendo levar à mutações, que se não forem reparadas podem ocasionar o desenvolvimento de cânceres de pele. Além disso, a radiação solar gera forte estresse oxidativo, aumento de Espécies Reativas de Oxigênio e conseqüente fotoenvelhecimento. Embora existam muitas maneiras pelas quais os cânceres de pele não-melanoma sejam tratados com sucesso é crescente o interesse em desenvolver novos e melhores métodos para sua prevenção. O uso de agentes botânicos para proteção da pele contra os efeitos biológicos adversos resultantes da exposição à radiação solar tem recebido imenso interesse. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades protetoras sobre a prevenção do dano oxidativo da administração oral e tópica do extrato de *Ilex paraguariensis* em ratos submetidos à radiação UVA e UVB. Para tal, ratos Wistar receberam tratamento oral ou tópico com Chá Verde ou Chá Mate, sendo expostos à radiação UVA e UVB por sete sessões, uma hora por dia. No oitavo dia os animais foram sacrificados, sendo coletadas amostras de sangue e pele para avaliação das Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico, dano oxidativo às proteínas e dano ao DNA. Nossos resultados demonstraram que os ratos expostos à radiação ultravioleta apresentaram dano ao DNA no sangue, aumento da carbonilação de proteínas e aumento da peroxidação lipídica, observado nas amostras de pele. O tratamento com Chá Verde e Chá Mate, tanto pela via oral quanto tópica apresentaram efeito protetor sobre o dano ao DNA e peroxidação lipídica. Entretanto, o aumento da carbonilação de proteínas somente foi prevenido nos animais submetidos à aplicação tópica de Mate ou Chá Verde. Com estes resultados podemos concluir que a administração tópica de um gel contendo extrato de *Ilex paraguariensis* pode ser considerada alternativa benéfica na redução dos danos causados pela radiação solar, fornecendo pela primeira vez indícios da atividade fotoprotetora deste extrato.

**Palavras-chave:** fotoproteção, ultravioleta, *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, dano oxidativo, TBARS, DNA.

## ABSTRACT

Ultraviolet radiation has been shown to cause most damage DNA and may lead to mutations, which if not repaired can lead to the development of skin cancers. Moreover, the solar radiation generates strong oxidative stress, an increase Reactive Oxygen and consequent photoaging. Although there are many ways in which the cancers non-melanoma skin are treated successfully is growing interest in developing new and better methods for its prevention. The use of botanical agents to protect the skin against the adverse biological effects resulting from exposure to solar radiation has received enormous interest. The objective of this study was to evaluate the protective properties on the prevention of oxidative damage of oral and topical administration of *Ilex paraguariensis* extract in rats submitted to UVA and UVB. To this end, rats were treated with oral or topical or Tea Green Tea Mate, being exposed to UVA and UVB for seven sessions, one hour per day. On the eighth day the animals were sacrificed and blood samples and skin were collected to assess the species thiobarbituric acid reactive, oxidative damage to proteins and DNA damage. Our results showed that animals exposed to ultraviolet radiation damage to DNA present in the blood, increased protein carbonylation and increased lipid peroxidation observed in the skin samples. Treatment with Green Tea and Mate Tea, both orally and topically showed protective effect on DNA damage and lipid peroxidation. However, the increase in protein carbonylation was only prevented in animals subjected to topical application of green tea or Mate. With these results we can conclude that topical administration of a gel containing extract of *Ilex paraguariensis* may be considered beneficial alternative in reducing the damage caused by solar radiation, providing the first evidence of the photoprotective activity of this extract.

**Keywords:** photoprotection, ultraviolet, *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, oxidative damage, TBARS, DNA.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| 8-OH-dG | 8-hidroxi-desoxiguanina |
| 8-oxo-G | 8-oxo-guanina |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| C | Citosina |
| CK | Creatina quinase |
| DCPs | Dímeros de Ciclobutano Pirimidina |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DNAmt | DNA Mitocondrial |
| EGCG | Epigalocatequina-3-galato |
| IL | Interleucina |
| IR | Infravermelha |
| Km | Quilômetro |
| MMPs | Metaloproteinases de Matriz (do inglês *Matrix Metalloproteinases*) |
| $N_2$ | Gás Nitrogênio |
| nm | Nanômetro |
| p53 | Relativo ao gene supressor tumoral p53 |
| PCR | Fosfocreatina |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) |
| TBARS | Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acid reactive substances*) |
| TNF alfa | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| T | Timina |
| UV | Ultravioleta |
| UVA | Ultravioleta A |
| UVB | Ultravioleta B |

| | |
|---|---|
| UVC | Ultravioleta C |
| VIS | Visível |

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação esquemática da penetração cutânea dos raios solares.....**11**

**Figura 2**: Representação esquemática da formação dos fotoprodutos..... **12**

**Figura 3:** Alterações no DNA mitocondrial promovidas pela radiação ultravioleta..... **14**

**Figura 4:** *Sunburn Cell*, célula apoptótica induzida pela radiação UV..... **15**

**Figura 5:** Acumulação de p53 na epiderme humana exposta à radiação UV..... **16**

**Figura 6:** Exemplo esquemático do desenvolvimento do câncer pelo envelhecimento cronológico ou pelo dano provocado pela radiação solar..... **17**

**Figura 7:** Oxidação da base guanina após a geração de ROS.....**18**

**Figura 8:** Países cuja produção de *I.paraguariensis* exerce importante papel socioeconômico.....**21**

**Figura 9:** *Ilex paraguariensis*..... **22**

**Figura 10:** Principais constituintes fotoquímicos encontrados no *Ilex paraguarienses*.....**23**

**Figura 11:** Principais polifenóis encontrados no Chá Verde (*Camellia sinensis*).....**25**

# SUMÁRIO

**1. Introdução.....11**

1.1 Entendendo a Radiação Solar.....11

1.2 Radiação UV e Dano ao DNA.....12

1.3 Relação entre Exposição UV e Fotoenvelhecimento.....13

1.4 UV induz dano ao DNA e desencadeia a imunossupressão.....15

1.5 Relação entre Exposição UV e Câncer de Pele.....16

1.6 Mitocôndria e o Envelhecimento Celular.....18

1.7 Importância da inibição das ROS geradas pela Radiação UV.....19

1.8 Uso de Fotoprotetores.....19

1.8.1 O papel dos componentes botânicos na prevenção do envelhecimento e imunossupressão induzida por UV .....20

1.8.1.1 *Ilex paraguariensis* – Erva com importante papel socioeconômico.....21

1.8.1.2 *Ilex paraguariensis*: Erva Mate como Agente Fotoprotetor Oral e Tópico.....22

1.8.1.3 Constituintes e Propriedades do I.paraguariensis.....22

1.8.2 Chá Verde: Rico em Polifenóis.....23

1.8.2.1 Chá Verde: Extensos estudos demonstram sua capacidade antioxidante e fotoprotetora tanto pela via oral quanto tópica.....25

**2. Objetivos .....27**

2.1. Objetivos Gerais.....27

2.2. Objetivos Específicos.....27

**3. Resultados.....28**

**4. Discussão.....48**

**5. Conclusões.....52**

**6. Literatura Consultada .....53**

# INTRODUÇÃO

## 1.1 Entendendo a Radiação Solar

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação de ondas eletromagnéticas que são divididas em três comprimentos de ondas principais: visível (VIS), infravermelha (IR) e Ultravioleta (UV) (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

A radiação UV (Figura 1) é dividida em: (1)UVC - 270-290nm, que é filtrada na camada de ozônio e estratosfera); (2)UVB - 290-320nm, que afetam principalmente a camada epidermal, onde causa eritema, induz lesões ao DNA e aumenta o risco de mutações fatais que eventualmente desencadeiam o câncer de pele e reduz as chances das células malignas serem reconhecidas e destruídas, uma vez que promove fotoimunossupressão; (3)UVA - subdividida em UVA II (320-340nm) e UVA I (340-400nm) (Kallavanijaia & Lim, 2005). Em virtude do maior comprimento de onda, os raios UVA alcançam a camada dérmica, estimulam a pigmentação e estão relacionados ao envelhecimento e cânceres de pele (Ciba Specialty Chemicals, 2002).

Na pele, esta radiação é absorvida por diferentes cromóforos na pele, como a melanina, DNA, RNA, proteínas, lipídeos, água, aminoácidos aromáticos (como a tirosina e triptofano), ácido trans-urocânico, etc (González *et al*., 2008).

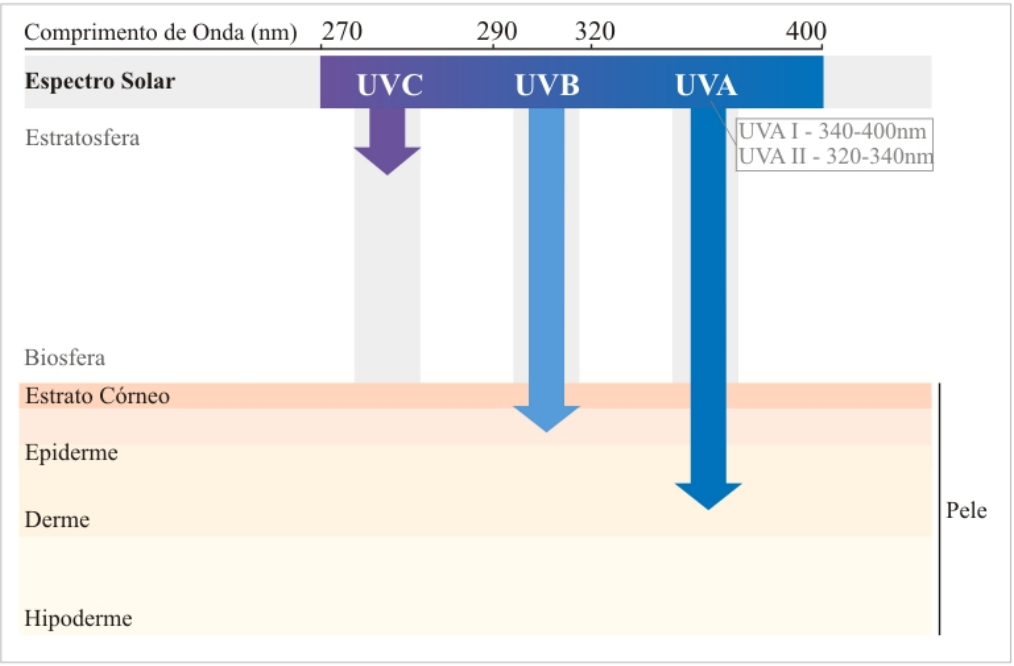


**Figura 1:** Representação esquemática da penetração cutânea dos raios solares (FONTE: Ciba Specialty Chemicals, 2002).

Tanto a qualidade quanto a quantidade da radiação solar UV são modificadas pela passagem através da atmosfera. As principais interações ocorrem na estratosfera (~10-50 km acima do nível do mar), onde ocorre absorção desta radiação na camada de ozônio e difusão pelas moléculas de $N_2$ e $O_2$. Na troposfera (0 a ~10km acima do nível do mar) a absorção pelos poluentes como ozônio, $NO_2$ e $SO_2$, e a difusão por pelos particulados e nuvens também atenuam este processo (Diffrey, 2002).

## 1.2 Radiação UV e Dano ao DNA

A luz UV demonstrou ser capaz de causar danos na maior parte do DNA pela formação de fotoprodutos diméricos (Figura 2) entre bases pirimidinas adjacentes de uma mesma fita de DNA, conforme demonstrado através de estudos experimentais (Marrot & Meunier, 2007).

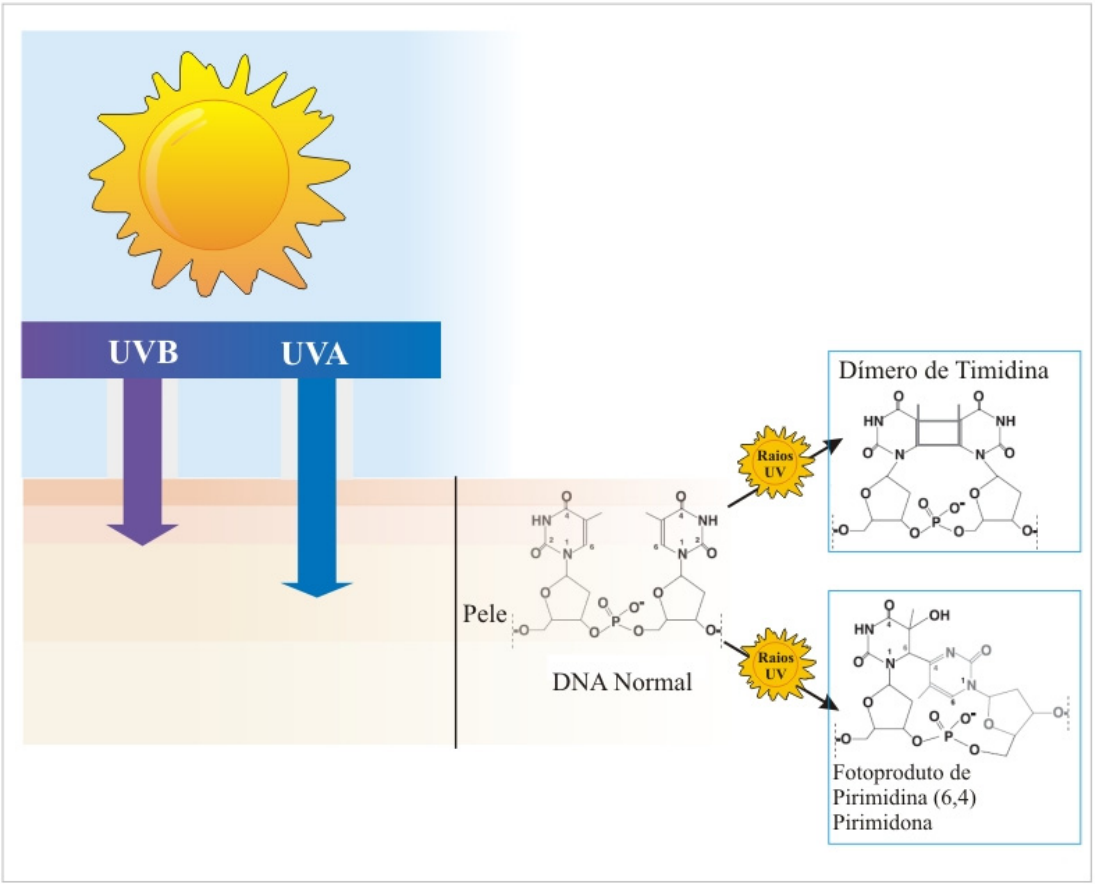


**Figura 2:** Representação esquemática da formação dos fotoprodutos.

Diferentes comprimentos de onda de luz UV induzem a diferentes tipos de dano ao DNA. Através da excitação direta da molécula de DNA, os raios UVB geram os fotoprodutos, principalmente dímeros de ciclobutano pirimidina (DCPs) e fotoprodutos pirimidina 4,6 pirimidona Estes fotoprodutos geram mutações típicas, denominadas Transições C→T, através da perda de ligação da adenina oposta à citosina durante a replicação. Algumas mutações são comumente encontradas em cânceres UV-induzidos, mas são raras em tumores internos. Estas transições, incluindo CC→TT levam às mutações, sendo denominadas "Mutações com assinatura UV", e são de fato consideradas as maiores lesões pré-mutagênicas desencadeadas por UVB (Rünger & Kappes, 2008).

Em curto prazo, a radiação aguda (dose única) induz lesões ao DNA, como dímeros de ciclobutano pirimidina e fotoprodutos, que podem levar a mutações do DNA caso não sejam reparados (Matsumura & Ananthaswamy, 2004). Estes DCPs têm sido reconhecidos como importantes gatilhos moleculares para a supressão das respostas imunes e iniciação da carcinogênese UV-induzida (Katiyar, 2007).

Embora se saiba que os raios UVB possam causar danos a proteínas ou membranas celulares e gerar o estresse oxidativo, aceita-se que seus principais efeitos deletérios sejam mediados por lesões específicas do DNA, decorrentes da absorção direta de fótons. Estas lesões têm sido relatadas por desempenharem um papel importante na indução de efeitos letais, mutagênicos e carcinogênicos decorrentes da exposição UV (Marrot & Meunier, 2007).

A radiação UVA atinge a Terra cerca de 20 vezes mais que a radiação UVB, assim como intensidade da radiação recebida depende da hora do dia, latitude e condições atmosféricas (Russo & Halliday, 2006).

### 1.3 Relação entre Exposição UV e Fotoenvelhecimento

Com o passar dos anos, as mudanças no estilo de vida têm levado as pessoas ao significativo aumento da exposição solar, proporcionando dramática ascensão na incidência dos cânceres de pele (Botta *et al.*, 2008). A exposição crônica da pele humana à radiação UV ocasiona mudanças morfológicas, estruturais e bioquímicas (Bosset, 2003). Estas mudanças que podem ser observadas na pele incluem inflamação, imunossupressão, alterações na matriz extracelular. Em adição, o envelhecimento cutâneo acelerado, resultante do dano ao tecido conectivo, é o reflexo da destruição do colágeno pré-existente, como também é resultante da deficiência em sintetizar e repor o conteúdo deste tecido com novo colágeno (Kim *et al.*,

2008), apresentando acumulação massiva de fibras elásticas anormais, perda de colágeno, aumento de glicosaminoglicanos e presença de telangiectasias (Bosset, 2003).

Nos fibroblastos humanos dérmicos, a exposição persistente à radiação UV induz à mutações no DNAmt e resulta num ciclo vicioso que leva à inadequada produção de energia e estresse oxidativo crônico. Como conseqüências desta situação as telomerases iniciam a resposta ao dano ao DNA, ocasionando a senescência celular. O padrão da expressão genética dos fibroblastos dérmicos é alterado e induz à neovascularização, distúrbios do metabolismo de colágeno e promove a geração de infiltrados inflamatórios e proteínas intracelulares, que podem ser oxidadas e eventualmente levar à inibição dos proteasomas com conseqüências funcionais que se manifestam extracelularmente. Em adição, a radiação UV (sem a indução das mutações ao DNAmt) causa diretamente alterações funcionais e estruturais entre a derme e a epiderme (como por exemplo, mutações ao p53) que contribui ao envelhecimento prematuro da pele (Figura 3) (Gilchrest & Krutmann, 2006).

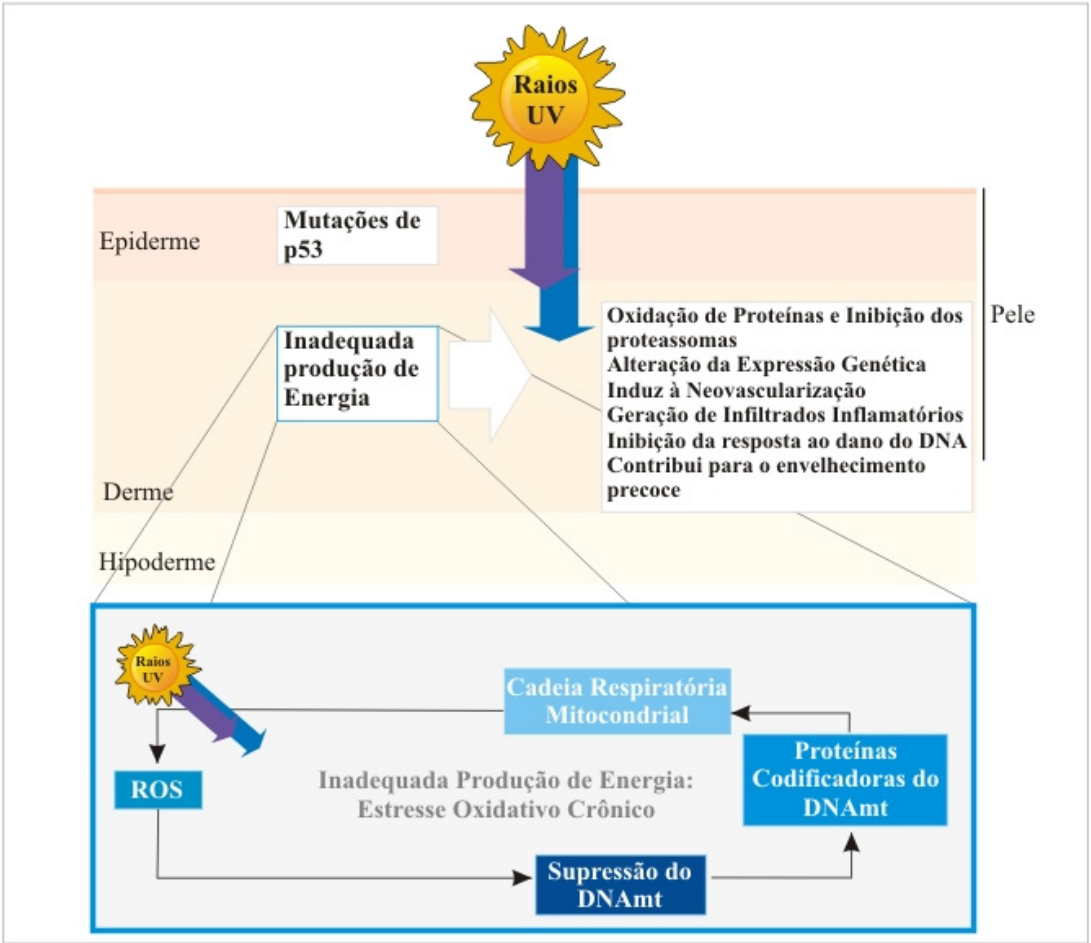


**Figura 3:** Alterações no DNA mitocondrial promovidas pela radiação ultravioleta. (**Adaptado de:** Gilchrest & Krutmann. Skin Aging, 2006).

Um dos principais efeitos da radiação solar em células humanas é a indução à apoptose (também chamada de morte celular programada), que é o principal processo pelas quais as células morrem. A apoptose é necessária para o desenvolvimento normal e manutenção da homeostase celular, atuando como um mecanismo par remover células que estão infectadas, lesionadas ou que não são mais necessárias (Tuchinda *et al.*, 2007).

## 1.4 UV induz dano ao DNA e desencadeia a imunossupressão

O dano ao DNA induzido pela radiação ultravioleta é um evento importante para a migração das células apresentadoras de antígenos (como por exemplo, as células de Langerhans na epiderme) a partir da pele até os linfonodos. O dano ao DNA nas células apresentadoras de antígenos afeta a capacidade destas células apresentarem os antígenos, o que resulta na falta de sensibilização, o que pode ser considerado como o primeiro dos eventos moleculares no desenvolvimento da imunossupressão (Katiyar, 2007).

A função imunorregulatória na pele é de extrema importância (principalmente a IL-12), uma vez que são as responsáveis em remover (ou reparar) o dano ao DNA UV-induzido na pele (Vink *et al.* 1997). Dependendo da severidade do dano ao DNA seguido da exposição UV, os queratinócitos cutâneos podem progredir a apoptose destas células ou iniciar cascatas de reparo ao DNA. Se o dano ao DNA for irreparável, a célula é transformada numa *Sunburn Cell* (Figura 4), que é o primeiro indicador morfológico da apoptose celular das células epidermais (Schwarz *et al*. 2005; Ziegler *et al*. 1994).

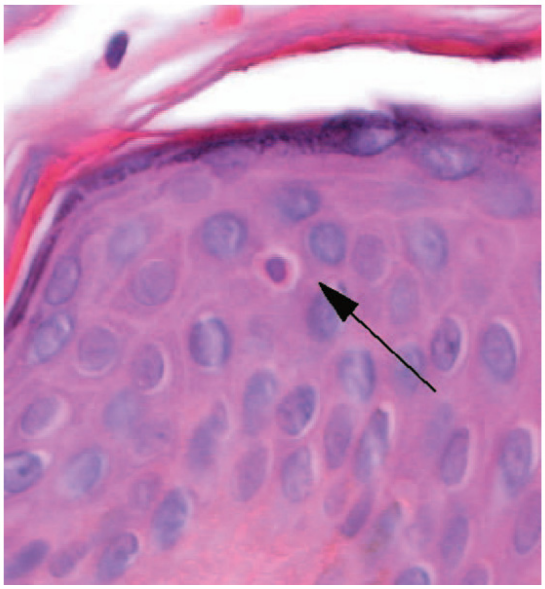

**Figura 4:** *Sunburn Cell*, célula apoptótica induzida pela radiação UV.

(**Extraído de:** Rigel *et al.* Photoaging, 2004.)

## 1.5 Relação entre Exposição UV e Câncer de Pele

A pele é o órgão mais exposto à radiação ultravioleta (UV) e também o órgão mais afetado por sua exposição crônica. Muitos estudos *in vivo* com células de pele têm demonstrado que a radiação UV pode causar danos há muitas moléculas e estruturas. Isto pode resultar em mudanças de funções celulares.

Estudos clínicos, epidemiológicos e biológicos têm apresentado que a luz solar ultravioleta, especialmente a radiação UVB (290-320nm), é um agente carcinogênico completo, e repetidas exposições podem desencadear o câncer de pele melanoma e não-melanoma, considerados a patologia cutânea maligna mais comum, e que exerce um tremendo impacto nos serviços de saúde pública, como também elevados gastos com a saúde (Vavalil *et al.*, 2003).

Acredita-se que o gene supressor p53, que se apresenta freqüentemente mutado nos cânceres de pele, seja o ponto inicial para a radiação UV induzir o neoplasma (Rigel, 2008). Achados experimentais mostram que doses cumulativas de UVA são capazes de induzir danos genéticos no DNA celular, o qual pode levar aos fotoenvelhecimento da pele, alterar a expressão de oncogenes, genes supressores tumorais (como o p53) e carcinoma cutâneo. Uma dose eritematogênica induz à rápida acumulação de p53 na epiderme. Avaliar como um agente fotoprotetor possa agir reduzindo a expressão de p53 pode fornecer dados interessantes sobre a capacidade fotoprotetora destes produtos (Seité *et al.*, 2000).

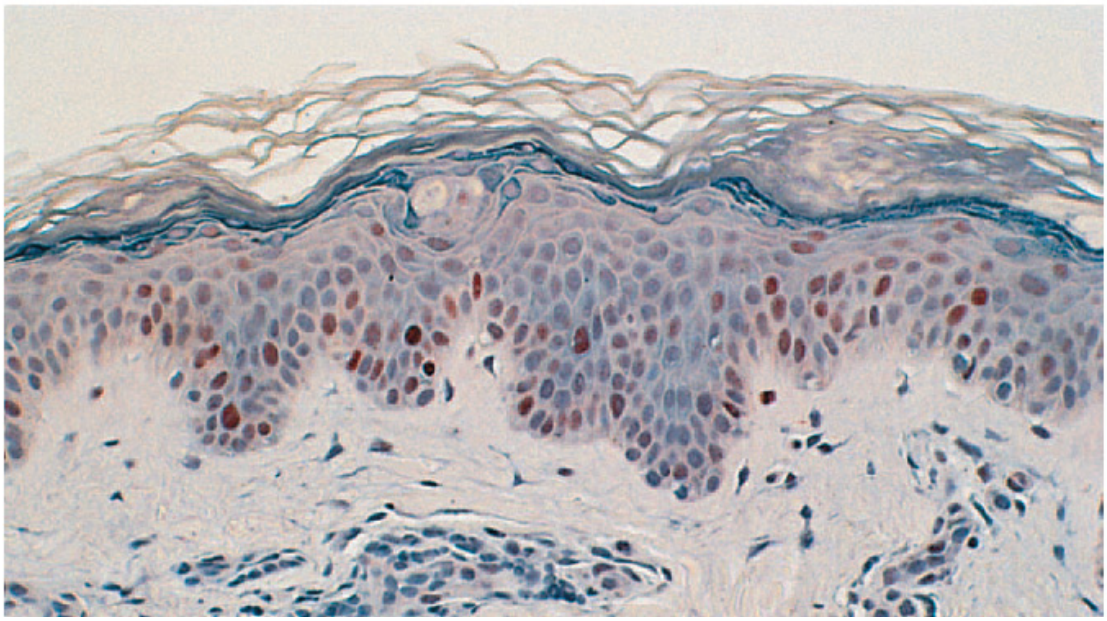

**Figura 5:** Acumulação de p53 na epiderme humana exposta à radiação UV.

(**Extraído de:** Rigel *et al.* Photoaging, 2004.)

Cânceres foto-induzidos fazem parte de um complexo fenômeno que envolve múltiplos estágios, sendo mediados por alterações em vários mecanismos celulares (Figura 6). A iniciação celular é geralmente considerada como o primeiro passo no processo de fotocarcinogênese, consistindo essencialmente em mutações genéticas, às quais promovem mutações no DNA (Botta *et al.*, 2008). O DNA é um alvo crítico porque sua alteração pode levar ao desenvolvimento do câncer de pele (Marrot & Meunier, 2008). Há muitos estudos que confirmam que a exposição à radiação UV está associada ao desenvolvimento do câncer de pele (Rigel, 2008).

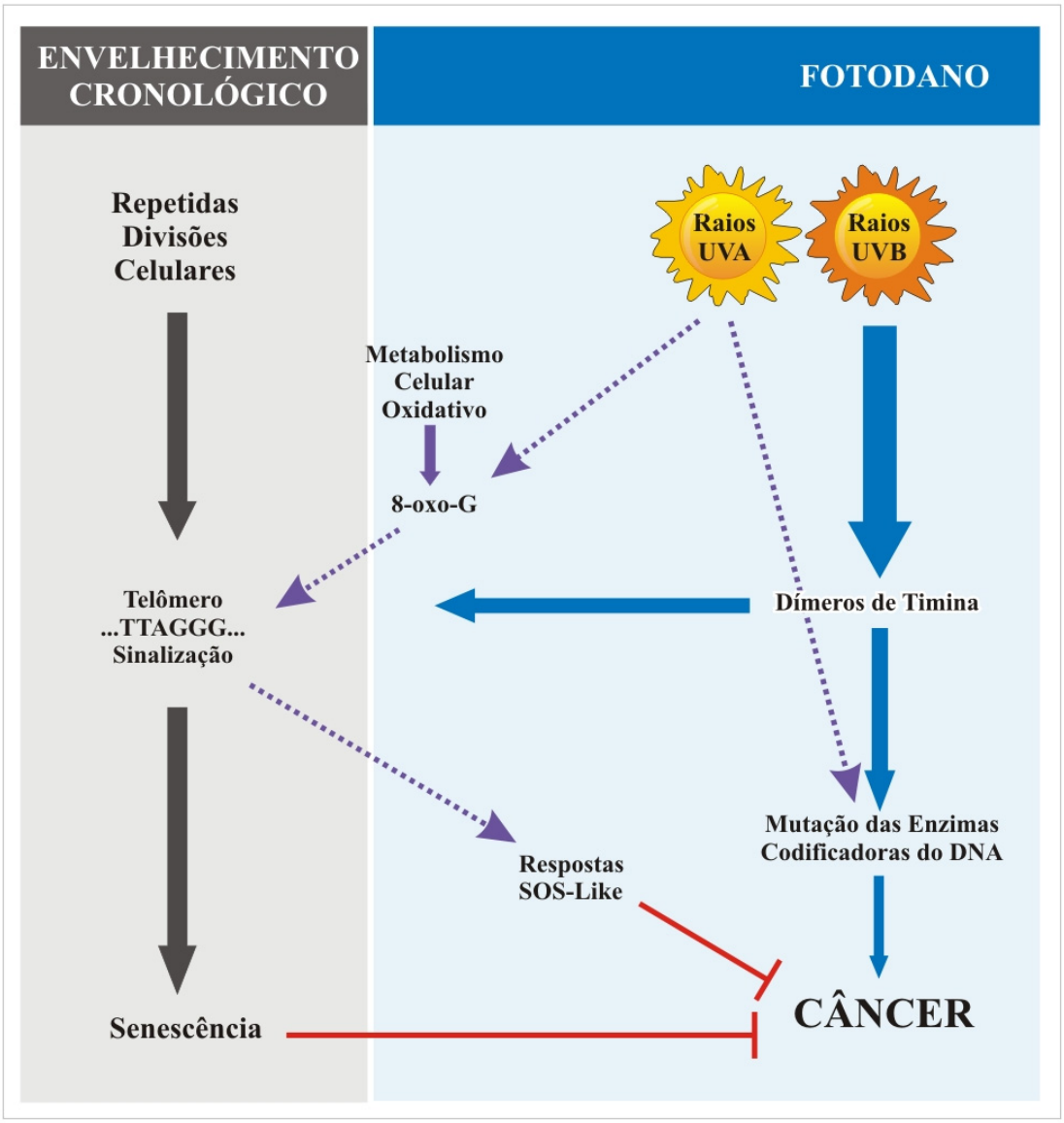


**Figura 6:** Exemplo esquemático do desenvolvimento do câncer pelo envelhecimento cronológico ou pelo dano provocado pela radiação solar.

(**Adaptado de:** Rigel *et al.* Photoaging, 2004.)

## 1.6 Mitocôndria e o Envelhecimento Celular

Sabe-se que a mitocôndria pode ser considerada a estrutura mais poderosa da célula, uma vez que é a responsável pela produção de energia, sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) e calor, além de estar envolvida na via de sinalização celular para apoptose (Pieczenik & Neustadt, 2007).

A mitocôndria apresenta-se especialmente vulnerável ao estresse oxidativo a partir das ROS (Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), principalmente o radical superóxido, que são produzidos durante o processo de fosforilação oxidativa. Isto resulta num ciclo vicioso proporcionando danos na mitocôndria, a qual perde sua eficiência e produz mais ROS, as quais acreditam que sejam geradas pelos complexos I e III. A teoria do estado de envelhecimento relaciona que este é conseqüência de reações de radicais livres. (Corstjens *et al.*, 2007).

A radiação UV é conhecida como a causadora da liberação de várias espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* (Fisher et al., 2002; Berneburg et al., 1999).

Em resposta à radiação, as ROS podem ser geradas para oxidar a base guanina em 8-hidroxiguanina ou 8-oxiguanina (Figura 7). Dentro da mitocôndria, os elementos que são particularmente vulneráveis aos radicais livres incluem os lipídeos, proteínas, fosforilação de enzimas e DNA mitocondrial (Shigenaga *et al.*, 1994).

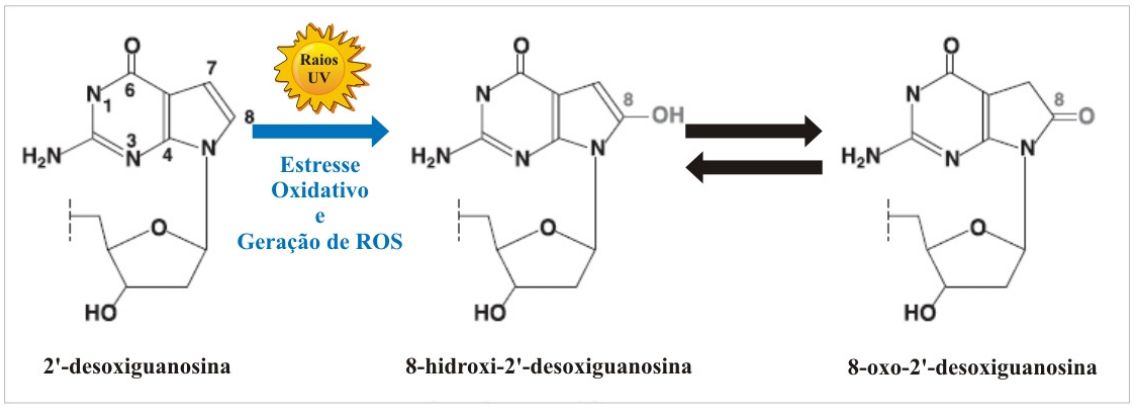


**Figura 7:** Oxidação da base guanina após a geração de ROS.

O crescente aumento da produção de ROS conseqüentes da radiação solar potencializa a sinalização redox e ativam genes específicos como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Recentemente descobriu-se que o dano oxidativo dos componentes celulares e extracelulares ativa mecanismos de reparo intrínsecos e que na epiderme há um sistema transportador de

creatina, o PCR/CK (fosfocreatina/creatina quinase), importante ferramenta para enfrentar eficientemente condições com alta demanda de energia (Lenz *et al*., 2004).

A concentração de PCR na pele normal é de 0,314µM/g de tecido, mas concentrações muito maiores são encontradas na pele psoriática e na pele com tumores benignos e malignos. Pesquisadores demonstraram que quando incorporada em um produto de uso tópico, a fosfocreatina não apenas protege a pele do dano UV-induzido, como também pode reverter o fotodano e melhorar a sua aparência clínica. Quando administrada intravenosamente, a PCR pode aumentar o processo de cicatrização de feridas e o tempo de sobrevivência das células de retalho cutâneo (Zemtsov, 2007).

Quando ocorre dano direto às proteínas mitocondriais, há diminuição de afinidade pelos substratos ou coenzimas, favorecendo danos adicionais resultantes da disfunção de seu metabolismo (Pieczenik & Neustadt, 2007).

## 1.7 Importância da inibição das ROS geradas pela Radiação UV

Inibir a produção das ROS apresenta-se particularmente promissora com a produção destas, tanto pela radiação UVA quanto UVB, contribuindo com a redução da inflamação, immunossupressão, mutação genética e carcinogênese (Kvan & Tyrrell, 1997). Sabe-se que mediadores inflamatórios, como o TNF-alfa, estão associados com disfunção mitocondrial e aumento da geração de ROS, conforme (Moe *et al.* 2004) apresentaram em seus estudos in vitro (Moe *et al.* 2004).

Interações de proteínas com ROS atuam controlando as regras da sinalização celular que afetam o remodelamento, crescimento e morte. Marcadores detectáveis de proteínas oxidadas incluem mudanças no conteúdo de carbonilas protéicas, nitrotirosinas, produtos resultantes de glicação avançada e mudanças no conteúdo de proteínas tióis. Cisteínas também são alvos susceptíveis a vários pró-oxidantes (Aksenov & Markesbery, 2001).

## 1.8 Uso de Fotoprotetores

Embora existam muitas maneiras pelas quais os cânceres de pele não-melanoma sejam tratados com sucesso, é crescente o interesse em desenvolver novos e melhores métodos para sua prevenção. Os programas de prevenção primária para câncer de pele que focam na redução da exposição á radiação solar têm apresentado efeitos positivos na redução da incidência de câncer de pele. Além disso, a redução da exposição solar com o uso diário de

fotoprotetor pode reduzir o risco do carcinoma celular escamoso (Rigel, 2008). Os métodos atuais incluem aconselhamento dos pacientes sobre os perigos da exposição solar, horários onde a radiação solar atinge o seu pico de intensidade máxima, uso de roupas protetoras e filtros solares. Entretanto, é importante lembrar, que a eficácia dos filtros solares é determinada apenas pela capacidade destes em proteger contra queimaduras UV-induzidas, e suas atividades quimioprotetoras para cânceres de pele não-melanoma, pelo menos em humanos, continuam indeterminadas (Yusuf *et al.*, 2007).

Fotoprotetores tópicos contendo filtros UV são recomendados como práticas de exposição solar para reduzir os efeitos carcinogênicos e o fotodano proporcionado pela radiação UV (Hanson *et al.*, 2006). Recentemente, vários fotoprotetores orais que forneçam ampla proteção corporal têm sido comercializados. Estes produtos contêm vários princípios ativos capazes de atuar em diferentes mecanismos para prevenir o dano solar cutâneo. A maioria apresenta atividade antioxidante capaz de manter a atividade antioxidante endógena durante a exposição UV (González *et al.*, 2008). Os filtros solares tradicionais são formulados com substâncias que atuam como filtros ou refletores UV e são testados de acordo com o nível de proteção contra queimadura ou eritema (Russo & Halliday, 2006).

### 1.8.1 O papel dos componentes botânicos na prevenção do envelhecimento e imunossupressão induzida por UV

O uso de agentes botânicos para proteção da pele contra os efeitos biológicos adversos resultantes da exposição à radiação solar tem recebido imenso interesse (Vavalil *et al.*, 2003), incluindo seu uso na redução do risco de desenvolvimento de cânceres melanoma e não-melanoma. Os agentes botânicos possuem propriedades antiinflamatórias, imunomodulatórias e antioxidantes e estão entre os mais promissores grupos de compostos que podem ser explorados como agentes fotoquimiopreventivos ideais para as doenças de pele (Katiyar, 2007).

A fotoquimioprevenção é um termo que definido como "o uso de agentes capazes de reverter os efeitos adversos da radiação UV na pele" (F'guyer *et al.*, 2003). A identificação de componentes orgânicos a partir de extratos de plantas é de grande importância, principalmente porque estas podem ser utilizadas como excelente fonte de produtos farmacêuticos para fototerapia. Considerando que os extratos de plantas são misturas complexas de compostos orgânicos, técnicas adequadas de extração são necessárias para assegurar a melhor maneira de analisar seus constituintes individualmente (Jacques *et al.*, 2007).

Desde que o estresse oxidativo foi fortemente ligado à disfunção mitocondrial, o antioxidante catalase foi selecionado como o primeiro alvo. O segundo alvo deste processo foi a creatina quinase, uma enzima crucial para a liberação de ATP nos momentos que a célula necessita de alta demanda de energia. Com o propósito de manter a capacidade bioenergética da pele, faz-se necessário o descobrimento de componentes que sejam capazes de atuar como agentes varredores ou detoxificantes e que protejam contra as ROS formadas pelas diferentes fontes, incluindo a radiação solar (Corstjens *et al.*, 2007).

O óxido nítrico (NO) é outro radical livre produzido na pele, em resposta à radiação UVA e UVB, atuando como marcado do fotodano. O NO regula múltiplos processos biológicos e também se combina com o superóxido para formar peroxinitrito, um oxidante altamente reativo (Russo & Halliday, 2006).

#### 1.8.1.1 Ilex paraguariensis – Erva com importante papel socioeconômico

A *Ilex paraguariensis* A. St. –Hill, é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, onde é popularmente conhecida como erva-mate e utilizada no preparo de uma bebida típica, o chimarrão. Assume um papel socioeconômico de grande importância na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, marcados com os números 1,2,3,4, no mapa abaixo, respectivamente (Figura 8) , alcançando a produção anual de 500.000 toneladas (Bassani *et al.*, 2006).

**Figura 8:** Países cuja produção de *I.paraguariensis* exerce importante papel socioeconômico.

### 1.8.1.2 Ilex paraguariensis: Erva Mate como Agente Fotoprotetor Oral e Tópico

O Brasil possui extensa variedade de vegetais que podem contribuir como inexaustiva fonte de enzimas para aplicação em diversas áreas (Ceni *et al.*, 2008). A literatura demonstra que de todas as espécies de Ilex, o *Ilex paraguariensis* (Figura 4) tem apresentado a maior atividade antioxidante, diretamente relacionada à quantidade de derivados de cafeoil. A capacidade do Mate em "varrer" as ROS está diretamente co-relacionada à sua atividade peroxidase-like. Quanto maior a concentração de polifenóis, maior é esta atividade (Ceni *et al.*, 2008).

Recentemente, pesquisas publicadas têm demonstrado cientificamente os efeitos do *I.paraguariensis* (Figura 9), que incluem as atividades quimiopreventivas (prevenindo o dano celular que pode causar doenças crônicas), efeitos coleréticos e propulsão intestinal, efeitos vasodilatadores, inibição da glicação (reação enzimática entre açúcares sanguíneos, proteínas e lipídeos, formando produtos que se acumulam e promovem locais estáveis para a catalisação da formação de radicais livres e aterosclerose (Martins *et al.* 2009).

**Figura 9:** Ilex paraguariensis.

**Extraído de:** Barnes et al. Herbal Medicines, 3th edition, 2007.

### 1.8.1.3 Constituintes e Propriedades do *I.paraguariensis*

Os flavonóides são compostos fenólicos (polifenóis) largamente distribuídos nas plantas e o seu consumo está associado à prevenção do envelhecimento relacionado a condições crônicas, incluindo o câncer e doenças cardiovasculares. Suas propriedades medicinais incluem estimulação ao sistema nervoso central, efeitos diuréticos e antioxidantes

(Mejia *et al.*, 2005). Os polifenóis têm sido apresentados como potentes antioxidantes e varredores de ROS, que incluem radicais livres de lipídeos, radicais superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet*. A propriedade anti-radicalar depende da estrutura específica de cada polifenol (F'guyer *et al.*, 2003).

As enzimas presentes no *Ilex paraguariensis* são principalmente polifenóis oxidases (catalisadoras de duas reações que envolvem o oxigênio: a O-hidroxilação dos monofenóis para o-difenóis (atividade creolase) e a subseqüente oxidação destes o-difenóis para o-quinonas (atividade catecolase). Além destas enzimas, esta planta contém as peroxidades, um grupo de heme-proteínas que atuam na oxidação de substratos (monofenóis, difenóis, etc). Ambas são responsáveis pela qualidade da deterioração e coloração marrom das folhas secas do mate. Ao submeter as folhas desta ao processo industrial e ao sapeco, estas enzimas são inativadas e então o chá mantém a coloração esverdeada (Ceni *et al.*, 2008).

Os maiores constituintes encontrados na erva-mate (Figura 10) são a cafeína e o ácido hexadecanóico (Jacques et al., 2007), flavonóides, minerais (P, Fe e Ca) e vitaminas C, B1 e B2 (Mejia et al., 2005). Estudos recentes publicados por Gnoatto e colaboradores (Gnoatto et al., 2008) ainda apresentam que as folhas do Ilex paraguariensis contém principal flavonóide a rutina, ácidos clorogênicos (derivados do ácido cefeoilalquínico) e significante porção de saponinas triterpênicas (cerca de 10%), contendo como principal aglicona o ácido ursólico (Gnoatto *et al.*, 2008).

**Figura 10:** Principais constituintes fotoquímicos encontrados no *Ilex paraguarienses.*

Os compostos triterpênicos (ácido ursólico ou oleanólico e vários outros derivados) tem apresentado diversas propriedades biológicas e farmacológicas, como ação anti-HIV, hepatoproteção, atividades antiinflamatórias, citotóxicas ou antimicrobianas, as quais têm sido relatadas em algumas revisões (Gnoatto *et al.*, 2008).

Estudos recentes publicados por Mejia *et al*. (2005) relatam que este extrato não apenas exerce efeito citotóxico sobre as células de hepatoma (HepG2), mas também atuam como inibidores catalíticos da topoisomerase II (Topo II) (Mejia *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos do mate, a capacidade de "varrer" os radicais livres e as propriedades antioxidantes dos polifenóis contidos no chá são freqüentemente citados como os mais importantes. De fato, os extratos do mate apresentam-se como inibidores da peroxidação lipídica e há muitas evidências suportando as funções antioxidantes através de ensaios de atividade antioxidante realizados *in vitro* (Martins *et al.* 2009).

O Mate é comercializado em preparações comerciais como estimulante do sistema nervoso central, diurético e antireumático. Lojas especializadas na venda de fitoterápicos na Europa têm utilizado como apelo de venda a utilização desta planta como auxiliar no controle do peso. Em contraste, baseados em estudos clínicos e epidemiológicos, o consumo do Mate está associado ao desenvolvimento de câncer na cavidade oral, faringe e esôfago. Entretanto, não há dados sobre a carcinogenicidade do Mate em modelos animais e este mecanismo é desconhecido (Ramirez-Mares, 2004).

### 1.8.2 Chá Verde: Rico em Polifenóis

O Chá Verde é produzido a partir das folhas frescas da *Camellia sinensis,* através de um processo de fermentação que previne, em sua maior parte, a oxidação e polimerização dos polifenóis da planta. São estes polifenóis que são considerados os maiores mediadores quimiopreventivos. O Chá Verde contém quatro principais polifenóis: (-)-epicatequina; (-)-epicatequina-3-galato; (-)-epigalocatequina e (-)-epigalocatequina-3-galato (Figura 11) (Yusuf *et al.*2007).

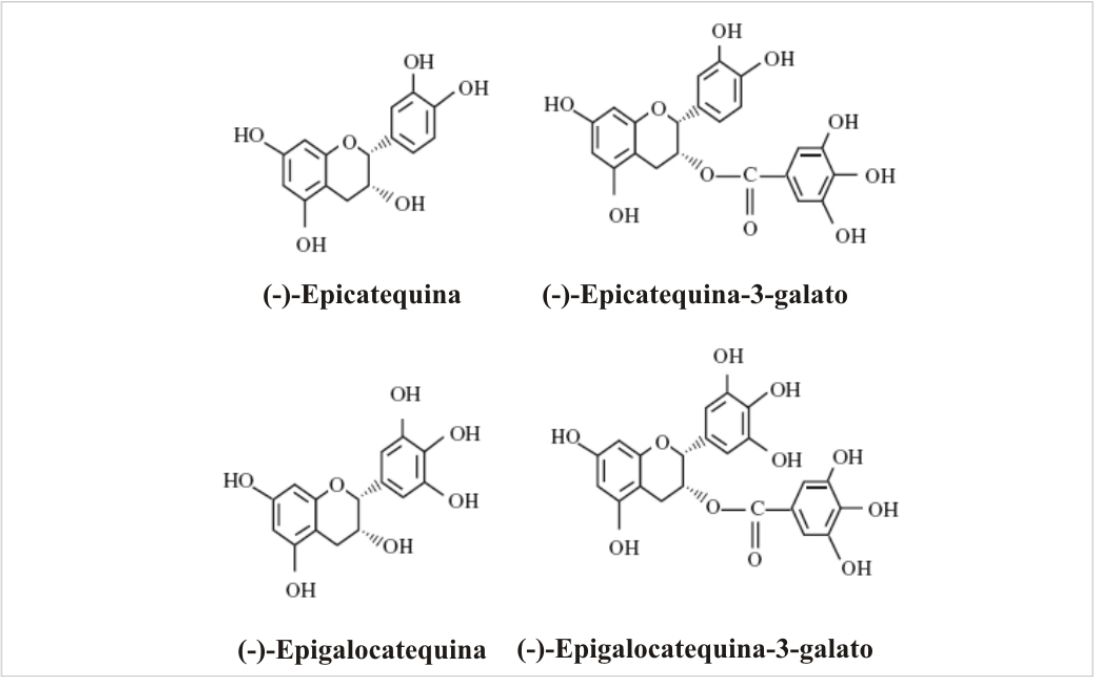


**Figura 11:** Principais polifenóis encontrados no Chá Verde (*Camellia sinensis*).

**Extraído de:** Yusuf *et al.* 2007.

### 1.8.2.1 Chá Verde: Extensos estudos demonstram sua capacidade antioxidante e fotoprotetora tanto pela via oral quanto tópica

Os chás contêm altas concentrações de flavonóides e o seu consumo regular está associado à redução de risco de doenças crônicas, incluindo o câncer e o envelhecimento. Os flavonóides são polifenóis que são largamente distribuídos nas plantas, estando presentes em mais de 4000 espécies. Vários estudos demonstram as propriedades terapêuticas e quimiopreventivas do Chá Verde. Além disso, os estudos demonstram que esta planta apresenta propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e efeitos anticlastogênicos (Ramirez-Mares, 2004).

Sabe-se que a exposição da pele à radiação UV causa diversos efeitos biológicos, incluindo a inflamação, alteração das células imunológicas cutâneas e alterações das respostas imunes na hipersensibilidade de contato (imunossupressão). Ratos da linhagem C3H foram submetidos à radiação UVB a fim de avaliar a proteção exercida pela aplicação de Chá Verde tanto pela via oral quanto tópica. Como resultados os pesquisadores observaram que a aplicação tópica dos polifenóis do Chá Verde (1-6mg/animal), 30 minutos antes ou 30 minutos após a exposição de dose única de UVB (2KJ/$m^2$) resulta em significativa proteção contra imunosupressão local (25-90%) e imunosupressão sistêmica (23-95%). Além disso, a

aplicação do Chá Verde mostrou reduzir em 70-80% o desenvolvimento do processo inflamatório, podendo ser utilizado contra dermatoses inflamatórias e imunossupressão causada pela radiação solar, protegendo a hipersensibilidade de contato e promovendo a integridade das células de Langerhans, mesmo após a irradiação UV (Katiyar *et al*., 1995).

Pesquisadores Americanos da *Case Western Reserve University*, Cleveland, avaliaram os efeitos da aplicação tópica de (-)epigalocatequina-3-galato (EGCG), o polifenol mais encontrado no Chá Verde sobre a infiltração de macrófagos e neutrófilos, fontes potenciais de geração de ROS e prostaglandinas. A aplicação tópica de EGCG (3mg/2.5cm$^2$) antes da exposição à radiação solar bloqueia a infiltração dos leucócitos e reduz a atividade das mieloperoxidades. Com isso, há redução de geração de ROS, e conseqüentemente redução do edema, uma vez que o processo inflamatório é reduzido significativamente (Katiyar *et al*., 1999).

Em virtude do vasto número de publicações relatando as atividades fotoprotetoras do Chá Verde, tanto pela via oral quanto tópica, utilizou-se esta planta como controle positivo.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivos Gerais

Avaliar as propriedades protetoras sobre a prevenção do dano oxidativo da administração oral e tópica do extrato de *Ilex paraguariensis* em ratos submetidos à radiação UVA e UVB.

## 2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a redução de dano ao DNA frente à radiação UVA e UVB em ratos tratados com a aplicação oral ou tópica de *Ilex paraguariensis*;

Comparar o dano ao DNA provocado pela radiação UV em ratos tratados com *Ilex paraguariensis* (Chá Mate) *versus Camellia sinensis* (Chá Verde);

Avaliar a redução do estresse oxidativo frente à radiação UVA e UVB em ratos tratados com a aplicação oral ou tópica de *Ilex paraguariensis*;

Comparar estresse oxidativo provocado pela radiação UV em ratos tratados com *Ilex paraguariensis* (Chá Mate) *versus Camellia sinensis* (Chá Verde);

# 3. RESULTADOS

## Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* extract on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation

Marlon Barg[1], Gislaine T. Rezin[1], Julia S. Vieira[1], Lara M. Gomes[1], Lislaine S. Borges[1], Gabriela C. Jeremias[1], Milena Carvalho-Silva[1], Daniela D. Leffa[2], Fernanda Balbinot[2], Natalia C. Carvalho[2], Francieli Vuolo[1], Fabricia C. Petronilho[1], Vanessa M. Andrade[2], Felipe Dal-Pizzol[1], Emilio L. Streck[1]*

**Artigo submetido para o periódico *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine***

# Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* extract on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation

Marlon Barg[1], Gislaine T. Rezin[1], Julia S. Vieira[1], Lara M. Gomes[1], Lislaine S. Borges[1], Gabriela C. Jeremias[1], Milena Carvalho-Silva[1], Daniela D. Leffa[2], Fernanda Balbinot[2], Natalia C. Carvalho[2], Francieli Vuolo[1], Fabricia C. Petronilho[1], Felipe Dal-Pizzol[1], Vanessa M. Andrade[2], Emilio L. Streck[1]*

[1]Laboratório de Fisiopatologia Experimental and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil; [2]Laboratório de Imunologia e Mutagênese, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

*Corresponding author: E-mail address: emiliostreck@gmail.com

## Abstract

**Background:** Multiple studies have demonstrated a relation between ultraviolet exposure and increased risk of developing skin cancer. In humans and animal models, ultraviolet radiation can cause gene mutations, suppress immunity and induce oxidative stress. Moreover, studies showed that the green tea and mate tea present anti-carcinogenic activity. Based on this hypothesis, the aim of this work was to evaluate the effect of green tea and mate tea on increased barbituric acid-reactive species levels, oxidative damage to proteins and DNA damage caused by exposure to ultraviolet radiation.

**Methods:** Adult male Wistar rats received daily oral or topic green or mate tea treatment and they were after exposed to seven sessions of radiation, one hour per day. On the eighth day, the animals were killed by decapitation. Thiobarbituric acid-reactive species levels, protein oxidative damage and DNA damage were evaluated in blood and skin.

**Results:** Our results showed that the rats exposed to ultraviolet radiation presented DNA damage in blood and increased protein carbonylation and lipid peroxidation in skin. Oral and topic treatment with green tea and mate tea prevented DNA damage and lipid peroxidation. However, only topic treatment with green tea and mate tea prevented the increased protein carbonylation caused by ultraviolet radiation exposure.

**Conclusions:** Taken together, our results give support the beneficial effects of green tea and mate tea, herein demonstrated by the antioxidant properties presented by these teas.


**Key words:** skin cancer; green tea; mate tea; DNA damage; oxidative damage.

## Introduction

Over the years, changes in lifestyle significantly increased human exposition to solar radiation, leading to a dramatic rise in the incidence of skin cancers (1). Photo-induced cancers are due to a complex multistage phenomenon, mediated by alterations in several cellular mechanisms (2).

Increased ultraviolet radiation exposure is considered the main cause of the rise in incidence of skin cancer (3). In humans and animal models, both ultraviolet A and B radiations can cause gene mutations (4,5) and immunity suppression (6,7). These two biological events are related to skin cancer caused by ultraviolet radiation (8). It essentially consists in irreversible genetic alterations, which ultimately leads to DNA mutations (2). Ultraviolet radiations are known to induce DNA lesions, and the implication of ultraviolet A radiations in these genotoxic damages has been recently proven, although their accurate biological effects are still unclear (9).

The reactive oxygen species production by both ultraviolet A and B radiations also contributes to inflammation, immunosuppression, gene mutation and carcinogenesis (10,11). In addition, studies have shown that oxidative stress also can cause DNA damage (12,13). DNA damage can include chemical and structural modifications to purine and pyrimidine bases and 2′-deoxyribose and the formation of single- and double-strand breaks. Strand breaks within DNA can occur either directly due to damage from reactive oxygen species exposure or indirectly due to cleavage of the DNA backbone during DNA base excision repair (14,15).

Studies showed that polyphenols obtained from green tea (*Camellia sinensis*) can reduce ultraviolet radiations-induced skin cancer in animal model (16). Another tea presenting antioxidant properties and protect against DNA oxidation is mate tea *(Ilex paraguariensis)* (17,18).

Considering that ultraviolet radiation exposure induces gene mutations and leads to an increased reactive oxygen species production that contribute to this effect, and that the green tea and mate tea possibly present antioxidant properties and protect against DNA damage, in the present work we evaluated the effect of green tea and mate tea on increased barbituric acid-reactive species levels, oxidative damage to proteins and DNA damage caused by exposure to ultraviolet radiation.

## Materials and methods

*Animals*

Adult male Wistar rats (250-300 g) obtained from Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense were housed in groups of five with free access to food and water and maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am) at a temperature of 22$^{o}$C ± 1$^{o}$C. All experimental procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care, with the approval of local Ethics Committee.

*Oral administration of the extracts*

Green tea extract was obtained from Embrafarma. A solution was prepared by adding 15 mL of distilled water to 1.875 g of green tea extract. For mate tea, we added 20 g of plant leaves to 100 mL of boiling water. After 15 min of extraction, we filtered the solution and administered to the animals. The animals received 1.0 mL of mate tea and green tea solutions daily by gavage, 30 min before the exposure to ultraviolet radiation. Control groups received distilled water.

*Topic administration of the extracts*

The extracts were obtained as described above and were incorporated to base gel (5% w:w). The animals received 1.0 g of gel daily, 30 min before the exposure to ultraviolet radiation. Control groups received base gel without any extract.

*Exposure to radiation*

The animals were exposed to ultraviolet A and B radiations for 7 days. Ultraviolet A and B lamps were positioned 60 cm above the animal cages, they received radiation for one hour per day.

*Experimental Procedure*

Animals were divided into seven groups, as follows: 1) control group, 2) oral saline + ultraviolet radiation, 3) base gel + ultraviolet radiation, 4) oral green tea + ultraviolet radiation, 5) green tea gel + ultraviolet radiation, 6) oral mate tea + ultraviolet radiation, 7) mate tea gel + ultraviolet radiation. Groups 2, 4, and 6 were treated for seven days orally with saline, green tea and mate tea (respectively). Groups 3, 5, and 7 were treated for seven days topically with base gel, green tea gel and mate tea gel saw. After treatment, the animals were exposed to ultraviolet radiation for 1 hour, once a day. Rats were killed 24 hours after the last

exposition to ultraviolet radiation. The blood was collected to evaluate DNA damage and the animal skin was removed to evaluate oxidative damage parameters.

*Comet Assay*

The alkaline Comet Assay in peripheral blood was performed as described by Singh et al. (19) with the modifications suggested by Tice et al. (20). Samples of 5 µL of whole peripheral blood were embedded in 95 µL of 0.75% low-melting point agarose and added to a microscope slide (two slides per donor) precoated with normal agarose (1,5% buffer solution). When the agarose had solidified, the slides they were placed in lysis buffer (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris; pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) for a minimum of 1 h and a maximum of 2 weeks. After treatment with lysis buffer to allow DNA unwinding, slides were incubated in a freshly made alkaline electrophoresis buffer (0.3M NaOH and 1mM EDTA; pH > 13) for 20 min in a horizontal electrophoresis tank and the DNA was electrophoresed for 20 min at 25V (0.90 V/cm) and 300mA. Every step was carried out under indirect yellow light. After electrophoresis, slides were washed three times in a neutralization buffer (0.4M Tris; pH 7.5) for 5 min, rinsed three times in distilled water, and left to dry overnight at room temperature. Slides were stained with silver nitrate as describe previously by Villela et al. (21): the slides were fixed for 10 min in trichloroacetic acid 15% w/v, zinc sulfate 5% w/v, glycerol 5% v/v, rinsed three times in distilled water, and dried for 2 h at 37 °C. The dry slides were re-hydrated for 5 min in distilled water, and then stained (sodium carbonate 5% w/v, ammonium nitrate 0.1% w/v, silver nitrate 0.1% w/v, tungstosilicic acid 0.25%, formaldehyde 0.15% w/v, freshly prepared in the dark), and constantly shaken for 35 min. The stained slides were rinsed twice with distilled water, and submerged in the stop solution (acetic acid 1%), rinsed again, and immediately coded for analysis with an optic microscope. Images of 100 randomly

selected cells were analyzed per individual. Cells were scored visually into five classes, according to tail size and shape (from undamaged - 0, to maximally damaged - 4), and a value (Damage Index) was assigned to each comet according to its class. Damage index thus ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells×0) to 400 (with maximum damage: 100 cells × 4. The Damage Frequency (%) was calculated based on the percentage of damaged cells (0 - 100%). International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. It has a high correlation with computer-based image analysis (22).

*Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)*

As an index of oxidative damage, we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adapted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described (23). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (pmol/mg protein).

*Measurement of Protein Carbonyls*

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhidrazine (DNPH) as previously described (24). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH, and the absorbance read at 370 nm. Results are expressed as protein carbonyls (pmol/mg protein).

*Statistical Analysis*

In the DNA damage the normality of variables was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analysis for Damage Index and Damage Frequency, measured by Comet assay, was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA showed significant differences in non-normal distribution, comparisons were made using the Kruskal-Wallis test with Dunn's test as post hoc. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a *P* value of 5%, two-tailed. All analyses were performed using the 5.0 BioEstat software.

For the analyses of oxidative damage parameters, all data were expressed as mean ± SD. Differences among experimental groups in experiments evaluating oxidative parameters were determined by two-way ANOVA. Multiple comparisons were performed by Duncan test. In all experiments, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

## Results

Our results demonstrated that the rats exposed to ultraviolet radiation presented increased Damage Index (Figure 1) and Damage Frequency (Figure 2) in comet assay in peripheral blood in comparison to control group. However, the animals that received oral Green Tea, oral Mate Tea, Green Tea gel and Mate Tea gel have DNA damage prevented (Figures 1 and 2). We also showed that rats exposed to ultraviolet radiation presented increased lipid peroxidation, as evidenced by the increased thiobarbituric acid-reactive species levels (Figure 3) and protein carbonylation (Figure 4) in the skin. Moreover, we observed that the oral and topic treatment with Green Tea or Mate Tea prevented the increased lipid peroxidation induced by ultraviolet radiation exposure (Figure 3). However, protein carbonylation was only prevented by topic treatment with Green Tea gel and Mate Tea gel.

Oral treatement with Green or Mate Tea oral did not prevent the increase of protein carbonylation caused by ultraviolet radiation exposure (Figure 4).

## Discussion

Exposure to solar ultraviolet radiation induces inflammatory responses, oxidative stress, immunosuppression, DNA damage and gene mutations, events related to skin diseases, including skin cancer (25-27).

Multiple studies have demonstrated a relationship between ultraviolet exposure and increased risk of developing skin cancer. It was postulated that exposure of the skin to solar ultraviolet light is a major risk factor for the development of malignant melanoma and non-melanoma skin cancer, and that this effect is mediated by a chain of events, including DNA damage by ultraviolet light and subsequent formation of mutations (28).

In the life of a cell, DNA damage represents a great threat to genome stability, leading to loss or amplification of chromosomal activity, which may result in carcinogenesis or tissue aging (29). Genome integrity is continuously threatened by both endogenous (e.g. reactive oxygen species produced by normal metabolism, DNA replication 'errors') and exogenous (ultraviolet light, ionizing radiations and chemical carcinogens) factors (30).

In the present study we observed the occurrence damage index and damage frequency in peripheral blood of rats exposed the radiation, besides we observed oxidative damage in the skin of these animals. On the other hand, we showed that the use of Green Tea oral, Mate tea oral, Green Tea gel and Mate Tea gel prevented the damage index and damage frequency caused by radiation. We also demonstrated that the Green Tea oral, Mate tea oral, Green Tea gel and Mate Tea gel prevented the lipid peroxidation. However, the protein carbonylation was prevented only by Green Tea gel and Mate Tea gel.

Studies showed that consumption of green tea polyphenols in drinking water prevents photocarcinogenesis in mice; however, the molecular mechanisms underlying this effect have not been fully elucidated (31). Polyphenols isolated from the leaves of green tea have a number of beneficial health effects including anti-carcinogenic activity, which has been demonstrated in various tumor models (32,33). It has been also showed that oral administration of an aqueous extract of green tea or green tea polyphenols (a mixture of polyphenols) in drinking water inhibits ultraviolet radiation-induced skin carcinogenesis in mice in terms of tumor incidence, tumor multiplicity and tumor growth/size (16,34). In addition, the UV exposure causes physical changes to the skin due to alterations that occur in the connective tissue via the formation of lipid peroxides, cell contents and enzymes and reactive oxygen species (35,36). Other studies showed that green tea also possess anti-oxidant activity (16,37)

Mate tea has distributed in plant flavonoids and phenolic compounds and their consumption has been associated with the prevention of age-related chronic conditions including cancer (38,39). Various phytochemical constituents, such as flavonoids, have been isolated from mate plants and related species, and some of these compounds may be responsible for the observed antioxidant activity (40). Furthermore, data from in vitro and in vivo studies suggest a potential beneficial effect of tea polyphenols against cancer at most stages of development (41-43).

In conclusion, we showed that the exposition of rats the radiation presented DNA damage and oxidative damage and Green Tea and Mate Tea prevented these effects. Our data is in line with previous works showing anti-carcinogenic and antioxidant activities for Green Tea and Mate Tea.

## References

1. Gruijl F R. Skin cancer and solar UV radiation. Eur J Cancer 1999: 35: 2003–2009.

2. Sarasin A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. Mutat Res 1999: 428: 5–10.

3. Vries E, Van de Poll-Franse L V, Louwman W J, Gruijl F R, Coebergh J W. Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. Br J Dermatol 2005: 152: 481–488.

4. Agar N S, Halliday G M, Barnetson R S, Ananthaswamy H N, Wheeler M, Jones A M. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2004: 101: 4954–4959.

5. Melnikova V O, Ananthaswamy H N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. Mutat Res 2005: 571: 91–106.

6. Halliday G M, Byrne S N, Kuchel J M, Poon T S, Barnetson R S. The suppression of immunity by ultraviolet radiation: UVA, nitric oxide and DNA damage. Photochem Photobiol Sci 2004: 3: 736–740.

7. Ullrich S E. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. Mutat Res 2005: 571: 185–205.

8. Granstein R D, Matsui M S. UV radiation-induced immunosuppression and skin cancer. Cutis 2004: 74: 4–9.

9. Bachelor M A, Bowden G T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. Semin Cancer Biol 2004: 14: 131–138.

10. Kvam E, Tyrrell R M. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. Carcinogenesis 1997: 18: 2379–2384.

11. Halliday G M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. Mutat Res 2005: 571: 107–120.

12. Wang D, Kreutzer D A, Essigmann J M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. Mutat Res 1998: 400: 1199–1155.

13. Watt N T, Routledge M N, Wild C P, Hooper N M. Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. Free Radical Biol Med 2007: 43: 959–967.

14. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. Free Radical Biol Med 1994: 16: 99–109.

15. El-Khamisy S F, Caldecott K W. TDP1-dependent DNA singlestrand break repair and neurodegeneration. Mutagenesis 2006: 21: 219–224.

16. Mantena S K, Meeran S M, Elmets C A, Katiyar S K. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. J Nutr 2005: 135: 2871–2877.

17. Gugliucci A. Antioxidant effects of Ilex paraguariensis: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. Biochem Biophys Res Commun 1996: 224: 338-344.

18. Bracesco N, Dell M, Rocha A, et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of Ilex paraguariensis: Prevention of DNA double-strand breaks in Saccharomyces cereVisiae and human low-density lipoprotein oxidation. J Altern Complement Med 2003: 9: 379-387.

19. Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, Schneider E L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experim Cell Res 1988: 175: 184-191.

20. Tice R R, Agurell E, Anderson D, et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environ Mol Mutagen 2000: 35: 206-221.

21. Villela I V, Oliveira I M, Silva J, Henriques J A P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (Limnoperna fortunei) exposed to environmental contaminants. Mut Res 2006: 605: 78-86.

22. Collins A R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol 2004: 26: 249-261.

23. Draper H H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990: 186: 421.

24. Levine R L, Garland D, Oliver C N. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 1990: 186: 464.

25. Katiyar S K, Matsui M S, Mukhtar H. Kinetics of UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in human skin *in vivo*: An immunohistochemical analysis of both epidermis and dermis. Photochem Photobiol 2000: 72: 788–793.

26. Katiyar S K. Oxidative stress and photocarcinogenesis: Strategies for prevention. In: Singh K K, ed. Oxidative stress disease and cancer. London: Imperial College Press 2006: 933-964.

27. Katiyar S, Elmets C A, Katiyar S K. Green tea and skin cancer: Photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. J Nutr Biochem 2007: 18: 287–296.

28. Runger T M. Ultraviolet light. In: Bolognia J L, Jorizzo J L, Rapini R P, eds. Dermatology. London: Mosby 2003: 1353–1363.

29. Nakanishi M, Niida H, Murakami H, Shimada M. DNA damage responses in skin biology implications in tumor prevention and aging acceleration. J Dermatol Sci 2009: 56: 76-81.

30. Mocellin S, Verdi D, Nitti D. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. Carcinogenesis 2009: 30: 1735-1743.

31. Meeran S M, Akhtar S, Katiyar S K. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. J Invest Dermatol 2009: 129: 1258-1270.

32. Katiyar S K, Mukhtar H. Tea in chemoprevention of cancer: Epidemiologic and experimental studies. Int J Oncol 1996: 8: 221–238.

33. Yang C S, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2002: 42: 25-54.

34. Wang Z Y, Huang M T, Ferraro T, et al. Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. Cancer Res 1992: 52: 1162–1170.

35. Benaiges A, Marcet P, Armengol R, Betes C, Girones E. Study of the refirming effect of a plant complex. Int J Cosmet Sci 1998: 20: 223-233.

36. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam M S. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent anti-oxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food Chem Toxicol 2006: 44: 984-993.

37. Okayasu H, Suzuki F, Satoh K, et al. Comparison of cytotoxicity and radical scavenging activity between tea extracts and Chinese medicines. In Vivo 2003: 17: 577-581.

38. McKay D L, Blumberg J B. The role of tea in human health: an update. J Am Coll Nutr 2002: 21: 1-13.

39. Weisburger J H. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms. Eur J Cancer Prev 2002: *11:* S1-7.

40. Schinella G R, Troiani G, Davila V, de Buschiazzo P M, Tournier H A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis.* Biochem Biophys Res Commun 2000: 269: 357-360.

41. Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M, Imai T, Shirai T. Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. Environ Mol Mutagen 2002: 39: 271- 278.

42. Su L J, Arab L. Tea consumption and the reduced risk of colon cancersresults from a national prospective cohort study. Public Health Nutr 2002: 5: 419-426.

43. Tapiero H, Tew K D, Nguyen G, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. Biomed Pharmacother 2002: 56: 200-207.

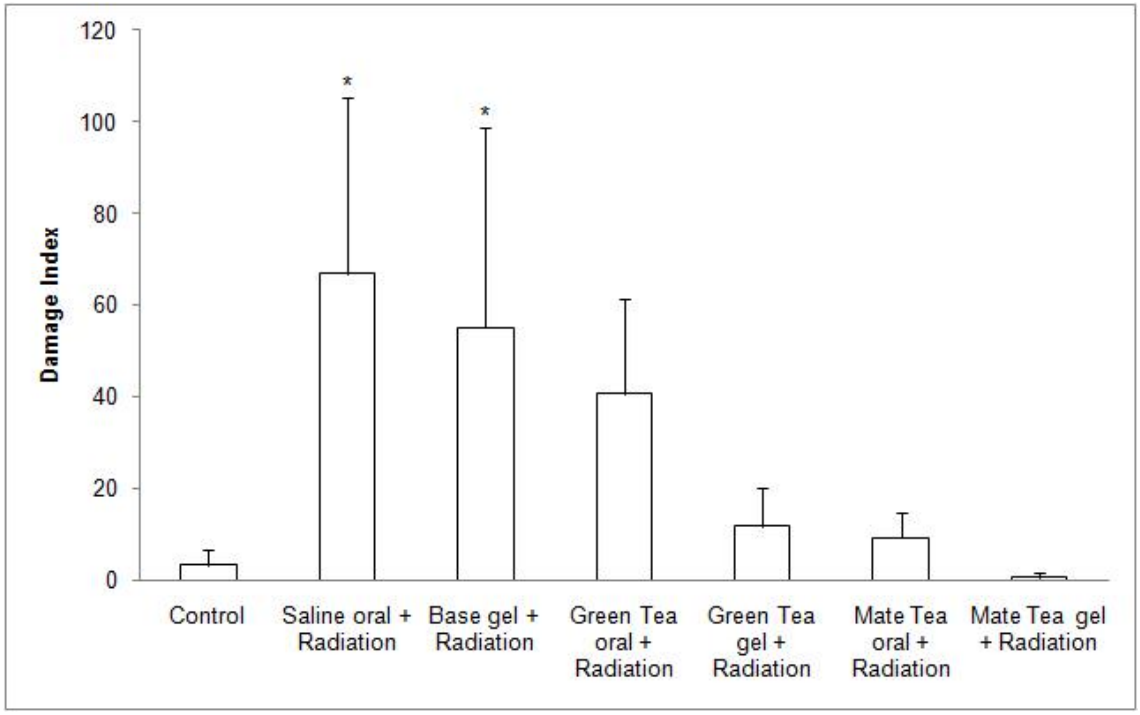


**Figure 1:** Damage Index observed in peripheral blood of rats treated with green tea and mate tea, oral and topic, and exposed the radiation.

*Different from control group ($p<0.05$).

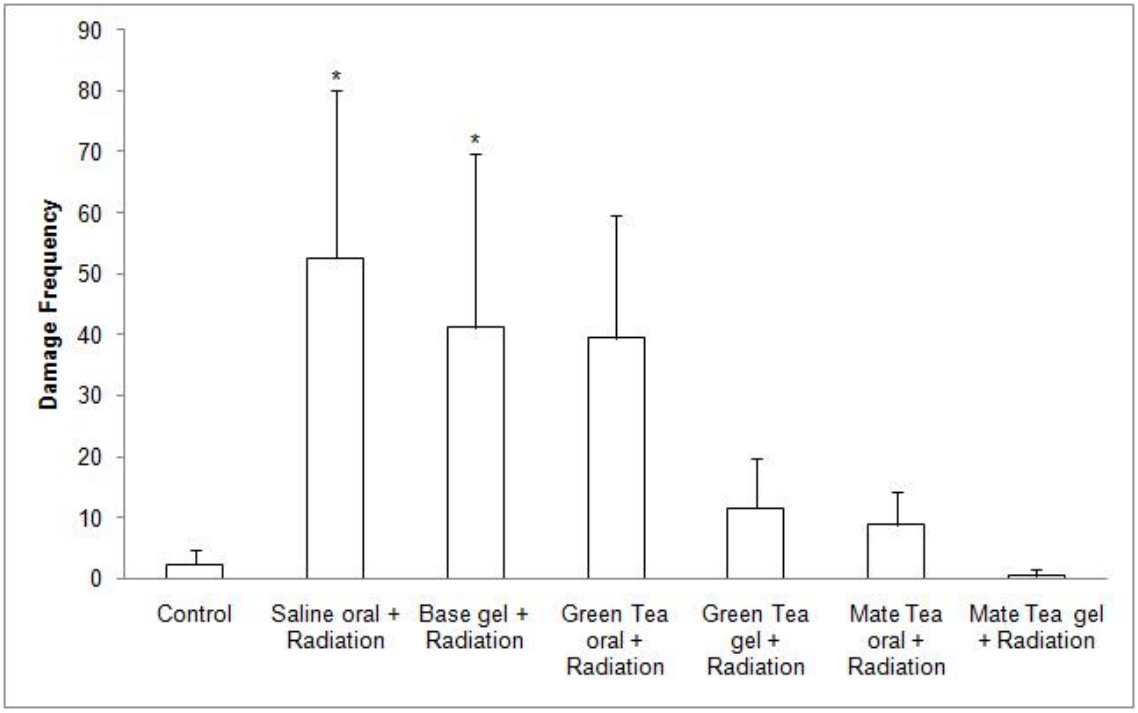


**Figure 2:** Damage Frequency observed in peripheral blood of rats treated with green tea and mate tea, oral and topic, and exposed the radiation.

*Different from control group ($p<0.05$).

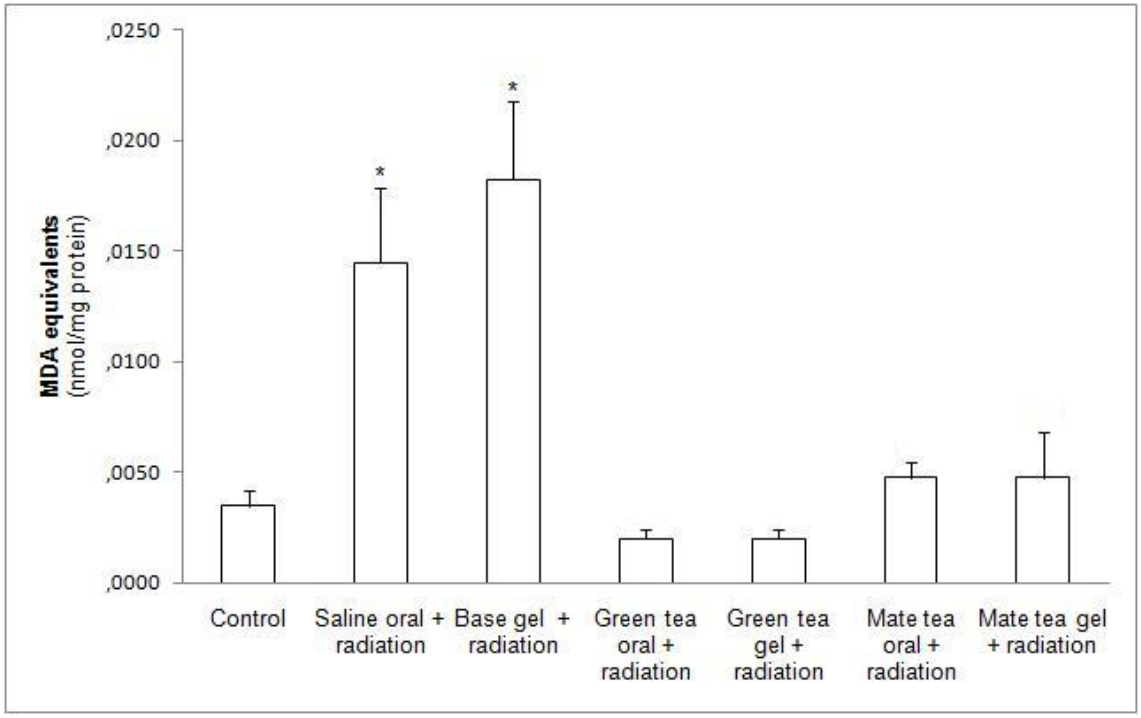


**Figure 3:** Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in skin of rats treated with green tea and mate tea, oral and topic, and submitted to radiation.

* Different from control group ($p<0.05$).

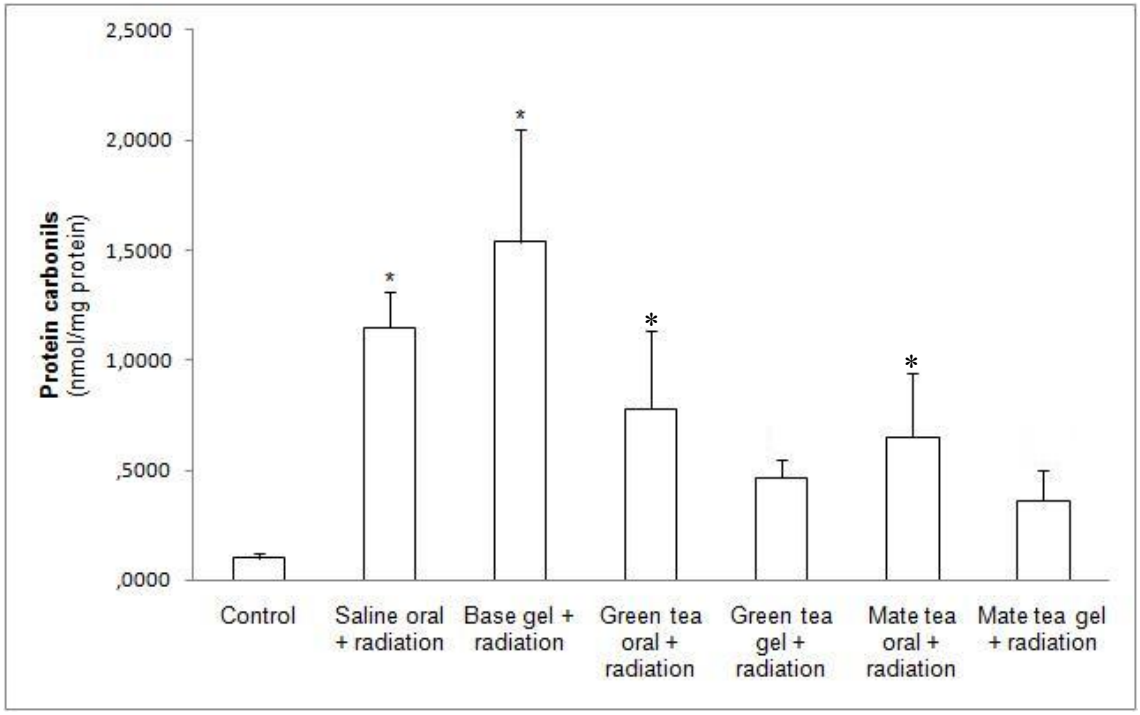


**Figure 4:** Protein carbonyl content in skin of rats treated with green tea and mate tea, oral and topic, and submitted to radiation. *Different from control group ($p<0.05$).

## 4. DISCUSSÃO

A exposição UV induz a alterações biológicas e moleculares na pele, manifestando-se imediatamente como vermelhidão, queimadura e bronzeamento e podendo se tornar extremamente prejudicial quando realizada de maneira crônica, levando ao fotoenvelhecimento e câncer de pele (Janczyc A *et al.* 2007; Kullavanijaya & Lim, 2005; Gil & Kim, 2000).

A fotoproteção começou a ser extremamente valorizada, não somente para a prevenção das queimaduras solares, mas em virtude dos seus efeitos preventivos contra o desenvolvimento de cânceres de pele. Segundo estimativas, o câncer de pele é o que possui maior incidência e ultrapassa a soma dos cânceres que ocorrem em outros órgãos (Rigel, 2008).

As conseqüências mais desejáveis da radiação UV são os seus benefícios em algumas doenças cutâneas, largamente utilizadas em conjunto ou não às terapias medicamentosas na clínica dermatológica (Tuchinda *et al.* 2007).

Existe grande interesse em definir os mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares pelos quais os polifenóis exercem sua capacidade fotoprotetora. Os filtros solares formam uma barreira física e química, reduzindo os efeitos deletérios da radiação ultravioleta na pele. Quando estes produtos foram lançados, pouco se sabia sobre os efeitos da radiação solar na pele e as informações eram relativas apenas à radiação UVB e então os produtos eram rotulados de acordo com o Fator de Proteção Solar (FPS) conferido pelo produto em relação à radiação UVB (Bissonette, 2008). Nos últimos anos, diversos estudos apresentaram os efeitos deletérios da radiação UVB, e a radiação UVA também se mostraram deletérias às células e estruturas celulares (Rünger & Kappes, 2008; Russo & Halliday, 2006).

Além disso, é crescente o interesse na utilização de "produtos naturais", uma vez que estes produtos são geralmente bem aceitos pelo consumidor e tem aumentado o interesse das indústrias cosméticas em acrescentar extratos vegetais na composição de seus produtos. Dentre os extratos utilizados, o Chá Verde e o *Ginkgo biloba* têm sido amplamente utilizados nas mais diversas formulações para cuidados com a pele e como agentes coadjuvantes nos cuidados de proteção solar (Dal1Belo, 2008). Além destes, diversos outros agentes botânicos têm sido estudados e utilizados por suas características fotoquimiopreventivas, que incluem as catequinas do chá verde, preto e branco, as curcuminas da *Curcuma longa*, *a* silibilina *da Silybum marianum*, os compostos sulfurosos do *Allium sativum*, a dadzeína e genisteína do *Trifollium pratense* e *Glycine Max*, além destes ainda são largamente estudados os

componentes das uvas, nozes, vegetais contendo carotenóides, além de diversos óleos vegetais (F'guyer *et al.* 2003).

A *Ilex paraguariensis* é amplamente consumida pela população do sul do Brasil por diversas questões medicinais, nutricionais e até mesmo culturais. Com suas folhas e ramos prepara-se uma bebida tônica, conhecida como mate, chimarrão o tererê. Sua importância socioeconômica está no fato de ser uma das espécies que sofre pouco com as oscilações do clima, comparando-se com os cultivos agrícolas em geral. Por esta razão, passou a ser uma espécie de grande importância na fixação do homem ao campo (Vidor *et al.* 2002). Em virtude de todas estas vantagens socioeconômicas, pela facilidade de cultivo e aquisição, e por estimular ainda mais a utilização de plantas regionais ou com grande cultivo no Brasil selecionou-se a *Ilex paraguariensis* como objeto deste estudo. Alguns estudos já apresentavam suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas, mas nenhum estudo menciona seus efeitos fotoquimiopreventivos (Gnoatto *et al.* 2008; Miranda *et al.* 2008; Lunceford & Gugliuccik, 2005; Filip & Ferraro, 2002).

Muito além da fotoproteção tópica, atualmente muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial protetor e antioxidante de compostos botânicos frente à radiação através da administração via oral, uma vez que é crescente o consumo de agentes nutracêuticos (Siscovick *et al.* 2008; Janczyk *et al.* 2007; Kullavanijava & Lim, 2005).

Como se esperava, os grupos suplementados com os antioxidantes orais e os grupos submetidos à aplicação tópica de antioxidantes e submetidos à exposição à radiação UVA e UVB apresentaram maior viabilidade celular e dano ao DNA, quando comparados ao grupo que não foi submetido à radiação UV.

Dentre os grupos estudados, o grupo tratado com *I. paraguariensis*, tanto pela via oral quanto pela via tópica apresentaram menor dano e menor freqüência de dano ao DNA. Acredita-se que os polifenóis atuem de maneira similar aos fotoprotetores, com a vantagem de atuarem tanto topicamente quanto sistemicamente, proporcionando proteção contra alguns efeitos biológicos da radiação solar (Yusuf *et al.* 2007).

Os resultados do estudo demonstram que os ratos expostos à radiação apresentaram os valores aumentados de Dano e Freqüência de dano ao DNA no sangue periférico quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com Chá Verde Oral, Chá Verde Gel, Chá Mate Oral e Chá Mate Gel apresentaram redução destes índices de dano, o que demonstra o efeito protetor destes agentes contra o dano ao DNA induzido pela radiação UV.

Através dos dados obtidos podemos sugerir que a intervenção com o Chá Mate é capaz de aumentar a atividade de reparo ao DNA nas células da derme e epiderme de ratos e, com isso, reduzir o risco do desenvolvimento de câncer de pele.

Embora não tenha sido avaliada a concentração de p53 nas amostras de tecidos cutâneos estudados não seria surpreendente encontrar níveis elevados de p53 nas amostras submetidas à radiação e não tratadas. Normalmente, pequenas porções de proteína p53 estão presentes nas células; em resposta ao dano ao DNA, entretanto, estas proteínas acumulam-se, a divisão celular é inibida e ocorre o reparo ao DNA (Benjamin *et al.* 2008). O excessivo dano ao DNA induzido por UV pode desencadear a apoptose em uma forma dependente de p53 (Ziegler *et al.* 1994; Smith & Fornace, 1997). Ziegler *et al.* demonstraram que a irradiação UV da pele normal de ratos contendo o tipo selvagem de p53 induz a formação de *Sunburn Cells*, e ratos que não apresentaram p53 foram resistentes à formação de *Sunburn Cells* (Ziegler *et al.* 1994).

Estudos também demonstram que as mutações de p53 são detectadas logo após a primeira semana de exposição à radiação UV e as mutações geralmente ocorrem em 80-90% entre a 4ª. e 8ª. semana (Anantaswamy *et al.* 1997). Pesquisadores ainda descobriram que enquanto a incidência de alguns alelos de p53 mutantes permanece em aproximadamente 100% mesmo após 22 semanas após a cessação da exposição à radiação, outras mutações de p53 são eliminadas da pele, evidentemente como resultado do processo de diferenciação e descamação (Benjamin *et al.* 2008).

Os resultados ainda demonstram que os ratos expostos à radiação UV apresentaram resultados aumentados na carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica na pele destes animais. Observou-se que o tratamento com Chá Verde Oral, Chá Verde Gel, Chá Mate Oral e Chá Mate Gel preveniu a peroxidação lipídica, entretanto, a carbonilação de proteínas somente foi prevenida nos animais tratados com Mate ou Chá Verde pela via tópica; a administração oral do Mate ou do Chá Verde não alterou a carbonilação de proteínas.

A modificação de proteínas pode ser induzida pelas ROS e o grupo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo (neste experimento o agente estressor foi a irradiação com UVA e UVB) (Aksenov & Markesbery, 2001) Há diversas técnicas para se medir a presença de grupo carbonila (Lushchak *et al.* 2005). Muitos estudos permitem observar a presença do estresse oxidativo em animais submetidos à radiação UVA e UVB (Botta *et al.* 2008; Corstjens *et al.* 2007; Hanson *et al.* 2006; Russo & Halliday, 2006). Neste caso utilizamos proteínas isoladas da pele dos ratos.

Prevenir a peroxidação lipídica através da redução da carbonilação de proteínas e redução do aumento de TBARS é extremamente importante quando se deseja prevenir o envelhecimento celular, uma vez que a radiação solar é um importante agente responsável pelo aumento da peroxidação lipídica e pelo aumento de TBARS.

Além do fotoenvelhecimento, o aumento da formação de ROS também resulta em modificações das bases do DNA, incluindo modificações químicas e estruturais às bases purínicas e pirimidínicas, que quando oxidadas podem desenvolver lesões pré-mutagênicas, e se não reparadas, podem resultar em mutações ao DNA (Miranda *et al.* 2008*)*. Ou seja, a radiação solar altera o DNA através de mecanismos diretos por formação de fotocompostos ou por alterações dos mecanismos antioxidantes celulares, que além de serem importantes na prevenção ao fotoenvelhecimento são importantes nas defesas celulares contra o desenvolvimento de tumores (Lund & Timmins, 2007).

Nos animais tratados tanto com o Chá Mate (*I.paraguariensis*) quanto com o Chá Verde (*C.sinensis*) observou-se a diminuição de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) na pele, com resultados estatisticamente significativos ($p<0.05$) quando comparados ao grupo tratados com placebo (água potável+UV ou gel base+UV).

Através deste estudo pode-se concluir que a exposição de ratos à radiação UV provoca dano ao DNA e dano oxidativo. Entretanto, o Chá Mate e o Chá Verde apresentam efeitos protetores ao DNA, protegendo contra a carcinogênese e prevenindo o estresse oxidativo.

A administração oral do Chá Mate e Chá Verde poderia ter apresentado melhores resultados na prevenção do dano ao DNA e estresse oxidativo se tivesse sido introduzida algumas semanas antes dos procedimentos de irradiação, uma vez que acreditamos que o potencial protetor destes agentes poderia ter sido aumentado através da administração prévia (duas a três semanas antes do procedimento de irradiação). Se confirmados, estes dados podem oferecer anda maiores subsídios à utilização de produtos a base de Chá Mate, sustentando o apelo produto destinado à fotoproteção oral, que atualmente têm sido alvo de constantes pesquisas e interesse mercantil.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho foi possível concluir que:

- A radiação solar é capaz de proporcionar lesões ao DNA e aumentar o estresse oxidativo através da carbonilação de proteínas e aumento de TBARS mesmo em pequeno período de exposição;
- A administração tópica de um gel contendo extrato de chá verde ou extrato de chá mate pode ser considerada alternativa benéfica na redução dos danos causados pela radiação;
- A suplementação oral do chá mate ou chá verde também apresentam resultados estatisticamente significativos na redução do dano ao DNA e redução do estresse oxidativo, fornecendo pela primeira vez indícios da atividade fotoprotetora da administração oral do Chá Mate;
- A incorporação de extratos de chá mate em formulações cosméticas apresenta-se bastante vantajosa, uma vez que além do baixo custo, apresenta resultados comprovados na redução do dano ao DNA e estresse oxidativo, fornecendo apelos de *marketing* ao produto, como atividade *anti-aging*, antioxidante e fotoprotetora biológica;
- Por fim, este estudo fornece maiores expectativas que outros estudos sejam conduzidos com a finalidade de demonstrar a utilização farmacêutica e nutricional do *Ilex paraguariensis*, bem como que novos estudos sejam conduzidos com o objetivo de demonstrar suas propriedades protetoras frente à radiação UV, tanto pela sua administração tópica, quanto pela suplementação via oral.

## 6. LITERATURA CONSULTADA

AKNESOV MY; MARKESBERY WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters** 302: 141-145. 2001.

ANANTHASWAMY HN; LOUGHLIN SM; COX P; EVANS RL; ULLRICH SE; KRIPKE ML. Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. **Nature Medicine** 3: 510-514. 1997.

BARNES J; ANDERSON AA; PHILLIPSON JD. **Herbal Medicines**. Third Edition. Great Britain: Pharmaceutical Press, 2007.

BENJAMIN CL; ULLRICH SE; KRIPKE ML; ANANTHASWAMY HN. p53 Tumor Suppressor Gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. **Photochemistry and Photobiology** 84: 55-62. 2008.

BOTTA C; DI GIORGIO C; SABATIER A-S; DE MÉO M. Genotoxiciy of visible light (400-800nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology** 91: 24-34. 2008.

BISSONETTE R. Update on Sunscreens. **Skin Therapy Letter** 13: 5-7. 2008.

BOSSET S; BONNET-DUQUENNOY M; BARRÉ P; CHALON A; KURFURST R; BONTE´F; SCHNÉBERT S; LE VARLET B; NICOLAS JF. Photoaging shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. **British Journal of Dermatology** 149: 826-835. 2003.

CENI GC; BALDISSERA EM; ANTUNES OAC; OLIVEIRA JV; DARIVA C; OLIVEIRA D. Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction, optimization and stability at low and high temperatures. **Bioprocess and Biosystem Engineering** 31: 541-550. 2008.

CIBA SPECIALTY CHEMICALS. Ciba® Tinosorb® M – Microfine UVA Absorber with Triple Action. Material Data Sheet. Switzerland, 2002.

COLIPA. Sun Protection Factor Method. Brussels: European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). 1994.

CORSTJENS H; DECLERCQ L; HELLEMANS L; SENTE I; MAES D. Prevention of oxidative damage that contributes to the loss of bioenergetic capacity in ageing skin. **Experimental Gerontology** 42: 924-929. 2007.

DAL'BELO SE. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba*. **Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, São Paulo. 2008.

DIFFREY BL. Human exposure to solar ultraviolet radiation. **Journal of Cosmetic Dermatology** 1: 214-130. 2002.

F'GUYER S; AFAQ F; MUKHTAR H. Photochemoprevention of skin câncer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** 19: 56-72. 2003.

FILIP R; FERRARO GR. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*. **European Journal of Nutrition** 42: 50-54. 2003.

GIL EM; KIM TH. UV-induced immune suppression and sunscreen. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** 16: 101-110. 2000.

GILCHREST B; KRUTMANN J (Eds.) **Skin Aging.** Germany: Springer, 2006.

GNOATTO SCB; DASSONVILLE-KLIMPT A; DA NASCIMENTO S; GALÉRA P; BOUMEDIENE K; GOSMANN G; SONNETE P; MOSLEMI S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry** 43: 1865-1877. 2008.

GNOATTO SCB; BASSANI VL; COELHO GC; SCHENKEL EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill., Aquifoliaceae). **Química Nova** 30: 304-307. 2007.

GONZÁLEZ S; FERNÁNDEZ-LORENTE M; GILABERTE-CALZADA Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology** 26: 614-626. 2008.

HANSON KM; GRATTON E; BARDEEN CJ. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine** 41: 1205-1212. 2006.

JACQUES RA; FREITAS LS; PÉREZ VF; DARIVA C; DE OLIVEIRA AP; DE OLIVEIRA JV; CARAMÃO EB. The use of ultrasound in the extraction of the *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry** 14: 6-12. 2007.

JAŃCZYK A, GARCIA-LOPEZ MA, FERNANDEZ-PEÑAS P, ALONSO-LEBRERO JL, BENEDICTO I, LÓPEZ-CABRERA M, GONZALEZ S. A *Polypodium leucotomos*

extract inhibits solar-simulated radiation-induced TNF-alpha and iNOS expression, transcriptional activation and apoptosis. **Experimental Dermatology** 16:823-9. 2007

KATIYAR SK; MATSUI MS; ELMETS CA; MUKHTAR H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory. **Photochemistry and Photobiology** 69:148-53. 1999.

KATIYAR SK; ELMETS CA; AGARWAL R; MUKHTAR H. Protection against ultraviolet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema responses in C3H/HeN mice by green tea polyphenols. **Photochemistry and Photobiology**. 62:855-61. 1995.

KVAN E; TYRRELL RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UVB and near visible radiation. **Carcinogenesis** 18: 2379-2384. 1997.

KIM S; LEE Y; LEE DH; KIM Y; CHO KH; CHUNG JH. Basal and UV-induced MMP-1 expression are inhibited by p53 in human dermal fibroblasts. **Experimental Dermatology** 17: 939-975. 2008.

KULLAVANIJAYA P; LIM HW. Photoprotection. **Journal of American Academy Dermatology** 52: 937-958. 2005.

MATSUMURA Y; ANANTHASWAMY HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology** 195: 298-308. 2004.

HECK CI; MEGIA EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science** 72: 138-151. 2007.

LENZ H; SCHIMIDT M; WELGE V; SCHLATTNER U; WALLIMAN T; ELSÄSSER H-P; WITTERN K-P; WENCK H; STÄB F; BLATT T. The creatine kinase system in human skin: protective effects of creatine against oxidative and UV damage in vitro and in vivo. **The Journal of Investigative Dermatology** 124: 443-452. 2005.

LUNCEFORD N; GUGLIUCCI A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia** 719-427. 2005.

LUND LP; TIMMINS GS. Melanona, long wavelength ultraviolet and sunscreens: Controversies and potential resolutions. **Pharmacology & Therapeutics** 114: 198-207.

LUSHCHAK V; SEMCHYSHYN H; MANDRYK S; LUSHCHAK O. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 441(1): 35-40. 2005.

MARTINS F; SUZAN AJ; CERUTTI SM; DEMÉTRIUS PA; RIBEIRO ML; BASTOS DHM; CARVALHO PO. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the

oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Jornal of Nutrition** 101: 527-532. 2009.

MARROT L; MEUNIER J-R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology** 58 (5 Suppl 2): S1 39-78. Review. 2008.

MEJIA EG; SONG YS; RAMIREZ-MARES MV; KOBAYASHI H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis)* tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 53: 1966-1973. 2005.

MIRANDA DDC; AÇARI DP; PEDRAZOLLI JR JP; CARVALHO PO; CERUTTI SM; BASTOS DHM; RIBEIRO ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on $H_2O_2$-induced DNA damage on DNA repair in mice. **Mutagenesis** 23(4): 261-265. 2008.

MOE GW; MARIN-GARCIA J; KONIG A; GOLDENTHAL M; LU X; FENG Q. In vivo TNF-{alpha} inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure**. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology** 287: H1813-H1820. 2004.

PAZ ML; MAGLIO DHG; WEILL FS; BUSTAMANTE J; LEONI J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocites. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** 24: 115-122. 2008.

PIECZENIK SR; NEUSTADT J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. **Experimental and Molecular Pathology** 83: 84-92. 2007.

RAMIREZ-MARES MV; CHANDRA S; MEJIA EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research** 554:53-65, 2004.

RIGEL DS. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **Journal of American Academy of Dermatology** 58: S129-S132. 2008.

RIGEL DS; WEISS RA; LIM HW, DOVER JS. **Photoaging**. Canada: Marcel Dekker, 2004.

RÜNGER TM; KAPPES UP. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine** 24: 2-10. 2008.

RUSSO PAJ; HALLIDAY GM. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. **British Journal of Dermatology** 155: 408-415. 2006.

SCHWARZ A; MAEDA A; KERNEBECK K; VAN STEEG H; BEISSERT S; SCHWARZ T. Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. **Journal of Experimental Medicine** 201: 173–179. 2005.

SEITÉ S; MOYAL D; VERDIER M-P; HOURSEAU C; FOURTANIER A. Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine** 16: 3-9. 2000.

SHINEGAGA MK; HAGEN TM, AMES BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 91: 10771-8. 1994.

SISCOVICK JR; ZAPOLANSKI T; MAGRO C; CARRINGTON K; PROGRAIS S; NUSSBAUM M; GONZALEZ S; DING W; GRANSTEIN RD. *Polypodium leucotomos* inhibits ultraviolet B radiation-induced immunosuppression. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine** 24:134-41. 2008.

SMITH ML; FORNACE JR AJ. p53-mediated protective responses to UV irradiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 94: 12255-12257. 1997.

TUCHINDA C; LIM HW; STRICKLAND FM; GUZMÁN EA; WONG HK. Comparison of broadband UVB, narrowband UVB, broadband UVA and UVA I on activation of apoptotic pathways in human peripheral blood mononuclear cells. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** 23: 2-9. 2007.

VAVALI PR; ELMETS CA; KATIYAR SK. Treatment of Green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidante enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. **Carcinogenesis** 24: 927-936. 2003.

Vidor MA; RUIZ CP; MORENO SV; FLOSS PA. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis araguariensis* St. Hil) characterization studies: The taste. Ciência Rural 32 (3): 2002.

VINK AA; MOODYCLIFFE AM; SHREEDHAR V; ULLRICH SE; ROZA L; YAROSH DB; KRIPKE ML. The inhibition of antigen presenting activity of dendritic cells resulting from UV irradiation of murine skin is restored by in vitro photorepair of cyclobutane pyrimidine dimmers. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 94: 5255–5260. 1997.

YAAR M. in: LIM HW; HÖNIGSMANN H; HAWK JLM. **Photodermatology**. New York: Informa Healthcare USA, 2007. 96p.

YUSUF N; IRBY C; KATIYAR SK; ELMETS CA. Protective effects of green tea polyphenols. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine** 23: 48-56. 2007.

ZEMTSOV A. Skin phosphocreatine. **Skin Research and Technology** 13: 115-118. 2007.

ZIEGLER A; JONASON AS; LEFFELL DJ; SIMON JA; SHARMA HW; KIMMELMAN J; REMINGTON L; JACKS T; BRASH DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature.** 372: 773–776. 1994.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo