

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FÁRMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Maria Fernanda Fernandes

Potencial antienvhecimento cutâneo da espécie *Cecropia pachystachya* Trécul

**Juiz de Fora
2017**

Maria Fernanda Fernandes

Potencial antienvhecimento cutâneo da espécie *Cecropia pachystachya* Trécul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Elita Scio Fontes.

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª Danielle Maria de Oliveira Aragão

**Juiz de Fora
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernandes, Maria Fernanda.

Potencial antienvhecimento cutâneo da espécie *Cecropia pachystachya* Trécul / Maria Fernanda Fernandes. -- 2017.

77 f. : il.

Orientadora: Elita Scio Fontes

Coorientadora: Danielle Maria de Oliveira Aragão

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Antioxidante. 2. Antiglicante. 3. Elastase. 4. Metaloprotease-2. 5. Fotoenvhecimento. I. Fontes, Elita Scio, orient. II. Aragão, Danielle Maria de Oliveira, coorient. III. Título.

Mria Fernanda Fernandes

Potencial antienvhecimento cutâneo da espécie *Cecropia pachystachya* Trécul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Bioativos

Aprovada em 13 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª.Dr^ª. Elita Scio Fontes - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª.Dr^ª. Jair Adriano Kopke de Aguiar
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª.Dr^ª. Nicolas de Castro Campos Pinto
Universidade Veiga de Almeida

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar ao meu lado em todos os momentos dessa jornada.

Agradeço aos meus pais por me apoiar, mesmo quando fracassava. Sempre foram exemplos de determinação e amor. Nunca mediram esforços para construção da minha felicidade.

A minha amada irmã Ana Clara, pelo companheirismo e por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós, Geraldo e Pedro, que mesmo não estando mais presentes sempre foram exemplo de humildade e sabedoria.

À minha avó Maria Helena, que sempre me acalmou com seu otimismo.

À Bebela e a Dinda, por sempre me incentivarem a buscar novos horizontes.

Ao Victor, pela sua fidelidade, carinho e compreensão. A Margô, por me inspirar a encarar a vida com mais leveza.

A todos meus amigos, de longa data, da farmácia e a todos que tornaram essa caminhada mais leve.

À Prof. Elita Scio, por abrir as portas do laboratório a mim, incentivando meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por todas as oportunidades.

A todos os companheiros do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos pelas discussões, amizade e apoio.

Ao Delfino por toda amizade e dedicação em colaborar com o nosso trabalho.

Ao Prof. Jair e ao Gustavo pela a realização das atividades em cultura de células e enzimáticas.

Aos meus cachorros, anjos que acalmam meu coração e são companheiros de todas as horas.

Enfim, a todos que estiveram presente ao logo dessa caminhada, contribuindo para que eu concretizasse essa etapa.

RESUMO

A espécie *Cecropia pachystachya* pertence ao gênero *Cecropia* Loefl. e possui ampla distribuição no território brasileiro, estendendo-se do sul ao norte do país. As principais sinonímias para a espécie são: *Cecropia carbonaria* Mart., *Cecropia catarinensis* Cuatrec., *Cecropia cyrtostachya* Miq. e *Cecropia lyratiloba* Miq. O envelhecimento cutâneo é um processo que pode ser classificado em intrínseco (natural) ou extrínseco (acelerado pelos fatores externos). A radiação ultravioleta é um dos principais agentes do envelhecimento extrínseco, uma vez que é inevitável a exposição à mesma. Os danos provocados pela radiação estão relacionados com excesso de radicais livres gerados, provocando alterações no DNA e no metabolismo dérmico e imunológico, culminando no fotoenvelhecimento. Outro fator que pode acelerar o envelhecimento cutâneo é a glicação de proteínas envolvidas no metabolismo dérmico, como por exemplo, o colágeno. A busca por produtos capazes de retardar ou tratar o envelhecimento cutâneo é crescente, uma vez que a expectativa de vida e a preocupação com a aparência é cada vez maior. A fim de restabelecer a pele, empregam-se produtos direcionados ao tratamento dos danos provocados pelo sol. Geralmente esses possuem significativa atividade antioxidante. Alguns constituintes já identificados nas folhas, sobretudo flavonoides, por ser uma classe de compostos reconhecidamente antioxidantes poderia auxiliar no tratamento do envelhecimento cutâneo. Dessa maneira foi realizada a dosagem de fenóis e flavonoides no extrato hidroetanólico e etanólico da *Cecropia pachystachya* (EH e EE). Ambos possuem teores elevados de fenóis, porém o EH possui cerca de quatro vezes mais flavonoides que o EE. O potencial antioxidante foi avaliado por meio de diferentes metodologias: método de formação do complexo de fosfomolibdênio, sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e descoloramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. EE e EH exibiram atividade antioxidante semelhantes em todas as metodologias, entretanto o EH mostrou-se mais ativo na técnica do descoloramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação ao EE. A ação dos extratos foi avaliada frente a outros fatores envolvidos no envelhecimento. A capacidade antiglicante e o potencial proliferativo em cultura celular de fibroblastos foram avaliados. Ambos os extratos foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos. Já em relação à atividade antiglicante, o EH apresentou melhor atividade. Foi capaz de inibir cerca de duas vezes mais o processo de glicação, quando comparado à substância de referência (aminoguanidina). O potencial inibitório em relação a importantes enzimas do metabolismo dérmico (elastase e metaloprotease 2) também foi avaliado. Frente a notável atividade antiglicante, antioxidante e proliferativa sobre fibroblastos do EH, o mesmo foi selecionado para os testes enzimáticos. O EH foi capaz de inibir a elastase e a metaloprotease 2, mesmo em concentrações baixas. Sendo assim, poderia ser empregado na formulação de dermocosméticos, uma vez que atua em vários pontos do processo de envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: antioxidante, antiglicante, elastase, metaloprotease 2, fotoenvelhecimento

ABSTRACT

The species *Cecropia pachystachya* belongs to the genus *Cecropia* Loefl. and has wide distribution in Brazilian lands, from south to north in the country. The main synonyms for the species are: *Cecropia carbonaria* Mart., *Cecropia catarinensis* Cuatrec., *Cecropia cyrtostachya* Miq. e *Cecropia lyratiloba* Miq. Cutaneous aging is a process that can be classified as intrinsic (natural) or extrinsic (accelerated by external factors). The inevitable exposure to the ultraviolet radiation is one of the main extrinsic aging factors. The damage caused by radiation is related to excess free radicals generated causing changes in DNA and dermal and immune metabolism, culminating in photoaging. Another factor that can accelerate skin aging is the glycation of proteins involved in dermal metabolism, such as collagen. In order to restore the skin, products are used to treat the damage caused by the sun. Some constituents already identified in the leaves, especially flavonoids, being a class of compounds known as antioxidants could help in the treatment of skin aging. In this way the dosage of phenols and flavonoids in the hydroethanolic and ethanolic extract of *Cecropia pachystachya* (EH and EE) was performed. As well as the antioxidant potential through the methods of formation of the phosphomolybdenum complex, sequestration of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical, thiobarbituric acid reactive substances and bleaching by the β -carotene / linoleic acid system. In view of the good results obtained with the samples, the action of the extracts was evaluated against other factors involved in aging. Antiglycating capacity and inhibitory power against important enzymes of the dermal metabolism (elastase and metalloprotease 2) were evaluated, as well as the proliferative potential in cell culture of fibroblasts. The EH presented better antiglycating capacity than the reference substance, even at low concentrations, in the same way that it was able to inhibit elastase and metalloprotease 2. Thus it could be used in the formulation of dermocosmetics, since it acts in several points of the skin senescence process.

Key words: antioxidant, antiglycating, elastase, metalloprotease 2, photoaging

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da pele e tecido subcutâneo.....	4
Figura 2: Envelhecimento da pele: (A) Contraste entre área do pescoço fotoenvelhecida e pele abaixo do pescoço naturalmente envelhecida (B) Contraste entre pele da mão fotoenvelhecida e área da barriga naturalmente envelhecida	8
Figura 3: Distribuição da espécie <i>C. pachystachya</i> no território brasileiro.....	20
Figura 4: Folhas e árvore da espécie <i>C. pachystachya</i>	21
Figura 5: Cromatograma em vermelho - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Cromatograma em verde - Cromatograma do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> obtido por cromatografia líquida de alta eficiência	34
Figura 6: Espectro UV dos sinais obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico e do extrato hidroetanólico provenientes das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i>	35
Figura 7: Efeito antioxidante do extrato etanólico e extrato hidroetanólico das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> , avaliado através da dosagem de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em MDA.	36
Figura 8: Percentual de inibição da glicação dos extratos etanólico (EE) e hidroetanólico (EH) das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> pelo método BSA/frutose.....	37
Figura 9: Percentual de proliferação da linhagem BALBc/3T3 quando submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico (EE) e extrato hidroetanólico (EH) (16,75-300 µg/mL) por 24 horas.	38
Figura 10: Percentual de inibição da atividade da enzima elastase pelo extrato hidroetanólico (EH) das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i>	39
Figura 11: (A) Percentual de inibição da atividade enzimática da MMP-2 pelo extrato hidroetanólicodas folhas de <i>Cecropia pavchystachya</i> . (B)Zimograma em gel poliacrilamida a 7,5% com adição de gelatina 2,5%.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos celulares da epiderme e suas respectivas funções	4
Tabela 2: Metaloproteases e sinônimos com suas respectivas ações no fotoenvelhecimento.	11
Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para caracterização de dos extrato etanólico (EE) e hidroalcoólico (EH) de <i>Cecropia pachystachya</i>	26
Tabela 4: Massa e rendimento dos extratos etanólico (EE) e hidroetanólico (EH) de <i>Cecropia pachystachya</i>	33
Tabela 5: Teor de fenóis e flavonoides das amostras em EE e EH \pm erro padrão da média (n=3).....	33
Tabela 6: Atividade antioxidante do EE e EH avaliada pelos métodos da formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e sistema β caroteno/ ácido linoleico	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	antes de Cristo
AGE	produtos finais de glicação avançada
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	trifosfato de adenosina
BHT	hidroxitolueno butilado
°C	graus Celsius
CAT	capacidade antioxidante total
CCD	cromatografia de camada delgada
CI	concentração inibitória
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DOLD	3-deoxiglucosona-lisina
EE	extrato hidroetanólico
EAT	ácido tânico
EGF	fator de crescimento epidérmico
EQ	quercetina
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe	ferro
g	grama
GOLD	glioxal-lisina
m ²	metros quadrados
MAP	protease ativada por mitógeno
MEC	matriz extracelular
MDA	malonaldeído
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
µg	miligramas
µL	microlitros
µm	micrômetros
nm	nanômetros
Mo	molibdênio
MOLD	metilglioxal-lisina
MMP	matriz metaloproteinase
NaOH	hidróxido de sódio
PNs	Produtos naturais
RAGE	receptores multiligantes de AGE
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1 PRODUTOS NATURAIS	2
1.2 PELE.....	3
1.2.1 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	7
1.2.2 FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	8
1.2.2.1 Estresse Oxidativo e envelhecimento cutâneo.....	9
1.2.2.2 Glicação e envelhecimento cutâneo	13
1.2.2.3 Prevenção do fotoenvelhecimento	17
2 GÊNERO CECROPIA	18
2.1 CECROPIA PACHYSTACHYA TRÉCUL	19
2. OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE CECROPIA PACHYSTACHYA	24
3.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL	24
3.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	24
3.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOÍDES	25
3.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	26
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	26
3.6.1 MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO	26
3.6.2 MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH).....	27
3.6.3 DESCORAMENTO PELO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO	27
3.6.4 MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	28
3.7 ATIVIDADE ANTIGLICANTE	29
3.8 CULTURA CELULAR.....	30
3.8.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	30
3.9 ATIVIDADE INIBITÓRIA ENZIMÁTICA.....	31
3.9.1 ELASTASE	31
3.9.2 METALOPROTEASE-2 (MMP-2).....	31
4. RESULTADOS	33
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS	33
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS E FLAVONOÍDES	33

4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	34
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO	35
4.5 ATIVIDADE ANTIGLICANTE	36
4.6 ATIVIDADE DE EE E EH SOBRE FIBROBLASTOS	37
4.6.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR	37
4.7 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIA.....	50

INTRODUÇÃO

A pele está sujeita ao envelhecimento cronológico assim como qualquer outro tecido, porém como está exposta continuamente ao meio externo, fatores como radiação ultravioleta e poluição aceleram esse processo (FISHER et al., 2002). Com o aumento da expectativa de vida associado à preocupação em manter a aparência jovem, a busca por cosméticos capazes de prevenir e tratar diferentes alterações cutâneas decorrentes do envelhecimento é cada vez maior (RAMOS-E-SILVA et al.; 2013).

A radiação ultravioleta é capaz de promover o envelhecimento cutâneo por meio de uma sequência complexa e específica de respostas celulares, as quais provocam danos ao tecido conectivo da pele. O mecanismo primário pelo qual a mesma atua é por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (FISHER et al., 2002). O estresse oxidativo é capaz de alterar a regulação de mediadores celulares que culmina no aumento da expressão das metaloproteases, enzimas responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular da pele, como por exemplo, o colágeno e elastina (CALLAGHAN e WILHELM, 2008). Além disso, as EROS provocam danos oxidativos diretos nos componentes celulares, como por exemplo, membranas, mitocôndrias e DNA (HAN et al., 2014). Algumas alterações histológicas são consequências de modificações proteicas associadas a reações oxidativas, como por exemplo, a glicação. A formação dos produtos finais de glicação avançada ocorre entre proteínas e compostos dicarbonílicos, dessa maneira proteínas da matriz dérmica, como colágeno, ao sofrerem glicação, acumulam-se e aceleram o processo de apoptose de fibroblastos, exacerbando assim o fotoenvelhecimento (KATTA e DESAI, 2014; RADJEI et al., 2016).

Frente à importância do estresse oxidativo e dos componentes da matriz extracelular na fisiopatologia do envelhecimento cutâneo associados à tendência em utilizar compostos derivados de produtos naturais, a espécie *Cecropia pachystachya* Trécul se apresenta como uma possível alternativa na prevenção do fotoenvelhecimento. Isto porque estudos anteriores mostraram que géis contendo extrato dessa espécie causaram um aumento na deposição de colágeno em feridas de ratos. Atividade antioxidante também foi descrita para a espécie (DUQUE et al.; 2016; MUKHERJEE et al., 2011).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produtos naturais

Existem relatos do uso de plantas com finalidades médicas desde os tempos mais remotos. Na Mesopotâmia há 2.600 a.C mais de 1000 substâncias derivadas de plantas foram descritas. No tratado médico egípcio "*Ebers Papyrus*", datado de 1500 a.C., são relatadas cerca de 700 substâncias, sendo a maioria originada de plantas (BORCHARDT, 2002). Até o final do século XVIII, o uso das plantas medicinais era empírico. Porém, no início do século XIX, com o isolamento da morfina, a busca por novos compostos bioativos passa a ter bases racionais. Em meados do século XIX, a fim de reduzir os custos e facilitar a produção, iniciou-se o processo de síntese química de produtos naturais, sendo o ácido salicílico o primeiro composto natural produzido sinteticamente (ATANASOV et al., 2015).

Atualmente, os produtos naturais (PNs) tem sido a maior fonte de descoberta de novas moléculas empregadas na medicina (ATANASOV et al., 2015). Isso se deve ao fato dos PNs exibirem variados farmacóforos e alta estereoseletividade, características que contribuem para interação com alvos farmacológicos (DREWRY e MACARRON, 2010). Ademais, outra vantagem em relação aos compostos sintéticos é a maior facilidade de atingir o meio intracelular, através da interação com sistemas transportadores (HARVEY, EDRADA-EBEL e QUINN, 2015). Entretanto, apenas aproximadamente 6% das plantas foram avaliadas farmacologicamente, e 15% foram analisadas fitoquimicamente (CRAGG e NEWMAN, 2013).

No período de 01/1981 a 12/2014, 1562 novas moléculas foram registradas no FDA (Food and Drug Administration). Muitas drogas disponíveis no mercado são desenvolvidas a partir de um protótipo natural, ou até mesmo é um produto natural. No caso do câncer, da década de 40 até 2014, foram aprovadas 175 novas moléculas para o tratamento da doença. Sendo que 75% não são puramente sintéticas, ou seja, são produtos naturais ou diretamente derivados dos mesmos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Entre 2008 e 2013, 25 drogas oriundas de produtos naturais foram aprovadas pelo mercado mundial, sendo cinco classificadas como produto natural, 10 como produtos naturais semissintéticos e 10 drogas derivadas de produtos naturais (BUTLER, ROBERTSON e COOPER, 2014).

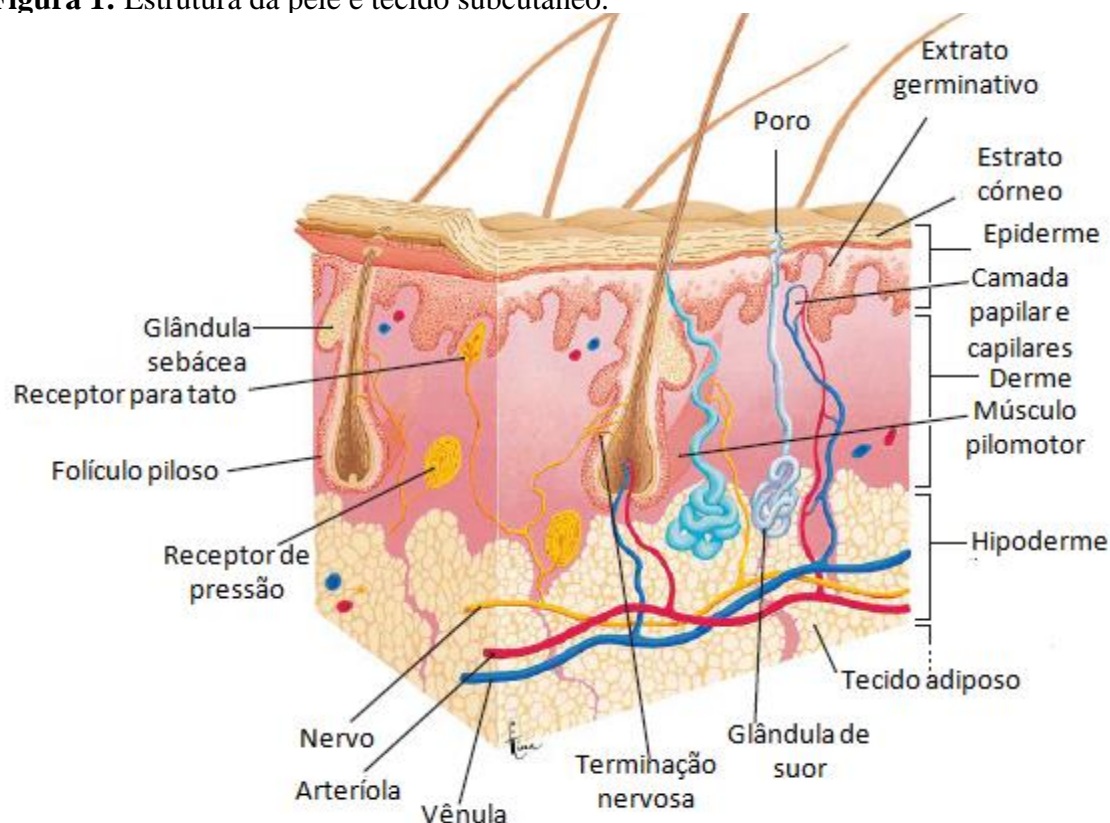
Em relação ao cenário dos produtos cosméticos, há uma crescente busca por produtos que contenham ingredientes naturais ou orgânicos. Extratos vegetais ou substâncias isoladas são empregados em formulações para o cuidado da pele e dos cabelos, como por exemplo, xampus, sabonetes, fotoprotetores e tinturas capilares (ANTIGNAC et al., 2011). Uma das

vantagens dos produtos naturais em relação ao princípio sintético são os efeitos adicionais ao efeito principal (ABURJAI e NATSHEH, 2003). De maneira particular, o emprego de extratos vegetais na proteção contra o fotoenvelhecimento é algo benéfico e possui maior aceitação dos consumidores, em relação aos produtos constituídos apenas por sintéticos, pois podem conferir múltiplas ações em um único produto: atividade antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora, emoliente e umectante (RAMOS et al.,2003).

1.2 Pele

A pele humana é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 5,5% da massa corporal de um adulto (GOLDSMITH, 1990). Possui cerca de 1,5 m² de área e 3mm de espessura (BREATHNACH,1975). Dentre as funções exercidas pela mesma, destaca-se a proteção ao organismo contra radiação ultravioleta (UV), agressões mecânicas, químicas e térmicas. Além disso, por ser uma barreira impermeável que separa o meio externo da homeostase interna, atua impedindo a desidratação excessiva e a entrada de micro-organismos. A pele ainda pode ser considerada um órgão sensorial, uma vez que possui diversos receptores para temperatura, dor, pressão e tato (BECHELLI e CURBAN, 1975). Ademais, participa da síntese de vitamina D3, na regulação da temperatura corpórea, secreção de eletrólitos, dentre outras funções (SOUSA e VARGAS, 2004). A figura 1 exhibe o esquematicamente a pele e seus anexos.

Figura 1: Estrutura da pele e tecido subcutâneo.



FONTE: adaptado de Scanlon e Sanders, 2014.

A pele é classificada histologicamente em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). Tais camadas são originadas de tecidos ectodérmico e mesodérmico (SOUSA e VARGAS, 2004). A camada mais externa é denominada epiderme, a qual possui cerca de 0,05 a 1,5 mm de espessura e é formada por quatro tipos celulares, sendo eles queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckel (FORSLIND, 1995; RABE et al., 2006). Suas funções estão descritas na Tabela 1. O principal tipo celular da epiderme são os queratinócitos, os demais tipos celulares encontram-se distribuídos entre esses.

Tabela 1: Tipos celulares da epiderme e suas respectivas funções

Tipo celular	Função
Queratinócito	Barreira mecânica, produção de citocinas e sinalização celular.
Melanócito	Proteção da pele dos raios ultravioleta, através da síntese de melanina.
Células de Langerhans	Barreira imunológica: fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos.
Células de Merkel	Percepção sensorial

Fonte: Adaptado de SCANLON e SANDERS, 2014.

Quanto à espessura, a epiderme pode ter quatro (pele fina) ou cinco camadas (pele espessa) (GARTNER e HIATT, 2007).

A camada mais profunda da epiderme, denominada camada basal, é formada por células em intensa atividade mitótica que darão origem aos queratinócitos, sendo responsável pela renovação da epiderme (GARTNER e HIATT, 2007). Porém, apenas 15% dessas células estão envolvidas no processo de renovação celular contínuo, as demais estão em estado de quiescência (BLANPAIN, e FUCHS, 2006). A camada espinhosa ainda possui queratinócitos em atividade mitótica, porém em quantidades inferiores à camada basal (GARTNER e HIATT, 2007). A fim de promover a união entre as células da epiderme e a resistência ao atrito, já apresentam diferenciações como desmossomos e tonofilamentos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Na terceira camada, denominada camada granulosa, os queratinócitos secretam por exocitose queratoialina, Tal substância promove a formação de uma camada rica em lipídios, a qual impermeabiliza a epiderme e impede a chegada de nutrientes na próxima camada (camada lúcida) (GARTNER e HIATT, 2007). A camada lúcida, presente em peles espessas, encontra-se entre a camada granulosa e a camada córnea. As células dessa camada possuem citoplasma com filamentos de queratina e já não dispõem de núcleo e organelas, uma vez que foram digeridas por enzimas lisossomais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A última camada é designada camada córnea, constituída de células mortas com citoplasma ricamente queratinizado (queratinócitos diferenciados denominados corneócitos) aderido ao compartimento lipídico. Tal arquitetura permite a formação de uma barreira impermeável e mecanicamente resistente (FORSLIND, 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MADISON, 2003).

A derme encontra-se abaixo da epiderme, é composta por tecido conjuntivo e possui cerca de 1 a 4 mm de espessura (SILVER et al., 2001). Nessa camada estão presentes as raízes de folículos pilosos, terminações nervosas, glândulas (sebáceas e sudoríparas) e vasos sanguíneos. É constituída de fibras colágena e elástica, as quais são sintetizadas pelos fibroblastos, imersas em substância fundamental amorfa (SCANLON e SANDERS, 2014). A substância fundamental amorfa é composta por macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina) que se ligam a receptores proteicos na superfície celular (integrinas) conferindo viscosidade à mesma. Devido a essa característica, é capaz de impedir a penetração de micro-organismos e atuar como lubrificante. A matriz extracelular (MEC) é então formada por líquido extracelular, substância fundamental amorfa e fibras (elásticas, reticulares e colágenas) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O colágeno é a principal fibra insolúvel da

matriz extracelular e do tecido conjuntivo, sendo responsáveis por conferir à derme integridade estrutural e mecânica. Os colágenos mais frequentes na derme são do tipo I e III e são sintetizados pelos fibroblastos (POON, KANG, CHIEN, 2015). O colágeno tipo I é majoritário na constituição da derme íntegra, chegando a 90% de sua composição. Possui função de resistência à força de tração, devido ao fato de serem fibras mecanicamente estáveis (SILVA et al., 2008). As fibras elásticas representam 2-4% da matriz extracelular. São compostas por microfibrilas e componentes de elastina, atribuindo propriedades elásticas à pele através da formação de uma rede elástica (TZAPHLIDOU, 2004; USHIKI, 2002).

Com base em características histológicas, a derme é dividida em duas camadas distintas: derme papilar (superficial) e derme reticular (profunda). A derme papilar é uma camada delgada que sustenta a epiderme. É constituída de tecido conjuntivo frouxo, fibras colágeno tipo III, as quais são mais finas e não se agrupam em feixes; fibras colágenas tipo IV e fibras elásticas, cuja função é união da derme à epiderme (GARTNER e HIATT, 2007; PROST-SQUARCIONI et al., 2008; SORRELL, BABER, e CAPLAN, 2004). A derme reticular corresponde a 10% da espessura da derme. É formada de tecido conjuntivo denso não modelado; fibras elásticas entrelaçadas; fibras colágenas tipo I mais curtas e espessas dispostas em vários sentidos, sendo a maioria paralela à epiderme; e fibras colágenas tipo III permeando as demais fibras (SOUSA e VARGAS, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Na derme podem-se encontrar fibras reticulares, que são fibras colágenas delgadas. O colágeno recém-formado consiste em fibras grandes, porém em determinadas áreas, as fibras colágenas estão sob a forma de fibras reticulares, ou seja, não irão assumir o tamanho da fibra colágena (LEVER e SHAUMBURG-LEVER, 1991).

A junção dermoepidérmica é responsável por separar a epiderme da derme. É composta por proteínas da matriz extracelular produzidas por fibroblastos, sendo caracterizada pela presença de papilas dérmicas - invaginações da derme que se projetam na epiderme - proporcionando adesão e aumentando a superfície de contato entre as duas camadas, permitindo a troca de oxigênio e nutrientes (CIARLETTA e AMAR, 2012; TZAPHLIDOU, 2004).

A camada mais profunda da pele é denominada hipoderme. Os adipócitos são as células predominantes, e desempenha funções de reserva energética, proteção mecânica e térmica (SCANLON e SANDERS, 2014). Além disso, é responsável por conectar a pele aos músculos, permitindo o deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia. Nessa camada encontram-se também fibras colágenas, elásticas e reticulares. Desempenham a

função de nutrir e apoiar células epiteliais, envolver músculos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

1.2.1 Envelhecimento cutâneo

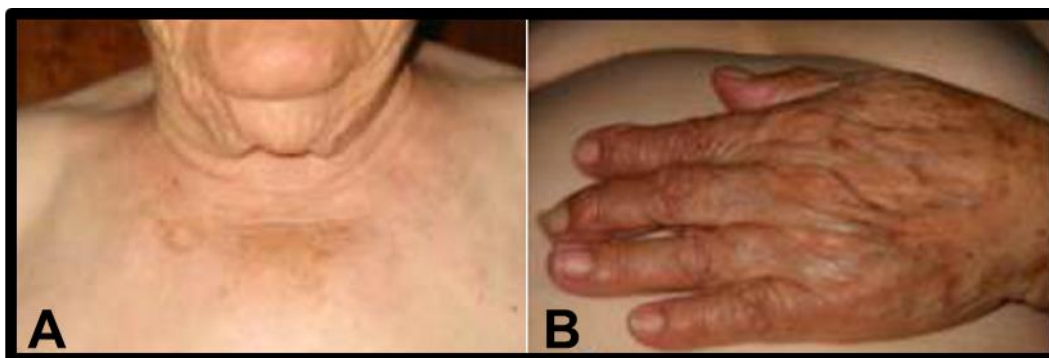
Envelhecimento pode ser definido como o acúmulo de alterações moleculares com o decorrer do tempo (GIACOMONI, 1992). A pele, como qualquer outro tecido do corpo, também está sujeita a esse fenômeno (GIACOMONI et al., 2000). Além disso, por estar em contato direto com o meio ambiente, muitas vezes sofre danos em função das ações do mesmo (FISHER et al.; 2002) Assim, as alterações estruturais, celulares e de matriz extracelular são decorrentes de processos sinérgicos, sendo eles fatores extrínsecos (como fotoenvelhecimento) e intrínsecos (cronológico) (GIACOMONI et al., 2000; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI; 2011).

O envelhecimento intrínseco é um evento geneticamente programado que promove a redução da síntese proteica e da proliferação celular, influenciando na constituição tanto da derme quanto da epiderme (PAGEON e ASSELINEAU, 2005; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI, 2011). Porém, a matriz extracelular da derme é a área com maiores alterações. As fibras de colágeno, que na pele jovem (20-30 anos) são abundantes, firmemente empacotadas e bem organizadas, na pele naturalmente envelhecida (aproximadamente 80 anos) são fragmentadas e desorganizadas. Fenômeno esse, que também ocorre com as fibras elásticas. Ademais, há um desequilíbrio na homeostase do colágeno, pois há um aumento de sua degradação e uma redução de sua síntese, estabelecendo-se a deficiência do mesmo, a qual resulta em uma pele fina e frágil (FISHER, VARANI, VOORHEES, 2008; QUAN et al., 2010). Assim como ocorre com os fibroblastos, a atividade metabólica dos queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans também é reduzida, com consequente comprometimento da renovação das células da epiderme (RABE et al., 2006). Com essas alterações estruturais, a pele desenvolve rugas finas e tênues (QUAN e FISHER, 2015). Em decorrência de uma deficiente rede vascular em torno de bulbos capilares e glândulas, essas estruturas podem atrofiar. Funções como síntese de vitamina D e defesa imunológica, também são comprometidas, assim como, proteção, excreção, secreção e absorção (RAMOS-E-SILVA e DA SILVA CARNEIRO, 2007). De maneira geral, os tratamentos tópicos não podem retardar o envelhecimento intrínseco (BEITNER, 2003).

1.2.2 Fotoenvelhecimento cutâneo

A pele por estar em contato com o meio ambiente, além do envelhecimento cronológico (intrínseco), também está sujeita ao envelhecimento como consequência das agressões ambientais. Assim, a combinação do envelhecimento intrínseco associado à radiação UV é denominada fotoenvelhecimento (FISHER et al.; 2002; TSOURELI-NIKITA, WATSON e GRIFFITHS, 2006). A pele fotoenvelhecida apresenta rugas profundas, despigmentação e notável perda da elasticidade (ZENG et al.,2014). A figura 2 exibe o aspecto da pele naturalmente envelhecida e da pele fotoenvelhecida.

Figura 2: Envelhecimento da pele: (A) Contraste entre área do pescoço fotoenvelhecida e pele abaixo do pescoço naturalmente envelhecida (B) Contraste entre pele da mão fotoenvelhecida e área da barriga naturalmente envelhecida



Fonte: KOSMADAKI E GILCHREST, 2004.

As alterações histológicas identificadas ocorrem, sobretudo, na derme. Porém, na epiderme há modificações de pigmentação, como lentigo, hiperpigmentação e hiperqueratose da camada córnea (RAMOS-E-SILVA e DA SILVA CARNEIRO, 2007). Na derme, geralmente há um aumento do número de fibroblastos, acompanhado de redução da síntese de colágeno tipo I e III, em função do *down-regulation* exercido pelo colágeno recém-sintetizado (RABE et al., 2006). A elastose solar é uma característica peculiar do fotoenvelhecimento. Consiste na substituição da elastina funcional por material elástico espesso e emaranhado com funcionalidade alterada (KAWABATA et al., 2014). Segundo Baillie e colaboradores (2011), o nível de substituição da elastina está relacionado com o grau de exposição à luz UV.

1.2.2.1 Estresse Oxidativo e envelhecimento cutâneo

O estresse oxidativo é estabelecido quando há um desequilíbrio entre a quantidade de espécies oxidantes geradas e a capacidade antioxidante do organismo (PISOSCHI e POP, 2015). As espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser radicais, ou seja, que possuem elétrons desemparelhados, como por exemplo, o radical aniônico superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($HO\cdot$); ou não radicais, os quais são também extremamente reativas devido a sua instabilidade, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio molecular simpleto ($1/2 O_2$) (RIBEIRO et al., 2006). Ambos possuem a capacidade de oxidar moléculas as quais estão em contato (FILOMENI, DE ZIO e CECCONI, 2015).

As EROSs podem ser produzidas por meio do metabolismo aeróbico celular ou devido a infecções microbianas, a poluentes e toxinas, como por exemplo, álcool e tabaco, pesticidas radiação UV e ionizante (POLJSAK, ŠUPUT e MILISAV, 2012). Nas células eucarióticas, a mitocôndria é responsável pela formação do trifosfato de adenosina (ATP) e, conseqüentemente, é a maior fonte endógena de EROs. Para geração de ATP é necessário que uma série de fosforilações oxidativas ocorra, porém alguns elétrons escapam da cadeia transportadora de elétrons e interagem com oxigênio molecular resultando no radical aniônico superóxido, o qual é espontaneamente ou enzimaticamente convertido em peróxido de hidrogênio ou radical hidroxil (RAHAL et al., 2014; SKULACHEV, 2012). Contudo, o retículo endoplasmático, assim como os peroxissomos e as membranas plasmáticas e nucleares também são capazes de formar tais espécies (RINNERTHALER et al., 2015). Para que os níveis das substâncias oxidantes mantenham-se baixos, o organismo é provido de um sistema antioxidante que atua promovendo sua eliminação, assim como a redução dos efeitos nocivos dos mesmos (LUSHCHAK, 2014). O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase, capaz de converter superóxido em peróxido de hidrogênio; catalase e glutatona redutase, responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio em água (FINKEL e HOLBROOK, 2000). Há ainda um sistema não enzimático que também é capaz de capturar radicais livres e é composto por elementos de baixo peso molecular como, por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides, antocianinas, polifenóis, ubiquinol, ácido úrico e a glutatona (RAHAL et al., 2014).

O estresse oxidativo está associado com a patofisiologia e a patogênese de diversas doenças crônicas como, por exemplo, as doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Esclerose Amiotrófica Lateral e doença de Huntington's), enfizema, asma, catarata, diabetes e doenças cardiovasculares e inflamatórias (PISOSCHI e POP, 2015).

Na pele, a formação de EROs se dá de maneira peculiar, pois a mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático e peroxissomos pouco contribuem para a síntese dos EROs, uma vez que com a cornificação dos queratinócitos todas as organelas são degradadas (HOLBROOK, 1989; JEON, DJIAN e GREEN, 1998). Entretanto, a pele é a interface entre o meio ambiente e a homeostase interna, sendo diretamente exposta a poluentes, xenobióticos e radiação UV. Assim como outros fatores, como ingestão de álcool, deficiências nutricionais e estresse mecânico e fisiológico que contribuem para a formação de EROs (RINNERTHALER et al., 2015)

O sol emite um espectro contínuo de radiação eletromagnética, o qual pode ser subdividido em radiação ultravioleta (200 a 400 nm), que representa cerca de 10% da radiação que atinge o planeta; radiação visível (400 a 700 nm) que constitui 40% da radiação solar e os 50% restantes são radiações infravermelho (700 a 900nm) (SCHALKA, et al., 2014). A radiação UV ainda pode ser subdividida de acordo com suas características de propagação e efeitos fisiológicos em UVA, UVB e UVC, sendo a última filtrada pela camada de ozônio (MAHMOUD et al., 2010; SCHALKA, et al., 2014). A radiação infravermelha está associada com o aumento da temperatura da pele, podendo essa atingir até 40 °C. Com a exposição crônica ao calor, alterações na pele podem ser ocasionadas. Já a luz visível pode induzir a pigmentação, além de contribuir para produção de radicais livres (BALOGH, et al., 2011).

A radiação UV, sobretudo a radiação UVA, ao penetrar na pele é absorvida pelos cromóforos da mesma, como por exemplo, ácido urocânico, riboflavinas, melanina, bilirrubina, porfirina e pterinas, com exceção do DNA. Assim, esses cromóforos são levados para um estado excitado, podendo acontecer duas reações distintas: o retorno para o estado fundamental, através da emissão de calor ou fluorescência; ou ainda reações que conduzem a um estado excitado. O estado excitado é apenas um estado intermediário para reação com o DNA ou com o oxigênio molecular, culminando em EROs, como por exemplo, superóxido, radical hidroxil, oxigênio singuleto ou peróxido de hidrogênio (RINNERTHALER et al., 2015). Segundo Heck et al., (2003) a radiação UVB também é capaz de gerar EROs em queratinócitos. Além disso, o aumento da produção intracelular de H₂O₂ leva a ativação do receptor EGF (fator de crescimento epidérmico), o qual atua como mediador na cascata de ativação da via quinase ativada por mitógeno (MAP) (FISHER, et al., 1999; KULMS e SCHWARZ, 2002). Com a ativação da MAP, a transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1) é induzida. Essa por sua vez, regula a expressão da matriz metaloprotease (MMP), promovendo o seu aumento.

A MMP é uma família de proteases responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular que determina a formação de rugas no envelhecimento extrínseco e intrínseco (BRENNEISEN, SIES e SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2002; FISCHER et al., 2002). Além disso, estão envolvidos em diferentes patofisiologias, como por exemplo, na artrite, no câncer de pulmão, doenças cardiovasculares, na cicatrização de feridas, na angiogênese, dentre outras (FOLGUERAS et al., 2004; PITTAYAPRUEK et al., 2016). As MMPs são classificadas de acordo com dois critérios: o tipo de substrato em que atuam; e se são secretadas como proteínas solúveis ou ligadas à superfície de membranas de células. Assim, quando secretadas como proteínas solúveis podem ser colagenases, gelatinases, estromelinas, e quando aderidas a membrana celular são denominadas MMP tipo membrana (QUAN et al., 2009). Na pele, são secretadas por fibroblastos e queratinócitos em resposta a estímulos diversos, como por exemplo, citocinas, estresse oxidativo e radiação UV (PITTAYAPRUEK et al., 2016).

A família de MMP responsável pela degradação da MEC possui características em comum, como por exemplo, o multidomínio zinco, e depende do elemento cálcio assim como do pH neutro para atividade endopeptidásica (QUAN et al., 2009). A classificação das MMP e sua relação com o fotoenvelhecimento estão enumeradas na Tabela 2.

Tabela 2: Metaloproteases e sinônimos com suas respectivas ações no fotoenvelhecimento.

Subgrupo de MMP	MMP	Nome alternativo	Papel no fotoenvelhecimento
Colagenases	MMP-1	Colagenase intersticial Colagenase Tipo I	Degradação do colágeno tipo I e III
	MMP-8	Colagenase Neutrófila	Papel limitado
Gelatinase	MMP-13	Colagenase-3	Degradação do colágeno tipo IV
	MMP-2	Gelatinase –A Colagenase tipo IV 72 kDa	
	MMP-9	Gelatinase-B Colagenase tipo IV 92 kDa	
Subgrupo de MMP	MMP	Nome alternativo	Papel no fotoenvelhecimento
	MMP-10	Stromelinas- 2	Ativação da pro-

	MMP-11	Transina-2 Stromelisin- 3	MMP -
Matrilisinas	MMP-7	Matrilisina- 1 Pump-1	Degradação da elastina
	MMP-26	Matrilisina-2 Endometase	-
Tipo membrana	MMP-14	MT-1-MMP	-
	MMP-15	MT-2-MMP	
	MMP-16	MT-3-MMP	
	MMP-17	MT-4-MMP	
	MMP-24	MT-5-MMP	
	MMP-25	MT-6-MMP	
Outros tipos	MMP-12	Metaloelastase	Degradação da elastina
	MMP-19	RASI-1	-
	MMP-20	Enamelisina	
	MMP-21	-	
	MMP-22	-	
	MMP-23	-	
	MMP-28	Epilisina	

Fonte: PITTAYAPRUEK et al; 2016.

Assim, a luz UV também é capaz de interferir no metabolismo dérmico através da MMP, uma vez que sua expressão é aumentada frente à radiação UV (BRENNEISEN, SIES e SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2002; FISCHER et al., 2002).

O material genético também pode ser alterado pela radiação UV (ZILLICH et al., 2015). O DNA mitocondrial (*mDNA*) sofre deleções que contribuem para o aumento da produção de EROs pela mitocôndria e, conseqüentemente mais danos ao *mDNA*, estabelecendo assim um ciclo (RINNERTHALER et al., 2015). Os raios UVB são capazes de interagir com o DNA facilitando as dimerizações de bases nitrogenadas, e conseqüentemente, de promover mutações e erros de replicação. Ademais, as radiações UVA atuam impedindo o reparo do DNA (ZILLICH et al., 2015).

A pele também possui naturalmente substâncias antioxidantes, garantindo a proteção intra e extracelular (PINNELL, 2003). Porém, com a exposição excessiva e crônica à radiação UV, estabelece-se um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e os EROs. Assim, o excesso à exposição à luz UV resulta em efeitos prejudiciais a pele (NICHOLS e KATIYAR, 2010).

1.2.2.2 Glicação e envelhecimento cutâneo

Os produtos finais de glicação (AGEs) são formados a partir de reações não enzimáticas como interações amino carbonilo entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos. Em condições fisiológicas, a formação de AGEs transcorre lentamente, comprometendo sobretudo proteínas de vida longa, como por exemplo o colágeno, relacionadas principalmente com o envelhecimento (FORBES, SOLDATOS e THOMAS, 2005). Contudo, em alterações metabólicas, como o diabetes e o estresse oxidativo, por exemplo, há um aumento na sua taxa de formação (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008). Apesar da formação de AGEs ser predominantemente endógena, o fumo e a dieta também são fontes desses compostos (GKOGKOLOU e BÖHM, 2012; PEPPA, URIBARRI e VLASSARA, 2003). Devido a diversidade de precursores, os AGEs são um grupo heterogêneo e complexo, com estruturas ainda não identificadas (OTT et al, 2014). A formação dos AGEs pode ocorrer por diferentes vias. A via denominada clássica ocorre por meio da reação de Maillard ou glicação, e pode ser subdividida em três etapas (inicial, avançada e tardia). A fase inicial é caracterizada pela formação das aminocetoses denominadas produtos de Amadori. Para tal, ocorre a condensação do grupo carbonil do açúcar redutor (glicose, frutose, galactose, manose e xilose) com o grupo amino livre, forma-se então uma base de Schiff instável (aldimina). A fim de tornar a estrutura mais estável, as bases de Schiff sofrem rearranjos estruturais formando então os produtos de Amadori (hemoglobina glicada e frutosamina). Estes, além de serem estruturas estáveis, também são os produtos iniciação da reação de Maillard. (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008; HENLE e MIYATA, 2003; SEMCHYSHYN, 2014). Quando o grupo amino livre envolvido na formação do produto de Amadori pertence a uma proteína de meia vida longa, a reação é reversível (OTT et al, 2014). Na fase avançada, os produtos de Amadori são degradados via hidrólise ou desaminação originando compostos secundários extremamente reativos denominados α -dicarbonils ou α -oxaldeídos (deoxiglucosona, metilglioxal e glioxal) (BEM e KUNDE, 2006; SINGH et al., 2001). Tais compostos também são formados através da oxidação das bases de Schiff, e por meio da autoxidação direta dos açúcares redutores na ausência de grupos amino livres. A autoxidação de açúcares é catalisada por metais de transição, e pode ser observada durante experimentos *in vitro* em que um açúcar redutor é incubado com proteínas na presença de tampão fosfato que possui Cu^{+2} e Fe^{+3} como contaminantes (MONNIER, 2003; OTT et al., 2014). No estágio final, os produtos de Amadori e os oxaldeídos induzem a formação de AGEs através da condensação irreversível

de grupos carbonilas reativos com aminas primárias. O primeiro AGE identificado foi o N-carboximetilisina, resultante da reação entre a lisina e o glioxal ou da quebra oxidativa da frutosamina. A pentosidina é um AGE formado a partir de um resíduo de lisina e um resíduo de arginina que se ligam ao carbono cinco do açúcar redutor. Já a pirralina é um AGE formado através da lisina e da glicose. Já os AGEs GOLD (glioxal-lisina), MOLD (metilglioxal-lisina) e DOLD (3-deoxiglicosona-lisina) são obtidos a partir de dímeros de lisina com glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona respectivamente (HENLE e MIYATA, 2003; GKOGKOLOU e BÖHM, 2012).

A via dos poliois é uma via alternativa capaz de gerar AGEs, tendo como principal produto o 3-desoxiglicosona. Inicialmente a glicose é reduzida em sorbitol por ação da enzima aldose redutase. O sorbitol é convertido em frutose por meio da enzima sorbitol-desidrogenase. A frutose por sua vez, é desidratada formando 3-desoxiglicosona; ou ainda, através da enzima frutose-3-fosfoquinase, a frutose é convertida em frutose-3-fosfato que ao perder uma molécula de ácido fosfórico resulta em 3-desoxiglicosona (CONTRERAS e NOVAKOFSKI, 2010; SEMCHYSHYN, 2014).

A formação de AGEs pode ainda decorrer de uma rota alternativa, em que através da peroxidação lipídica, compostos dicarbonílicos são formados (HUEBSCHMANN et al., 2006). Os ácidos graxos polinsaturados, quando em contato com espécies reativas de oxigênio, formam radicas peróxidos que são extremamente reativos. Oxidações sucessivas promovem a produção de hidroperóxidos lipídicos e peróxido de hidrogênio, os quais serão substrato para posteriores oxidações, formando as espécies reativas de carbonil, como o malonaldeído, 4-hidroxi-trans-2-nonenal e α -oxoaldeídos (glioxal, metilglioxal, 3-desoxiglicosona).

Algumas células de defesa como neutrófilos, monócitos e macrófagos, também podem contribuir para formação de AGEs, uma vez que, com o estímulo inflamatório há liberação de mieloperoxidase e ativação NADPH oxidase, enzimas capazes de oxidar aminoácidos e, assim, formar aldeídos reativos que se ligam covalentemente a proteínas (URIBARRI e TUTTLE, 2006).

A fim de prevenir o acúmulo e efeitos deletérios dos AGEs, o organismo dispõe de alguns mecanismos de defesa celulares e humorais (RAHBAR et al., 2000). O sistema glioxalase é a principal defesa frente à glicação e ao estresse oxidativo (SADOWSKA-BARTOSZ e BARTOSZ, 2016). Atua sobre os compostos carbonílicos reativos impedindo seu acúmulo e reorganização. O sistema citosólico glioxilase é composto pela glioxiase I e II, responsáveis pela conversão dos α -oxaldeídos em α -hidroxiácidos. A glioxilase I é

responsável pela conversão do hemiacetal em S-2-hidroxiacilglutaciona. A glioxilase II catalisa S-2-hidroxiacilglutaciona em α -hidroxiácido e glutaciona. O aumento do estresse oxidativo é prejudicial para essa via, uma vez que reduz os níveis de glutaciona disponível (OTT et al., 2014). As enzimas aldose redutase e aldeído redutase também estão envolvidas no processo de defesa do organismo, contudo o substrato dessas enzimas são 3-deoxiglucosona e seus derivados. O estresse oxidativo também é prejudicial para a ação da enzima aldeído redutase, uma vez que é necessário NADPH para a ação da mesma. Porém, em condições de estresse oxidativo, também há consumo NADPH, deixando-a menos disponível para reações com a aldeído redutase (ABORDO, MINHAS e THORNALLEY, 1999; RABBANI e THORNALLEY, 2015). Já a deglicação dos produtos de Amadori já formados é realizada por duas classes de enzimas: frutosamina oxidase e frutosamina quinase. Ambas reconhecem o produto de Amadori como substrato e atuam por diferentes mecanismos de deglicação. A frutosamina quinase fosforila os produtos de Amadori em frutolisina-3-fosfato, a qual é decomposta em lisina, fosfato inorgânico e 3-desoxiglucosona. A obtenção de 3-desoxiglucosona como produto da reação é algo desfavorável ao processo, uma vez que tal composto é altamente reativo podendo gerar outros AGEs. Já a frutosamina oxidase atua por meio da oxidação dos produtos de Amadori com liberação de peróxido de hidrogênio. O produto de Amadori uma vez oxidado é decomposto por hidrólise (WU e MONNIER, 2003).

A remoção dos AGEs dos componentes teciduais pode ocorrer por duas vias: através da proteólise extracelular ou pelas células *scavengers*, como por exemplo macrófagos, que são dotadas de receptores que permitem a endocitose dos AGEs. Após a degradação intracelular, os AGE-peptídeos, que são solúveis e de baixo peso molecular, são liberados na corrente sanguínea para eliminação via renal. Dessa maneira, o *clearance* renal é um fator determinante para eficiência do sistema de remoção de AGEs (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008).

O acúmulo de AGEs decorre da ineficiência de eliminação e metabolismo dos mesmos, o que implica em envelhecimento e processos patológicos tais como aterosclerose, câncer, diabetes, neuropatia, Doença de Alzheimer, nefropatia diabética, doenças respiratórias e hepáticas (FOSTER et al., 2014; VERMA e MANNA, 2017). De maneira geral, os danos provocados pelos AGEs sucedem de três mecanismos: modificação de proteínas intracelulares e componentes da matriz extracelular modificados por AGEs que interagem de maneira anômala com outros componentes da matriz e com receptores expressos na membrana celular; e através da interação de proteínas plasmáticas modificadas por AGEs com receptores presentes na superfície celular (GIACCO e BROWNLEE, 2010). Há vários receptores

passíveis de se ligarem aos AGEs, contudo os que foram melhores caracterizados são os receptores multiligantes de AGE (RAGE). Pertencem à superfamília das imunoglobulinas e estão localizados na superfície celular. A expressão dos mesmos é regulada em função de modificações metabólicas que ocorrem, por exemplo, durante o envelhecimento, diabetes e hiperlipidemia. Podem ser expressos em diferentes tipos celulares, dentre eles monócitos/macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, células dentríticas, fibroblastos, células da musculatura lisa, células neuronais, células da glia, condrócitos e queratinócitos (OTT et al., 2014). A interação com o receptor RAGE é capaz de induzir a produção de EROS, as quais promovem a ativação de genes responsáveis pela transcrição de NF-Kb, o qual provoca múltiplas alterações patológicas na expressão gênica (GIACCO e BROWNLEE, 2010).

Em relação à pele, a glicação está associada ao envelhecimento cutâneo, acometendo as células (fibroblastos e células endoteliais) e proteínas estruturais, como por exemplo, colágeno, elastina, glicoproteínas e glicosaminoglicanas (CRISAN et al., 2013). Os AGEs alteram a homeostase da pele por diferentes mecanismos: 1) por indução à apoptose ou por ação tóxica aos fibroblastos, diminuindo a viabilidade celular dos mesmos; 2) pela promoção de modificações na MEC capazes de afetar o crescimento, diferenciação e motilidade de fibroblastos, alterar atividades enzimáticas (MMP) e respostas a citocinas e, até mesmo a homeostase vascular (CRISAN et al., 2013; SHIN et al., 2015); 3) por modificações oxidativas, que também podem provocar danos moleculares que resultam no envelhecimento cutâneo (RADJEI et al., 2016). A ativação dos RAGE pelos AGEs também contribui para o envelhecimento, pois há alteração na sinalização celular e na expressão gênica que culminam com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e formação de EROs (SHIN et al., 2015).

Frente aos malefícios provocados pelos AGEs, a busca por alternativas capazes de impedir sua formação tornam-se cada vez mais importantes. Alguns compostos são capazes de impedir a formação dos AGEs ou até mesmo degradar AGEs recém produzidos (RICHARDSON et al., 2015). A aminoguanidina foi o primeiro composto estudado com o propósito de impedir a formação de AGEs, reagindo com os produtos iniciais da glicação. Em modelos animais mostrou-se promissora. Entretanto, em estudos clínicos direcionados ao tratamento das comorbidades diabéticas, seu uso foi suspenso por questões de segurança, uma vez que a mesma é capaz de inibir a oxido nítrico sintetase (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008; RICHARDSON et al., 2015; SADOWSKA-BARTOSZ e BARTOSZ, 2016). Alguns efeitos adversos foram relatados durante o uso da aminoguanidina, dentre eles: distúrbios gastrointestinais, sintomas gripais, insuficiência hepática, anemia e vasculite. A

piridoxamina, um derivado da vitamina B6, é capaz de reagir com os intermediários carbônicos e com produtos de Amadori (SADOWSKA-BARTOSZ e BARTOSZ, 2016). Assim como a aminoguanidina, também é capaz de prevenir as complicações diabéticas em roedores (PRICE et al, 2001).

1.2.2.3 Prevenção do fotoenvelhecimento

Considerando a fisiopatologia da pele fotoenvelhecida, alguns tratamentos podem ser empregados, a fim de prevenir, proteger e restabelecê-la. As duas principais vertentes são: bloqueio à absorção de raios UV e medicamentos para o tratamento de danos já provocados pela mesma. A fotoproteção é uma estratégia preventiva ao fotoenvelhecimento. Consiste em impedir a absorção da radiação UV, através do uso de filtros solares e roupas que possuam fator de proteção solar. O tratamento dos danos provocados pela radiação envolve a aplicação de retinoides tópicos, 5-fluoracil e cosmecêuticos. Os retinoides atuam em fatores de transcrições, aumentando a síntese de colágeno, a proliferação de fibroblastos e impedindo a degradação da matriz extracelular da derme. Os cremes que contem 5-fluoracil atuam, sobretudo, aumentando a síntese de pró-colágeno tipo I. Já os cosmecêuticos incluem antioxidantes e extratos vegetais. Os antioxidantes são capazes de proteger as células dos danos provocados pelos radicais livres. Os principais antioxidantes são: coenzima Q, ácido lipoico, vitamina C e E. Os extratos vegetais podem atuar de diversas maneiras. Acredita-se que o extrato derivado da espécie *Camellia sinensis* é capaz de inibir a MMP. Já o extrato oriundo da *Ginkgo biloba*, além da atividade anti-inflamatória, é capaz de induzir a proliferação de fibroblastos (HAN, CHIEN e KANG, 2014; POON, KANG e CHIEN, 2015).

Nesse contexto, os polifenóis são substâncias promissoras a serem incorporadas em formulações, uma vez que são capazes de absorver radiação UV além de serem potentes antioxidantes. Esses compostos são capazes de reduzir os efeitos nocivos do sol. Segundo Nichols e Katiyar (2010), os polifenóis combatem a inflamação, o estresse oxidativo e danos ao DNA induzidos pela radiação UV. Outra característica dessa classe é a inibição da atividade da collagenase e da elastase, enzimas responsáveis pela degradação do colágeno e elastina, respectivamente. Fato que deve ser destacado, pois com a formação excessiva de EROs, a expressão dessas enzimas fica aumentada. Conseqüentemente, o emprego dos polifenóis na terapia e prevenção do fotoenvelhecimento é justificado por diferentes modos de ação dos mesmos (ZILLICH et al., 2015).

2 GÊNERO CECROPIA

O gênero *Cecropia* Loefl. pertence à família *Urticaceae* Jussque compreende 55 gêneros e cerca de 2000 espécies, abrangendo áreas tropicais e temperadas (GAGLIOTI e ROMANIUC-NETO,2014; WU et al., 2013).É uma família que apresenta vasta diversidade morfológica, podendo ser encontradas ervas, arbustos e árvores(GAGLIOTI e ROMANIUC-NETO, 2014). O gênero *Cecropia* é constituído por árvores que podem atingir até 22 metros (SPOSITO e SANTOS, 2001) e possui cerca de 80 espécies com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, sendo nas regiões tropicais as áreas de maior diversidade de espécie. São encontradas espécies na América Central e do Sul, distribuídas do sul do México ao norte da Argentina (BERG, FRANCO-ROSELLI e DAVIDSON 2005; PAROLIN, 2002; SOUCCAR, 2008).

Normalmente, as espécies do gênero *Cecropia* são encontradas em locais úmidos e altitudes de até 2600 metros (FRANCO-ROSSELLI e BERG, 1997). As espécies desse gênero são consideradas pioneiras típicas de formações florestais, uma vez que são encontradas em áreas de regeneração florestal e clareiras de vegetação secundária. Entretanto, há também espécies em florestas maduras e primárias (GUERRERO et al., 2010; NETO, GAGLIOTI e GUIDO, 2009).

Espécies de *Cecropia* são amplamente utilizadas na medicina tradicional dos países da América Latina. São empregadas como broncodilatadores, antimicrobiana, diuréticas, anti-inflamatórias, hipotensores, cicatrizantes, antitérmicos, hipoglicemiantes e tranquilizantes. Frente à ampla utilização na medicina popular, despertou-se um grande interesse para o estudo científico dessas plantas (COSTA, SCHENKEL, e REGINATTO, 2011; DUQUE et al., 2016). Alguns metabólitos especiais já foram identificados nessas espécies, dentre eles substâncias fenólicas e compostos das classes de flavonoides, triterpenos e taninos (JOSÉ-CHAGAS et al.,2014).

No Brasil há 26 espécies do gênero *Cecropia* (JOSÉ-CHAGAS et al.,2014). As espécies *Cecropia glaziovii* e *Cecropia pachystachya* são endêmicas das regiões sul e sudeste, além do estado da Bahia (FLORA DO BRASIL 2020,2017; BERG e ROSSELLI, 2005). Estudos demonstraram que a espécie *C.glazioui* possui atividade anti-hipertensiva (LIMANLANDMAN et al., 2007), ansiolítica, antidepressiva (ROCHA, F. F., et al., 2007), antiasmática (DELARCINA Jr. et al., 2007) e atua em distúrbios estomacais (SOUCCAR et al., 2008).

Já a espécie *Cecropia hololeuca* pode ser encontrada no sudeste e no estado da Bahia (FLORA DO BRASIL 2020,2017). Segundo Brandão e colaboradores (2008), tal espécie é empregada no tratamento de tosse, resfriado, gonorreia e como anti-diarréica e diurética. Porém essas atividades não foram comprovadas por meio de ensaios farmacológicos. A espécie *Cecropia membranacea* está presente nos estados do Acre, Amazonas e Pará e o extrato metanólico provenientes de suas folhas foi capaz de atuar no sistema nervoso central de ratos como anticonvulsivante e ansiolítico (JARAMILLO, RINCÓN e GUERRERO, 2008; FLORA DO BRASIL 2020,2017). A fração butanólica proveniente da espécie *Cecropia peltata* também se mostrou ativa a nível central como anticonvulsivante, ansiolítica e sedante em ratos. Também é empregada é empregada pela população em distúrbios cardíacos, respiratórios e como diurético (CHAVEZ, VELANDA e PABON, 2013). Ademais, já foi relatado efeito frente às cepas *Neisseria gonorrhoeae* da fração hidroalcolica *in vitro* (CÁCERES et al., 1995); atividade cicatrizante dos extratos aquoso e etanólico em uso tópico e oral em ratos (NAYAD, 2006); capacidade de reduzir os níveis de glicose sérica ao administrar os extrato metanólico das folhas em ratos normais (NICASIO et al., 2005); laxativo e bactericida (CANO e VOLPATO, 2004). Estudos *in vitro* indicaram potencial atividade agonista de receptores de estrogênio, progesterona e serotonina, bem como inibidor da COX-2 (MICHEL, CACERES e MAHADY, 2016). No Brasil, pode-se encontrar *C. peltata* nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Roraima (FLORA DO BRASIL 2020,2017).

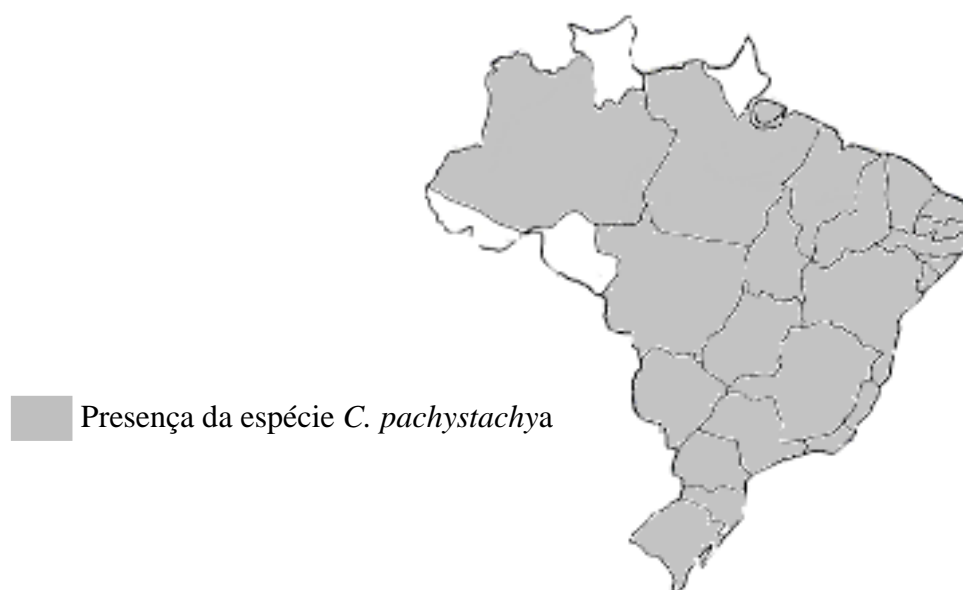
Apesar da espécie *Cecropia obtusifolia* não ser encontrada em território brasileiro, é amplamente distribuída na costa leste e oeste do México (ANDRADE-CETTO e VÁZQUEZ, 2010). É empregada no tratamento de diabetes, uma vez que é relatada sua atividade hipoglicemiante; além disso, possui ação analgésica, anti-inflamatória e depressora central (ANDRADE-CETTO, 2009; ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005; PEREZ-GUERRERO et al., 2001; REVILLA-MONSALVE et al., 2007). Os possíveis mecanismos pelos quais há redução da glicemia sanguínea são: entrada de glicose nos adipócitos e o bloqueio da gliconeogênese hepática (ANDRADE-CETTO e VÁZQUEZ, 2010; ALONSO-CASTRO et al., 2008).

2.1 *Cecropia pachystachya* Trécul

A espécie *Cecropia pachystachya* Trécul é encontrada em todos os estados brasileiros, com exceção dos estados do Acre, Amapá, Rondônia e Roraima (FLORA DO BRASIL 2020,2017) (Figura 2). Também está presente no norte da Argentina e Paraguai (CONSOLINI e MIGLIORI, 2004). Conhecida popularmente como embaúva, embaúba, imbaúba, umbauá,

árvore da preguiça e toré, a árvore pode atingir até 12 metros de altura (SOUZA et al., 2014; COSTA et al., 2011). Apresenta um único conjunto de órgãos sexuais por indivíduo, classificando-as como dioicas (CONSOLINI e MIGLIORI, 2004). A floração ocorre entre os meses de agosto e fevereiro, com auge em dezembro (ZALAMEA et al., 2011). Possui folhas grandes com coloração verde-escuro na porção superior e cinza-esbranquiçado com presença de pelos finos e macios na porção inferior (COSTA et al., 2011; CONSOLINI e MIGLIORI, 2004) (Figura 3). *Cecropia carbonaria* Mart., *Cecropia catarinensis* Cuatrec., *Cecropia cyrtostachya* Miq. e *Cecropia lyratiloba* Miq. são as principais sinonímias para a espécie (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

Figura 3: Distribuição da espécie *C. pachystachya* no território brasileiro



FONTE: *Cecropia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**, 2017.

Figura 4: Folhas e árvore da espécie *C. pachystachya*



FONTE: Fernandes, 2017

Levantamentos etnobotânicos indicam que *C. pachystachya* é empregada como hipoglicemiante, cardiotônica, expectorante (DE SOUZA e FELFILI, 2006), diurética, antiblenorrágica (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), analgésico em dores renais (BESSA et al., 2013), no tratamento de doenças respiratórias (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), renais (ALVES e POVH, 2013), na obesidade e nas dislipidemias (SILVA et al., 2010).

Frente às atividades atribuídas à espécie pelo uso tradicional, algumas já foram comprovadas por estudos farmacológicos, dentre elas o efeito hipoglicemiante, atribuído à presença de c-glicosilflavonoides e ao ácido clorogênico (ARAGÃO et al., 2010); atividade cardiotônica, conferido pela inibição central colinérgica (CONSOLINI et al., 2006; CONSOLINI e MAGLIORI, 2004), efeito analgésico (KLANK, 2014) e redutor da inflamação renal (MAQUIAVELI et al., 2014). Contudo, segundo Consolini e Migliori (2004) em estudo realizado com *C. pachystachya* em ratos, não foi observado efeito diurético.

Ademais, atividades ainda não relatadas pelo uso popular já foram identificadas, sendo utilizadas diferentes partes da espécie assim como diversos solventes para extração. O extrato metanólico proveniente das folhas apresentou atividade hipotensora, atuando como antagonista adrenérgico nos vasos sanguíneos; anti-inflamatória tópica; ativa contra linhagens de células tumorais de melanoma, pulmão e mama (ALMEIDA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2006; CONSOLINI e MAGLIORI, 2004; PACHECO et al., 2014). Triterpenoides isolados do extrato metanólico da casca foram ativos frente a linhagens leucêmicas multirresistentes, sendo uma potencial fonte de agentes citotóxicos (ROCHA, G da G. et al., 2007). O extrato e frações metanólicas provenientes do caule e também das folhas são descritos como coadjuvante de aminoglicosídeos frente à *Staphylococcus aureus* multirresistente (SOUZA et al., 2014). Assim como o extrato metanólico, o extrato em diclorometano das folhas também

exibiu atividade anti-inflamatória oral, limitando os processos de inflamação aguda por meio de apoptose de polimorfonucleares (SCHINELLA et al., 2008). Já o extrato em acetato de etila das folhas demonstrou atividade cicatrizante e antioxidante (DUQUE et al., 2016). O extrato etanólico produzido a partir de diversas partes da planta também apresentou atividade, como por exemplo, efeito leishmanicida do extrato das folhas (CRUZ et al., 2013); ação antimalárica do extrato de raízes, tronco e folhas (UCHÔA et al., 2010). Estudos recentes realizados com o extrato etanólico das folhas demonstraram potencial neuroprotetor contra disfunções bioquímicas e comportamentais geradas por estresse crônico (ORTMANN et al., 2016). Além disso, pode ser uma alternativa para prevenção de distúrbios bipolares recidivos e aos danos oxidativos aos quais são associados (GAZAL et al., 2015).

Por meio de uma prospecção fitoquímica das folhas da espécie *C. pachystachya* foram identificados flavonoides, taninos, flavonas e catequinas (COSTA et al., 2011; SOUZA et al., 2014). Nas folhas, foram identificados catequina, epicatequina, isoquercetina, isovitexina, isoorientina, orientina, apigenina (CRUZ et al., 2013), procianidina, sitosterol, trans-fitol, α -amirinae ácido pomólico (SCHINELLA et al., 2008). Costa e colaboradores (2011) identificaram ácido clorogênico e quantificaram os C-glicosilflavonoides, que são os compostos fenólicos majoritários nas folhas, sendo a isoorientina, o composto predominante, um marcador químico da *C.pachystachya*. Das raízes, alguns terpenos já foram identificados, sendo eles β -sitosterol, ácido tormêntico (UCHÔA et al., 2010), ácido ursólico, ácido oleanoico, 19- α -hidroxi- α -amirina, 2 α -acetil ácido euscáfico, 2 α -acetoxi-3 β ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxi-ursan-28,13 β -olideo, 3 β -acetoxi-2 α ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxi-ursan-28,13 β -olideo, ácido 2 α -acetil tormêntico, ácido. 2 α ,3 α ,23-trihidroxi-olean-12-en-28-oico. A composição fitoquímica do caule é semelhante à da raiz, com exceção dos compostos 2 α -acetoxi-3 β ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxy-ursan-28,13 β -olideo e 3 β -acetoxi-2 α ,19 α -dihidroxi-11 α ,12 α -epoxy-ursan-28,13 β -olideo (QUINTELA, 2013).

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial antienvelhecimento cutâneo *in vitro* da espécie *C. pachystachya*.

2.1 Objetivos específicos

- Obter extratos hidroetanólicos e etanólicos das folhas da espécie;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos por meio de diferentes métodos
 - Formação do complexo de fosfomolibdênio,
 - Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
 - Descoramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico
 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Determinar a atividade antiglicante dos extratos;
- Determinar a atividade inibitória dos extratos frente às enzimas metaloprotease 2 e elastase;
- Avaliar o efeito proliferativo dos extratos em cultura de fibroblastos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das folhas de *Cecropia pachystachya*

A coleta do material vegetal ocorreu em agosto de 2016. Sua exsicata está depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora sob a numeração CESJ 46591. A espécie foi identificada por Dr. Ricardo Montiane de Castro da Universidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

3.2 Preparo do extrato vegetal

As folhas coletadas foram secas a 40 °C, em seguida foram mecanicamente trituradas em moinho de facas e acondicionadas ao abrigo da luz. O material vegetal foi submetido a dois processos extrativos diferentes, porém ambos utilizaram a proporção de 1 g de folha pulverizada para 10,5 ml de solvente. O material vegetal foi submetido à maceração estática com etanol (98%) por 4 dias. O extrato foi separado do material vegetal por meio de filtração e em seguida evaporado em evaporador rotatório a 40 °C. O extrato foi então denominado extrato etanólico (EE). O outro processo extrativo empregou uma solução etanol e água (75:25). A mistura foi aquecida por 30 minutos a 60°C. Em seguida, o extrato foi separado do material vegetal por meio de filtração e evaporado em evaporador rotatório fornecendo o extrato hidroetanólico (EH). O extrato EH foi liofilizado e submetido a ensaios químicos e biológicos subsequentes, assim como o extrato EE.

3.3 Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi realizada por meio do método espectrofotométrico Folin Ciocalteu, segundo metodologia desenvolvida por Singleton e Rossi (1965) com modificações. Ácido tânico foi empregado como substância de referência. O método Folin Ciocalteu utiliza como reagente uma mistura de ácidos fosfotúngsticos e fosfomolibdicos, que quando em meio alcalino e na presença de compostos fenólicos são reduzidos, formando o complexo azul molibdênio-tungstênio que pode ser determinado espectroscopicamente a 760 nm (AINSWORTH e GILLESPIE, 2007).

As amostras EE e EH foram pesadas e diluídas em metanol, a fim de se obter uma solução estoque de 0,5 mg/mL de cada amostra. Em microplaca de 96 poços foram adicionados

120µL de solução Folin Ciocalteu (20% v/v em água destilada), 100 µL de solução carbonato de sódio (4% m/v em água destilada) e 30 µL da solução estoque das amostras. Após 30 minutos de reação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em 770 nm em espectrofotômetro. Foi feito um branco utilizando-se as mesmas substâncias preparadas com exceção da amostra, a qual foi substituída por metanol. Os resultados foram expressos em micrograma de fenóis por miligrama amostras equivalente a ácido tânico, baseada na curva de calibração de ácido tânico construída com concentrações variando entre 0,0075 mg/mL a 0,2 mg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para análise dos resultados foi usado Excel (regressão linear).

3.4 Determinação de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método de Dowd (1959), com modificações. O fundamento do método é a complexação dos flavonoides com o íon alumínio III, sozinho ou em meio contendo acetato de sódio, ácido ou nitrito de sódio em meio alcalino. O complexo formado entre o alumínio e os flavonóis ou flavonas promovem a formação de um produto estável cuja cor é amarela (JULKUNEN-TIITTO et al., 2015)

Foi preparada uma solução estoque contendo o EE e outra contendo o EH em etanol. Em um tubo de ensaio foram adicionados 250 µl da solução estoque contendo a amostra, 250 µl de cloreto de alumínio (2 % m/v em etanol) e 500 µl de etanol com 5% ácido acético Os tubos permaneceram ao abrigo da luz durante 30 min. Uma alíquota de 250 µl foi transferida para microplaca de 96 poços para medição da absorbância em espectrofotômetro a 415nm. Foi feito um branco utilizando-se as mesmas substâncias preparadas com exceção da amostra, a qual foi substituída por etanol. Os resultados foram expressos em micrograma de flavonoides por miligrama amostras equivalente a quercetina, baseado na curva de calibração de quercetina construída com concentrações variando entre 1µg /mL a 320 µg /mL.. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Foi usado Excel (regressão linear) para análise dos resultados.

3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O EE e o EH foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O aparelho utilizado foi o Agilent Technologies® Série 1200, constituído de injetor automático, bomba quartenária, detector DAD-UV. A coluna utilizada foi do tipo fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm). O volume de injeção foi de 40µL, e o comprimento de onda utilizado na detecção foi de 330nm. As amostras foram preparadas a 2 mg/mL e solubilizadas em metanol grau HPLC. As condições utilizadas para a eluição estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para caracterização do extrato etanólico (EE) e do hidroalcoólico (EH) de *Cecropia pachystachya*.

Tempo de eluição (minutos)	Solvente		Fluxo
	Metanol	Água	
0	5%	95%	0,8 mL/min
5	33%	67%	
30	37%	63%	

3.6 Atividade antioxidante

3.6.1 Método de formação do complexo de fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total (CAT) do EE e do EH foi determinada através do método de piero et al., (1999), que baseia-se na redução do molibdênio ($\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$) por um agente redutor, e a complexação do mesmo com o fosfato em meio ácido, com formação do fosfomolibdênio que possui coloração verde.

A solução reagente utilizada foi composta por 28% v/v fosfato de sódio (0,1 mol/L), 12 % v/v molibdato de amônio (0,03 mol/L) e 20 % v/v ácido sulfúrico (3 mol/L). A solução estoque do EE e EH foi preparada em água: metanol (1:1) na concentração de 2 mg/mL. Em tubos de ensaio, foi adicionado 300µL da amostra e 2 mL de solução reagente. Em seguida, os tubos foram incubados a 95°C por 90 min. O branco da amostra foi feito substituindo-se a solução reagente por água destilada, e o branco da técnica foi feito substituindo-se a amostra por água:metanol (1:1). O ácido ascórbico foi utilizado para a construção da curva de

calibração, com concentrações variando entre 50 mg /mL a 300 mg /mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados foram analisados por regressão linear utilizando-se Excel e expressos em miligramas de amostra equivalentes a 1 mg de ácido ascórbico.

3.6.2 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante dos extratos EH e EE frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizada de acordo com Blois (1958) com modificações. Na forma de radical, o DPPH possui uma coloração violácea quando recebe um elétron ou um hidrogênio, ou seja, na forma reduzida, passa a ter uma coloração amarela (MOLYNEUX, 2004). Assim, há uma redução da absorvância na faixa 515-517 nm o que indica uma relação entre o aumento da concentração da forma não radical do DPPH e a redução da absorvância (LEE et al., 2007).

A amostra foi adicionada em microplaca de 96 poços nas concentrações de 250 a 0,49 µg/mL (diluições sucessivas). Para isso, foram transferidos para um poço da placa 100 µL de uma solução 1 mg/mL em metanol e foram realizadas 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de solução de DPPH (20 µg/mL) em metanol. Foi feito um branco que continha todos os reagentes exceto a amostra, a qual foi substituída por metanol. Quercetina e ácido ascórbico foram utilizados como substância de referência. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e, sequencialmente, a absorvância foi determinada a 517 nm. Todo o experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos na forma de IC₅₀, com auxílio do programa GraFit 7.

3.6.3 Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante pelo método do descoramento do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo Marco (1968) com modificações. O método fundamenta-se na formação do radical peroxil (LOO•) a partir da peroxidação do ácido linoleico (ácido graxo insaturado) quando em contato com oxigênio. Esse radical ao reagir com o β-caroteno promove seu descoramento, visto que as estruturas radicalares formadas atacam as duplas ligações presentes no β-caroteno. Dessa maneira, a emulsão descora, passando de amarelo intenso para amarelo claro (HUANG e WANG, 2004; JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007).

Para o preparo da emulsão foram utilizados 30 μL de ácido linoleico, 265 μL de Tween 40, 100 μL de solução de β -caroteno em diclorometano (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 500 μL de diclorometano. A mistura foi submetida a nitrogênio gasoso por 50 minutos a fim da completa evaporação do diclorometano. Adicionou-se 40 mL de água destilada previamente oxigenada (30 minutos), com o propósito de se obter uma solução emulsionada com densidade óptica na faixa de 0,6-0,7 nm. EE e EH foram solubilizados em metanol e avaliados em 7 diferentes concentrações, partindo-se de 222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 4,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 20 μL do EE e do EH foram transferidos para microplaca de 96 poços e a cada amostra foram adicionados 250 μL da emulsão. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. A absorvância das amostras e do controle (sem adição de antioxidante) foi medida a 470 nm ao longo de 2 horas a 45°C. Foram realizadas 9 leituras, com 15 minutos de intervalo entre cada uma delas. A atividade antioxidante foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{(A_{CI} - A_{CF}) (A_{AI} - A_{AF})}{(A_{CI} - A_{CF})} \right] \times 100$$

Onde A_{CI} e A_{AI} representam a absorvância inicial do controle e da amostra respectivamente. Já A_{CF} e A_{AF} são as absorvâncias finais do controle e da amostra respectivamente.

3.6.4 Método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O processo de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados suscita sua quebra, determinando a formação de aldeídos e componentes carbonílicos, sobretudo dialdeídos de três carbonos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), os quais são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico. Cada molécula de TBA é capaz de se complexar com duas moléculas de MDA, formando um complexo que pode ser quantificado espectrofotometricamente, cuja máxima absorção se dá entre 532-535 nm (BUEGE e AUST, 1978).

Para determinação do TBARS foi utilizada a técnica proposta Sørensen e Jørgensen (1996) com modificações. EE e do EH foram solubilizados em metanol e avaliados nas concentrações de 7,5; 15 e 30 mg/mL. O meio reacional continha 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e 200 μL de cada extrato. BHT (Hidroxitolueno butilado) foi utilizado como substância de referência, e água destilada como controle. Com o auxílio de um mixer, as

amostras foram homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento até o surgimento da coloração marrom, para então completar o volume com água destilada para 100 mL. Novamente as amostras foram homogeneizadas com mixer e transferidas para frascos âmbar para armazenamento em refrigerador.

No dia do preparo e nos 3 dias consecutivos, 0,5 g do homogenato foram pesados em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 50 mL de solução alcóolica de BHT (4% m/v), 2,5 mL de ácido fosfórico (1% v/v) e 1,25 de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v em NaOH 0,05 M). Essa mistura foi mantida em banho fervente por 15 minutos e imediatamente transferida para banho de gelo, onde permaneceu por mais 10 minutos. Em seguida, a cada tubo de ensaio foram adicionados 3 mL de butanol e os tubos agitados por inversão. Os mesmos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. Para a leitura espectrofotométrica a 535 nm, 200µL do sobrenadante foram transferidas para a microplaca de 96 poços. Para a determinação da concentração do complexo MDA-TBA, utilizou-se o tetrametoxipropano para a construção de uma curva padrão de MDA. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Abs}^{\text{CN}} - \text{Abs}^{\text{AMO}}}{\text{Abs}^{\text{CN}}} \times 100$$

Onde, Abs^{CN} e Abs^{AMO} são as absorvâncias referentes ao controle negativo e a amostra respectivamente.

3.7 Atividade antiglicante

A avaliação da atividade antiglicante dos extratos EE e EH foi realizada baseada na metodologia descrita por Farsi et al., (2008) com modificações. Esse teste fundamenta-se no desenvolvimento de fluorescência quando a albumina bovina sérica (BSA) liga-se a um açúcar redutor (RAHBAR et al., 2000).

A uma microplaca de 96 poços estéril foram adicionados 60 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,4), 50 µL de solução de BSA (10 mg/mL), 25 µL de solução de frutose (1,6M), 50 µL da amostra (EE ou EH) e 15 µL de ázida sódica (8g/L). Todas as soluções foram esterilizadas utilizando-se membranas filtrantes de celulose. O EE e o EH foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1 M e testadas em diferentes concentrações (12,5; 25;

37,5; 250 e 375 $\mu\text{g/mL}$). Foi feito um branco que continha todos os reagentes, exceto a amostra que foi substituída por tampão fosfato de sódio. A quercetina e a aminoguanidina foram utilizadas como substância de referência. Após incubação ao abrigo da luz a 37 °C durante 7 dias, a quantidade de AGEs fluorescentes formados foi determinada utilizando um fluorímetro, em comprimento de onda de excitação de 330 nm e em comprimento de onda de emissão de 410 nm. A porcentagem de inibição da formação de AGE para cada extrato foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \left[\frac{\text{fluorescência da solução sem inibidores} - \text{fluorescência da solução com inibidores}}{\text{fluorescência da solução sem inibidores}} \right] \times 100\%.$$

3.8 Cultura celular

A linhagem celular de BALBc/3T3 foi adquirida do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ-UFRJ). As células foram cultivadas em meio Dulbecco Modificado por Eagle, DMEM, suplementado com soro fetal bovino 10%, 3,7g/L de bicarbonato de sódio, 2,5 g/L HEPES, estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e penicilina (100 UI/mL). As células foram mantidas em ambiente a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂ e umidade 95%.

3.8.1 Ensaio de viabilidade celular

A ação dos extratos EH e EE sobre a linhagem de fibroblastos em BALBc/3T3 foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) sugerido por Mosmann (1983). O teste baseia-se na conversão do MTT, um sal amarelado solúvel em água, pela enzima mitocondrial succinil-desidrogenase presente nas células viáveis, a um composto insolúvel de cor roxa (cristal de formazan).

Assim, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços, na concentração de 1×10^4 células/poço. A cultura foi então incubada a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂, por 24 h, para a aderência dos fibroblastos. Em seguida, as células foram tratadas com extratos EH e EE em diferentes concentrações (16,75, 32,5, 75, 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$), por 24 h. Decorrido 20 h de incubação, foram adicionados 20 μL de uma solução de MTT à 5 mg/mL em cada poço, e a incubação prosseguiu por mais 4 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido, e os cristais de formazan precipitados foram resuspensos pela adição de 200 μL de DMSO em

cada poço. A quantidade de MTT-formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis, esta foi mensurada pela absorvância à 540nm, em leitor de microplacas.

3.9 Atividade inibitória enzimática

3.9.1 Elastase

A determinação da atividade inibitória do EH sobre a enzima elastase baseou-se no método de BIETH, SPIESS e WERMUTH (1974) com modificações.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 200 µL de tampão Tris HCl 100Mm (pH 8) 13 µL da solução de substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p nitroanilida (4,4 mM) e 20 µL do EH solubilizados em tampão, o qual foi testado em diferentes concentrações (0,8; 4; 8 e 16µg/mL). Após homogeneização, 7µL da enzima elastase (0,03 un/mL) foi acrescentada aos poços. O branco da amostra continha todos os reagentes, exceto a enzima elastase que foi substituída pelo mesmo volume de tampão Tris HCl 100Mm (pH 8). O poço referente ao controle continha todos os reagentes com exceção da amostra. Foram realizadas 15 leituras consecutivas, com intervalo de um minuto entre elas a 410 nm em espectrofotômetro. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para o cálculo do percentual de inibição, foram construídas curvas referentes a tempo x concentração de substrato. Com o coeficiente angular das mesmas determinou-se o percentual de inibição de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% I = 100 - \left(\frac{100 \times CAa}{CAc} \right)$$

Onde CAa e CAc refere-se ao coeficiente angular da reta obtida pelas determinações da amostra e do controle respectivamente.

3.9.2 Metaloprotease-2 (MMP-2)

A técnica de zimografia por eletroforese foi empregada para a determinação da capacidade inibitória do EH frente à metaloprotease-2. As metaloproteases foram obtidas a partir do meio de cultura das células de macrófagos RAW 264.7.

Posteriormente, foram preparados géis de 0,75 mm com solução de acrilamida-bisacrilamida, e como substrato foi adicionada gelatina 2,5%. Volumes equivalentes de meio e extrato incubados foram aplicadas ao gel para migração eletroforética (30mA à 4°C) em tampão de Tris-glicina (25mM/192mM). Após a migração, os géis foram lavados com 100 mL de Triton X-100 2% e incubados com 100 mL de tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 5mM CaCl₂ e 1μM ZnCl₂) por 24 horas à 37°C. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Blue R250 (0,5% de corante, 30% de metanol e 10% ácido acético) e descorados com solução descorante (30% de metanol e 10% ácido acético). A atividade da MMP-2 foi evidenciada pela presença de regiões claras nos géis. Para medir a intensidade dessas bandas foi utilizado o programa TotalLab Quant[®] (England, UK).

4. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo teste de ANOVA seguida do teste de Bonferroni, exceto para a atividade enzimática a qual foi utilizado o pós teste de Tuckey para análise de significância. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Rendimento dos extratos obtidos

A massa e os respectivos rendimentos dos processos extrativos empregados estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Massa e rendimento dos extratos etanólico (EE) e hidroetanólico (EH) de *Cecropia pachystachya*

Extrato	Massa obtida	Rendimento
EE	10,81 g	10,37%
EH	7,04 g	14,08%

4.2 Determinação do teor de fenóis e flavonóides

Os valores referentes ao teor de fenóis e flavonoides do EE e do EH estão apresentados na tabela 5. A equação da reta obtida para a dosagem do teor de fenóis através de regressão linear dos dados da curva foi $y=0,0271x + 0,0644$ com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9900$, sendo os resultados expressos em μg de fenóis por mg de amostra equivalente a ácido tânico (EAT) Já a equação da reta obtida para a dosagem do teor de flavonoides através de regressão linear dos dados da curva foi $y=0,0409x + 0,0082$ com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9977$, sendo os resultados expressos em μg de flavonoides/mg de amostra equivalente a quercetina (EQ).

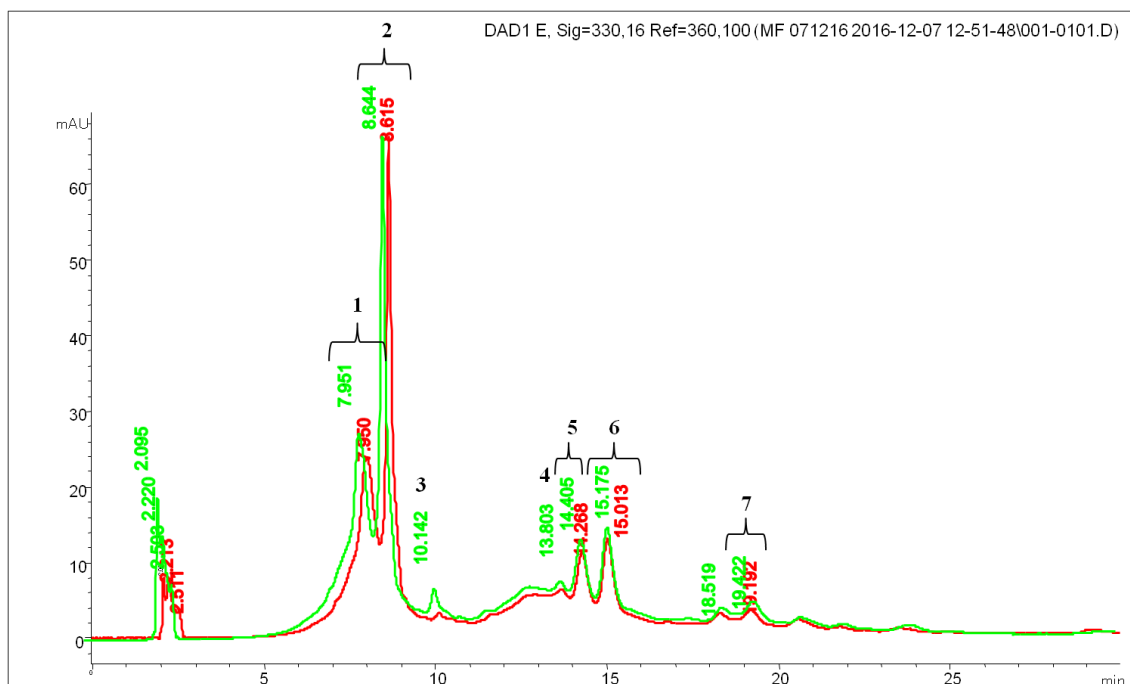
Tabela 5: Teor de fenóis e flavonoides das amostras em EE e EH \pm erro padrão da média (n=3).

Amostra	Teor de Fenóis (μg de fenóis/mg de amostra EAT)	Teor de Flavonoides (μg de flavonoides/mg de amostra EQ)
EE	962,90 \pm 19,14	18,73 \pm 0,12
EH	656,16 \pm 22,03	72,71 \pm 0,92

4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

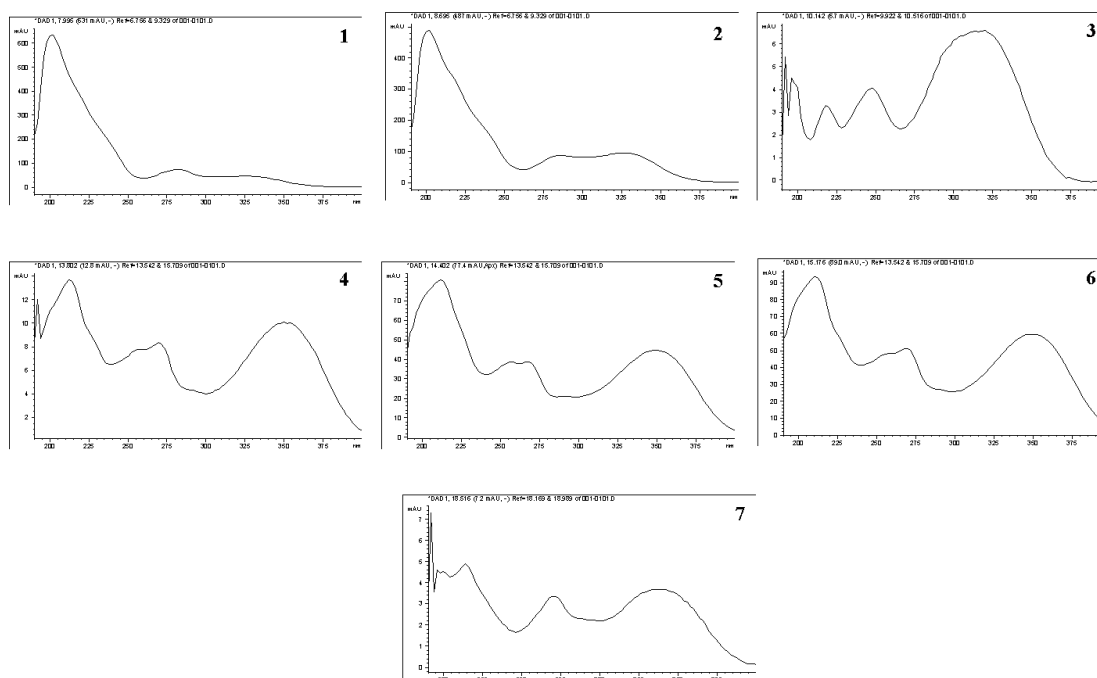
O perfil cromatográfico e os espectros de absorção UV dos sinais obtidos através de CLAE após a eluição de EE e EH estão apresentados nas figuras 4 e 5 respectivamente.

Figura 5: Cromatograma em vermelho - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. **Cromatograma em verde** - Cromatograma do extrato hidroetanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* obtido por cromatografia líquida de alta eficiência



A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); Gradiente de solventes A (Metanol) e B (H₂O); 5 a 37% de A em 30 min; fluxo de 0,8 mL/min; concentração de amostra de 1 mg/mL; volume de injeção de 40 μ L; temperatura de 25°C; detecção UV a 330nm.

Figura 6: Espectro UV dos sinais obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico e do extrato hidroetanólico provenientes das folhas de *Cecropia pachystachya*.



4.4 Atividade antioxidante in vitro

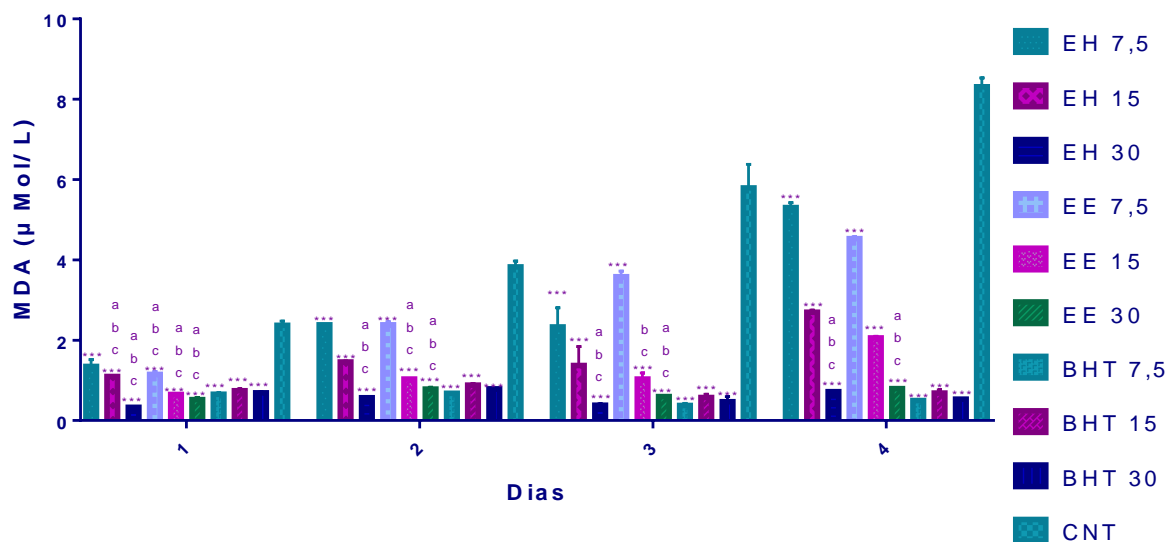
A atividade antioxidante do EE e do EH foi avaliada por quatro métodos diferentes: de formação do complexo de fosfomolibdênio, de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, do descoloramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os valores referentes à atividade antioxidante estão na tabela 6.

Tabela 6: Atividade antioxidante do EE e EH avaliada pelos métodos da formação do complexo fosfomolibdênio, DPPH e sistema β caroteno/ácido linoleico

Método	CAT (EAA)	DPPH (CI50) $\mu\text{g/mL}$	Sist β caroteno/ác. Linoleico (% inibição)							
			222 $\mu\text{g/mL}$	148 $\mu\text{g/mL}$	74 $\mu\text{g/mL}$	37 $\mu\text{g/mL}$	18,5 $\mu\text{g/mL}$	9,25 $\mu\text{g/mL}$	4,625 $\mu\text{g/mL}$	
<i>Amostra</i>										
EE	0,49 \pm 0,07	^a 1,07 \pm 0,05	^a 78,87 \pm 2,22	^b 70,31 \pm 3,69	^b 68,60 \pm 3,88	^b 50,82 \pm 0,65	^a 38,99 \pm 3,07	^a 22,32 \pm 4,45	^a 16,89 \pm 1,22	
EH	0,53 \pm 0,08	^a 1,07 \pm 0,06	^a 82,37 \pm 4,25	^{ab} 85,86 \pm 2,42	^{ab} 77,31 \pm 1,86	^{ac} 65,18 \pm 5,82	^b 51,49 \pm 2,53	^b 41,82 \pm 2,40	^b 26,64 \pm 1,75	
AA	NR	^b 0,28 \pm 0,05	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Q	NR	NR	^a 83,63 \pm 6,86	^a 87,20 \pm 1,07	^a 86,09 \pm 1,24	^a 71,28 \pm 3,42	^c 71,21 \pm 4,03	^c 73,29 \pm 3,10	^c 52,42 \pm 6,56	

Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=3). Médias com letras iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais (p<0,05). CAT: capacidade antioxidante total; EAA: equivalente a ácido ascórbico; EE: extrato etanólico, EH: extrato hidroetanólico, AA: ácido ascórbico, Q: quercetina; NR: não realizado.

Figura 7: Efeito antioxidante do extrato etanólico e extrato hidroetanólico das folhas de *Cecropia pachystachya*, avaliado através da dosagem de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em MDA.

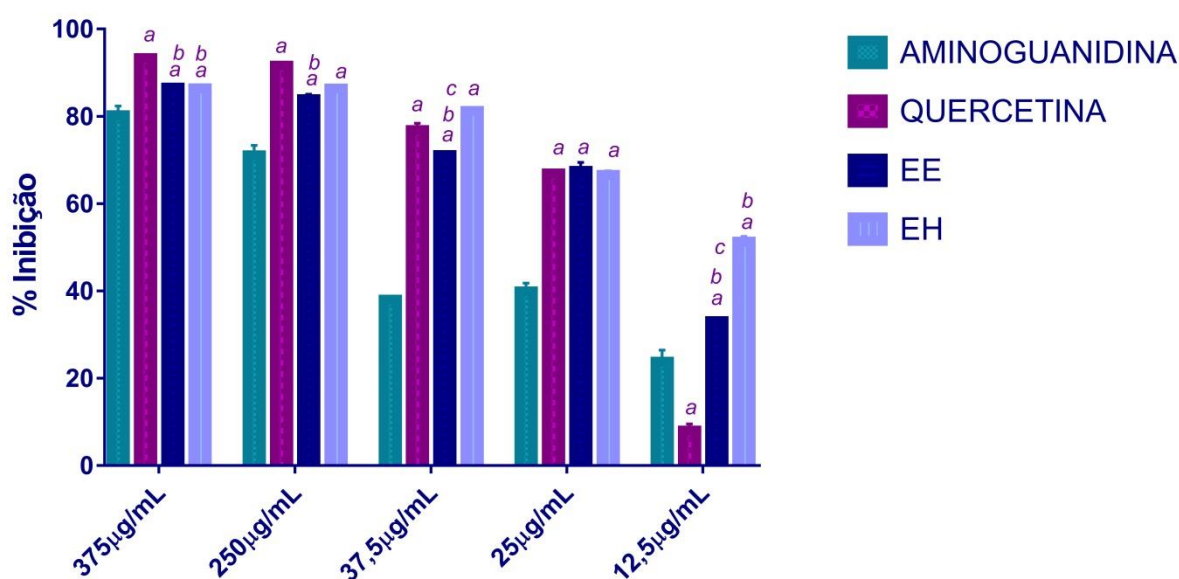


O BHT (Hidroxitolueno butilado) foi utilizado como controle positivo, e a água destilada como controle negativo. Os valores expressos indicam média \pm erro padrão da média ($n=3$). *** significativamente diferente do grupo controle negativo ($p < 0,001$); a significativamente igual ao grupo BHT7,5 ($p < 0,1$); b significativamente igual ao grupo BHT15 ($p < 0,1$); c significativamente igual ao grupo BHT7,5 ($p < 0,1$) por ANOVA two-way seguido de Bonferroni.

4.5 Atividade antiglicante

Os valores referentes à atividade antiglicante da aminoguanidina, quercetina, EE e EH em diferentes concentrações estão representados na figura 7.

Figura 8: Percentual de inibição da glicação dos extratos etanólico (EE) e hidroetanólico (EH) das folhas de *Cecropia pachystachya* pelo método BSA/frutose.



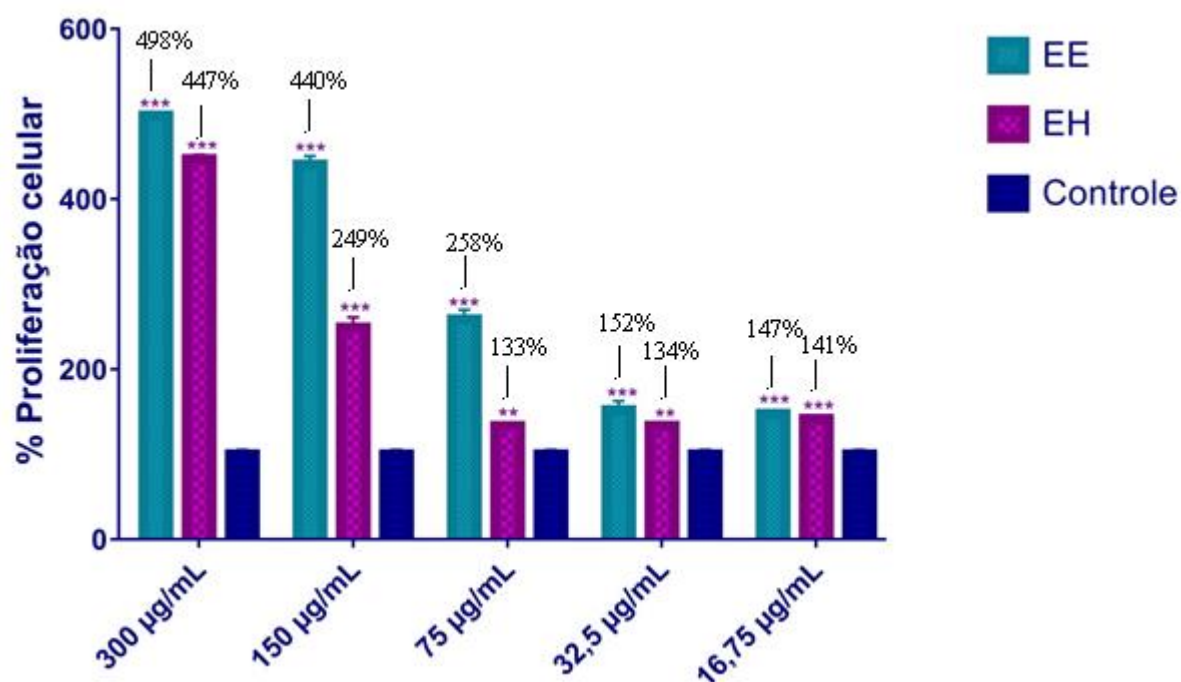
A aminoguanidina e quercetina foram utilizados como controles positivos. Os valores expressos indicam média \pm erro padrão da média (n=3). ^a diferente estatisticamente da aminoguanidina ($p < 0,01$); ^b diferente estatisticamente da quercetina ($p < 0,01$); ^c diferente estatisticamente do extrato hidroetanólico ($p < 0,001$).

4.6 Atividade de EE e EH sobre fibroblastos

4.6.1 Proliferação Celular

Os resultados obtidos a partir do tratamento das linhagens de BALBc/3T3 com o EE e EH estão apresentados na figura 8.

Figura 9: Percentual de proliferação da linhagem BALBc/3T3 quando submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico (EE) e extrato hidroetanólico (EH) (16,75-300 µg/mL) por 24 horas.

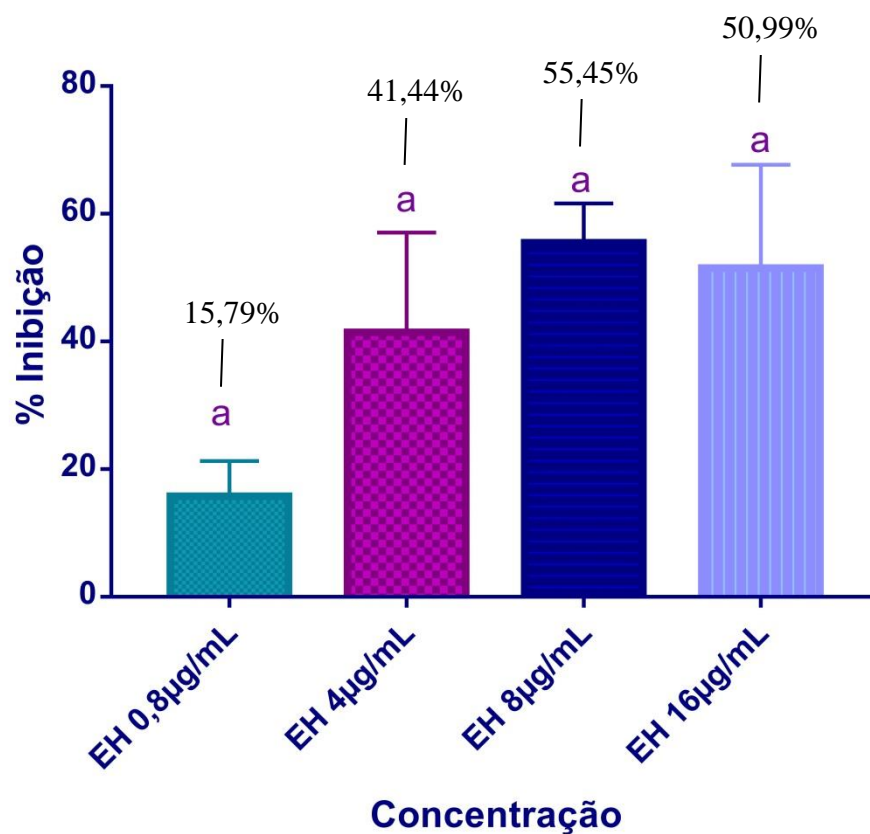


Os valores expressos indicam média \pm erro padrão da média (n=3). *** significativamente diferente do grupo controle (DMSO) ($p < 0,001$); ** significativamente diferente do grupo controle (DMSO) ($p < 0,01$) por ANOVA one-way seguido de Bonferroni.

4.7 Inibição enzimática

A atividade inibitória enzimática de EH foi avaliada frente a duas enzimas distintas: elastase e MMP-2. Em relação à metaloprotease-2, os resultados estão expressos na figura 9.

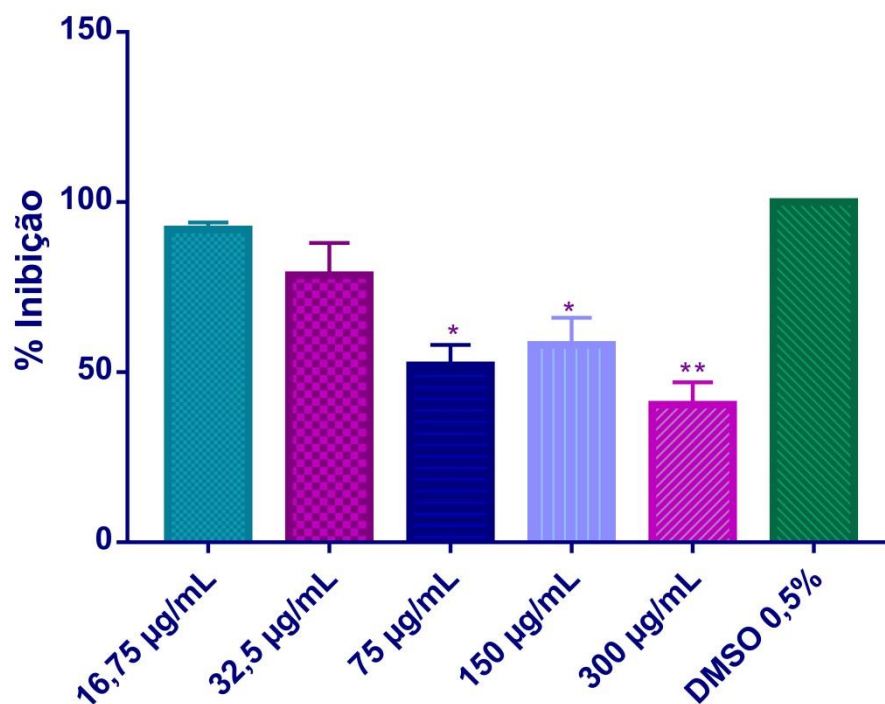
Figura 10: Percentual de inibição da atividade da enzima elastase pelo extrato hidroetanólico (EH) das folhas de *Cecropia pachystachya*.



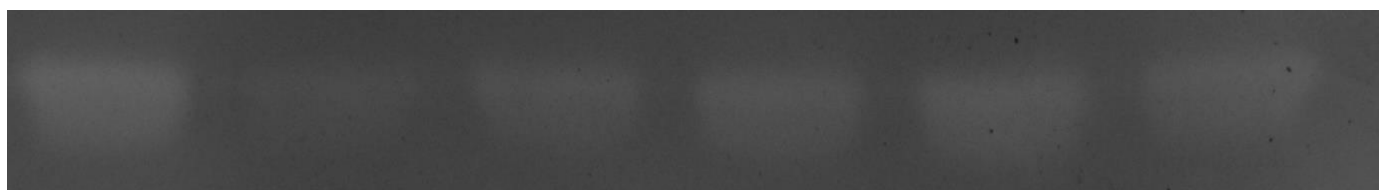
Os valores expressos indicam média \pm erro padrão da média (n=3). Letras iguais representam resultados significativamente iguais ($p < 0,05$) por ANOVA seguido de Tukey.

Figura 11: (A) Percentual de inibição da atividade enzimática da MMP-2 pelo extrato hidroetanólico das folhas de *Cecropia pavchystachya*. (B) Zimograma em gel poliacrilamida a 7,5% com adição de gelatina 2,5%.

(A)



(B)



DMSO 0,5% 300 µg/mL 150 µg/mL 75 µg/mL 32,5 µg/mL 16,75 µg/mL

Os valores expressos indicam média ± erro padrão da média (n=3). ** significativamente diferente do grupo DMSO 0,05% (controle negativo) ($p < 0,05$); * significativamente diferente do grupo DMSO 0,05% (controle negativo) ($p < 0,05$); * significativamente diferente do grupo DMSO 0,05% (controle negativo) ($p < 0,1$) por ANOVA seguido de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O processo extrativo escolhido foi a maceração, pois apresenta boa eficácia para extração de fitoconstituintes, o que pode ser justificado pelo amolecimento e ruptura dos compartimentos celulares vegetais, permitindo a liberação de fitoquímicos solúveis e preservando a atividade dos compostos (DAUD et al., 2017). Utilizou-se como solventes extratores o etanol (98%) e uma mistura contendo etanol: água 75:25 v/v. Foram empregados dois sistemas distintos de extração, objetivando maximizar a extração de substâncias fenólicas, especificamente flavonoides. O uso da água está relacionado ao aumento da polaridade da solução extrativa, reduzindo interferentes lipofílicos e maximizando a extração de compostos fenólicos (OENING, CITADIN e BARROS, 2004). Por meio do rendimento obtido para o EE (10,37%) e para o EH (14,08%), pode-se inferir que a solução hidroetanólica foi mais efetiva em extrair os fitoconstituintes.

A eficiência de uma extração está relacionada com a polaridade dos constituintes e da solução extratora (MEDIANI et al., 2015). Os teores de fenóis obtidos para o EE (962,90±19,14 µg de fenóis/mg de amostra EAT) e para o EH (656,16±22,03 µg de fenóis/mg de amostra EAT) evidenciam a eficiência do processo extrativo. Os teores de fenóis observados por Oliveira e Minguzzi (2015) em *C. pachystachya*, avaliados pelo mesmo método, para os extratos em acetato de etila, butanólico e clorofórmico foram 291, 300 e 270µg equivalentes de ácido gálico /mg de extrato, respectivamente, são demasiadamente inferiores aos valores determinados para o EE e EH. Os diferentes solventes empregados no processo extrativo possuem polaridades diferentes sendo capazes de extrair compostos como alcaloides, flavonoides (glicosilados ou não) e taninos, o que pode justificar os diferentes teores de fenóis encontrados. Além disso, o emprego de etanol, metanol e misturas hidroetanólicas é preconizado para máxima extração de constituintes, devido à característica desses solventes de aumentarem a permeabilidade das membranas celulares permitindo assim, a extração de constituintes de polaridade alta a intermediária (MANDAL, MANDAL e DAS, 2015). A técnica de Folin Ciocalteu, apesar de amplamente utilizada para dosagem de fenóis possui diversos interferentes como substâncias redutoras e proteínas.

É importante salientar que, além do alto rendimento apresentado, os líquidos extratores escolhidos- etanol e mistura hidroetanólica 25% - são menos nocivos para o meio ambiente do que os solventes orgânicos comumente utilizados. Os solventes orgânicos são muitas vezes tóxicos e a sua reutilização nem sempre é viável. Nos últimos anos, tem-se

registrado um esforço considerável no sentido de substituir os solventes orgânicos convencionais por outros ambientalmente mais aceitáveis, como é o caso da água e do etanol. (KERTON e MARRIOTT, 2013).

Apesar do teor de fenóis do EE ter sido superior ao EH, a mistura hidroetanólica foi capaz de concentrar os flavonoides ($72,71 \pm 0,92$ μg de flavonoides/mg de extrato) em relação ao EE ($18,73 \pm 0,12$ μg de flavonoides/mg de extrato). Os flavonoides são polifenóis sintetizados pela via dos fenil-propanoides e são responsáveis por diversas atividades farmacológicas. Possuem em sua estrutura o núcleo benzo- γ -pirona e estão universalmente distribuídos no reino vegetal (KUMAR e PANDEY, 2013). São divididos em oito classes de acordo com a oxidação do anel principal e dos substituintes do anel heterocíclico (BORGES BUBOLS et al., 2013). São reconhecidos pela atividade antioxidante, a qual está relacionada à configuração, substituição e o número de grupamentos hidroxilas ligados ao núcleo. Os flavonoides atuam quelando íons metálicos e capturando radicais livres, mecanismos passíveis de influência da estrutura desses compostos (KUMAR e PANDEY, 2013).

Devido ao alto conteúdo de fenóis e flavonoides e com o objetivo de conhecer melhor o perfil químico dos extratos, EE e EH foram submetidos à cromatografia de alta eficiência. Os perfis cromatográficos (Figuras 4) foram muito semelhantes. Os sinais que aparecem nos tempos de retenção por volta de 13, 14, 15 e 18 minutos possuem espectro de UV característicos de flavonoides (Figura 5), uma vez que possuem 2 picos de absorção, um na faixa de 240 a 280 nm e outro na faixa de 300 a 500nm (BOBIN, RAYMOND, e MARTINI, 1994). As substâncias eluídas por volta de 7,9 e 8,6 minutos possuem maior intensidade em ambas as amostras. A partir de seus espectros de UV pode-se inferir que não se tratam de substâncias fenólicas, sendo necessários testes complementares para sua identificação.

Frente ao alto teor de fenóis e flavonoides encontrados, e sua relação com atividade antioxidante, investigou-se a atividade antioxidante do EE e do EH. Uma substância antioxidante é aquela que em baixas concentrações é capaz de inibir ou retardar a oxidação de um substrato mediado por radicais livres, após a formação de intermediários estáveis (SINGH et al., 2016). Levando em consideração a diversidade de constituintes dos extratos vegetais e a complexidade do processo oxidativo, são necessários métodos com fundamentos distintos para traçar o perfil antioxidante de uma amostra (PRABHAKAR et al., 2006). Portanto, foram empregados quatro métodos antioxidantes diferentes (formação do complexo de fosfomolibdênio, sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, descoloramento pelo sistema

β -caroteno/ácido linoleico e método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) a fim de garantir que os resultados não retratem apenas uma reatividade química entre compostos devido às condições do meio reacional (DEHIMI et al., 2016). O extrato etanólico e o extrato hidroetanólico da *Cecropia pachystachya* ao serem avaliados por diferentes métodos antioxidantes exibiram comportamentos semelhantes entre si, sendo relevante o potencial antioxidante para ambos os extratos.

A técnica do fosfomolibdênio visa quantificar a capacidade antioxidante total, ou seja, a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos por meio da habilidade da amostra em doar elétrons a radicais, convertendo-os em espécies mais estáveis (DORMAN et al., 2003). Os valores foram expressos em equivalentes a ácido ascórbico, ou seja, o EE ($0,49 \pm 0,07$ mg EAA) possui 49% da atividade antioxidante do ácido ascórbico, assim como o EH ($0,53 \pm 0,08$ mg EAA) possui 53% da atividade antioxidante do ácido ascórbico.

O método do DPPH é amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de produtos naturais, uma vez que é uma técnica rápida, simples, sensível e reproduzível (SEOW et al., 2014). EH ($1,07 \pm 0,06$ μ g/mL) e o EE ($1,07 \pm 0,05$ μ g/mL) apresentaram reduzidos valores de CI_{50} , indicando a capacidade redutora das amostras. O potencial antioxidante frente ao radical DPPH está relacionado com a estrutura das substâncias presentes na amostra, pois o número de radicais que são reduzidos é diretamente proporcional à capacidade da molécula de doar átomos de hidrogênio (KANATT et al., 2015). Os valores de CI_{50} determinado por Duque e colaboradores (2016) e Pacheco e colaboradores (2014) para os extratos em acetato de etila ($3,1 \pm 0,25$ μ g/mL) e metanólico ($1,93 \pm 0,02$ μ g/mL) das folhas de *C.pachystachya* apresentaram menor atividade antioxidante quando comparada ao EE e ao EH. Segundo Zengin e colaboradores (2014) a escolha do solvente empregado no processo extrativo é um dos principais fatores capazes de influenciar a atividade antioxidante. Além dos solventes orgânicos, outros fatores como tamanho das partículas, tempo e temperatura de extração também são capazes de influenciar o processo (CAMPOS e FRASSON, 2012). O extrato etanólico proveniente da espécie *Cecropia obtusa* também apresentou baixo valor de CI_{50} ($1,83 \pm 0,01$ μ g/mL) no método do DPPH (ALVES et al., 2016).

No método do descoramento do β -caroteno/ácido linoleico é avaliada a capacidade da amostra de impedir o descoramento de um substrato lipídico (β -caroteno) por meio da doação de hidrogênio aos peróxidos de ácido linoleico formados a partir do aquecimento (HARSHA et al., 2013; SANG et al., 2014). Dessa maneira, a presença de compostos antioxidantes no extrato vegetal minimiza o descoramento do β -caroteno, pois o radical livre linoleato e outros

radicais são neutralizados (SANG et al., 2014). Os altos percentuais de inibição evidenciam o potencial antioxidante de EE e EH, sendo mais acentuado para EH, principalmente nas maiores concentrações (222 a 37 $\mu\text{g/mL}$), nas quais os resultados foram estatisticamente iguais à substância de referência (quercetina). Já o EE é estatisticamente igual à quercetina apenas na concentração de 222 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos avaliados exercem o poder antioxidante de maneira dose-dependente, uma vez que com a redução da concentração, os percentuais de inibição também reduziram significativamente. A atividade antioxidante encontrada para o EE e EH foi maior que a encontrada por Pacheco e colaboradores (2014) para o extrato metanólico (CI 50 $5.1 \pm 1.31 \mu\text{g/mL}$) e por Duque e colaboradores (2016) para o extrato em acetato de etila (CI50) $2,20 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$. Considerando que uma das limitações do método é o fato de indicar apenas a capacidade antioxidante de compostos lipofílicos, pode-se inferir que as variações encontradas para cada tipo de extrato possam estar relacionadas com o tipo de compostos extraídos (CONDELLI et al., 2015). Entretanto, de acordo com a polaridade do etanol e da solução hidroalcolica (75% etanol v/v) presumia-se que o EE fosse mais eficaz em evitar o descolorimento do β caroteno, visto que possui maior propensão de extrair compostos apolares. Ainda são relatados como limitações dessa técnica a análise cinética e a complexidade de reações envolvidas nas reações dos carotenos e oxigênio, pois em baixas concentrações de O_2 os carotenos possuem atividade antioxidante, contudo em soluções saturadas propagam a cadeia oxidativa (AMORATI e VALGIMIGLI, 2015).

A peroxidação lipídica pode ser iniciada por diversos radicais, sobretudo pelo radical aniônico superóxido ou pelo radical hidroxil, provocando danos irreversíveis às membranas (AKAZAWA-OGAWA et al., 2015). Por meio da dosagem de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico é possível quantificar a peroxidação lipídica. Em condições de altas temperaturas (100°C) e meio ácido, o ácido 2-tiobarbitúrico reage com o malonaldeído – composto proveniente da oxidação de lipídeos insaturados – formando um composto rosa, o qual pode ser dosado espectrofotometricamente (AMORATI e VALGIMIGLI, 2015). De maneira geral, os extratos avaliados apresentaram notável proteção frente à peroxidação lipídica (Figura 6) que foi inibida por EE e EH. No primeiro dia, a atividade apresentada pelo EE em todas as concentrações (7,5; 15 e 30 mg/mL) foi significativamente igual a substância de referência (BHT), assim como EH, com exceção da concentração mais baixa de 7,5 mg/mL . A inibição da peroxidação lipídica foi mantida até o quarto dia, último dia do experimento, para o EE e EH, sendo mais intensa na concentração de 30 mg/mL . A partir do comportamento dos extratos ao longo do experimento foi possível verificar que a inibição da peroxidação lipídica é dose dependente. É importante salientar que durante todo o

experimento os valores referentes às diferentes concentrações de BHT não foram estatisticamente diferentes entre si, ou seja, a concentração do ativo não interferiu na atividade antioxidante. O BHT é um antioxidante sintético capaz de inibir a peroxidação lipídica através da ligação do radical lipídico peroxil na posição *para* do grupamento fenoxi do BHT. Uma vez associado a um radical não pode se ligar a outros (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Algumas espécies do gênero *Cecropia* Loefl. já foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a peroxidação lipídica no modelo TBARS. O extrato etanólico proveniente da espécie *C. glaziovii* reduziu a peroxidação lipídica em cultura celular de queratinócitos HCAT expostos a radiação UVA em concentrações de 5 a 20 µg/mL (ALVES et al., 2016). Estudos realizados com ratos submetidos a modelo inflamatório de pleurisia, utilizando extrato aquoso da mesma espécie em concentrações de 10 a 300 mg/mL evidenciaram a capacidade de impedir a peroxidação lipídica nos pulmões dos mesmos (MÜLLER et al., 2016). Em relação a *C. pachystachya*, o extrato metanólico e o extrato em acetato de etila 7,5 mg/mL foram mais ativos que EE e EH, apresentando percentual de inibição de 81% ao final de 4 dias (DUQUE et al; 2016; PACHECO et al; 2014). Já o extrato aquoso avaliado *in vivo*, em modelo de comportamento maníaco induzido por quetamina no córtex pré-frontal de ratas pré-tratadas por 14 dias, foi capaz de inibir a peroxidação lipídica provocada pela quetamina (GAZAL et al., 2015).

A atividade antioxidante em extratos vegetais é associada ao conteúdo de polifenóis (MONTORO et al., 2006), uma vez que são capazes de reduzir substâncias através da doação de elétrons ou hidrogênios (PIETTA, 2000; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997) Dessa maneira, a notável atividade antioxidante do EE e do EH pode ser atribuída alto teor de fenólicos dos mesmos (Tabela 5).

Sabe-se que o estresse oxidativo na pele resulta em desordens cutâneas, envelhecimento precoce e até mesmo cânceres de pele (NICHOLS e KATIYAR, 2010). Dessa maneira, há um crescente interesse na busca de produtos naturais antioxidantes e, que inibam o envelhecimento cutâneo (TU e TAWATA, 2015). Dessa forma, devido à proeminente atividade antioxidante encontrada para EE e EH, parâmetros relacionados ao envelhecimento como atividade antiglicante, inibição das enzimas elastase e metaloprotease foram avaliados. Os resultados indicaram que, de fato, ambos os extratos possuem uma notável atividade antiglicante. Em todas as concentrações avaliadas (375 a 12,5 µg/mL) EE e EH apresentaram percentuais de inibição de glicação estatisticamente superiores ao da substância da referência aminoguanidina. Em relação à outra substância de referência, quercetina, o EH apresentou a mesma atividade antiglicante em todas as concentrações,

exceto na maior (375 µg/mL) em que a quercetina apresentou percentual de inibição superior. Já o EE apresentou percentuais estatisticamente igual ao da quercetina apenas na concentração de 25 µg/mL. O EE assim como o EH, na menor concentração (12,5 µg/mL), foram mais ativos em inibir a glicação do que a quercetina. Apesar de atuarem de maneira dose-dependente, ou seja, à medida que a concentração é reduzida a capacidade de inibir a glicação também o é, na menor concentração ambos os extratos ainda exibem percentuais de inibição superiores ao das substâncias de referência. Os produtos naturais são largamente investigados na busca de substâncias que impeçam a formação de produtos finais de glicação avançada, uma vez que os compostos fenólicos com atividade antioxidante são considerados os agentes mais promissores (PENG et al., 2008). Além disso, os compostos naturais são preferíveis aos seus análogos sintéticos, por apresentarem menor toxicidade (SHI et al., 2016).

Alguns extratos vegetais também tiveram capacidade de inibir a glicação atribuída ao potencial antioxidante, dentre elas o *Paspalum scrobiculatum*, *Eleusine coracana* (HEGDE, CHANDRAKASAN e CHANDRA, 2002) e *Psidium guajava* L (WU et al., 2009).

Outros produtos naturais com atividade antioxidante já foram relatados como inibidores da glicação, como a rutina e gracinol (ELOSTA et al; 2017).

Os flavonoides são citados na literatura como compostos com potencial antiglicante, sendo que sua estrutura química influencia na atividade (MATSUDA et al., 2003). Com a finalidade de corroborar essa informação, estudos realizados por Ramkissoo e colaboradores (2013) em extratos etanólicos oriundos de condimentos, indicam uma forte correlação entre o teor de flavonoides e a formação de produtos finais de glicação avançada.

O acúmulo de radicais livres e AGEs desempenha um papel relevante no envelhecimento da pele (SHIN et al., 2015). Por conseguinte, considerando o potencial antioxidante e a capacidade de inibir a formação de AGEs, o EE e o EH são amostras com proeminente emprego no tratamento do envelhecimento cutâneo. Uma vez que evidências indicam que um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento é a glicação proteica. Estudos realizados em pele sintética apontam consequências da glicação para o metabolismo dérmico como, alterações estruturais nas fibras elásticas que culminam com a perda da elasticidade das mesmas; e com a glicação do colágeno ocorre o aumento das moléculas da matriz metaloprotease (MMP1, MMP2 e MMP9) (SADOWSKA-BARTOSZ e BARTOSZ, 2016). Aliado ao poder antiglicante, a atividade antioxidante associado à constituição rica em fenóis e flavonoides também fortalece sua aplicação para tal fim, uma vez que ao inibir o estresse oxidativo fatores que aceleram a senescência celular são minimizados (SHIN et al., 2015).

A pele por estar diretamente exposta a radiação ultravioleta sofre demasiadamente com os danos ambientais. A radiação ultravioleta, por meio do estímulo à produção de espécies reativas de oxigênio é capaz de iniciar a ativação de enzimas que degradam proteínas da matriz extracelular (RITTIÉ e FISHER, 2002). A pele é majoritariamente composta por colágeno, que é responsável pela força de tensão da mesma. Já as fibras elásticas representam de 2-4% da MEC as quais a elasticidade é atribuída. A fim de evitar a degradação desses constituintes e conseqüente formação de rugas, muitas formulações cosméticas são desenvolvidas. Compostos oriundos de fontes naturais possuem grande potencial de inibir essas enzimas, atuando como agente anti-rugas (MAITY et al., 2011; THRING, HILI e NAUGHTON, 2009).

A fim de fortalecer o potencial de EE e EH na prevenção do envelhecimento cutâneo, o EH e EE foram avaliados quanto a sua capacidade proliferativa em fibroblastos. EH e EE apresentaram efetiva ação proliferativa em todas as concentrações testadas. Assim, pode-se inferir que os extratos não apresentam citotoxicidade nas concentrações avaliadas, e estimulam o crescimento de fibroblastos. Os resultados de Duque et al (2016) corroboram com o estímulo determinado pelo EE e EH. Em experimento realizado *in vivo* com extrato em acetato de etila da *C. pachystachya*, o uso tópico de géis contendo 2 ou 5% do extrato foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos e conseqüente aumento da síntese de colágeno.

Ambos os extratos, EH e EE apresentaram expressivo potencial para continuidade dos estudos, porém como a solução hidroalcoólica apresentou maior rendimento e por utilizar menor quantidade de solvente orgânico que o etanólico, o EH foi selecionado para a continuidade dos estudos. Assim, esse extrato foi avaliado quanto à capacidade de inibir as enzimas elastase e colagenase tipo IV (MMP2). Em relação à elastase, o EH foi capaz de inibi-la de maneira indiscriminada quanto à concentração do extrato. Ou seja, de 0,8 a 16µg/mL apresentou a mesma atividade inibitória, cerca de 50% de inibição. Em estudo realizado por Thring e colaboradores (2009) o extrato aquoso de 21 espécies foram avaliadas frente à elastase na concentração de 100 µg/mL, sendo que 9 plantas foram capazes de inibir essas enzimas. A espécie *Camellia sinensis* Kuntze foi a amostra mais ativa para a inibição enzimática. Pode-se inferir que o EH possui maior poder de inibição da elastase, uma vez que foi avaliado em concentrações menores que a *Camellia sinensis* Kuntze. Tal atividade foi atribuída ao alto teor de fenólicos da amostra. Além disso, em estudo realizado por Piwowarski e colaboradores (2011) com extratos aquosos a 10 µg/mL de 12 plantas ricas em taninos, a espécie *Aesculus hippocastanum* L. apresentou melhor atividade (62%), sendo

atribuído aos taninos a ação inibitória. Estudos recentes realizados com frações enriquecidas com polifenóis, incluindo ácido gálico, procianidina B1 e B2 e catequinas corroboram essa teoria (WITTENAUER et al., 2015). Entretanto, substâncias não fenólicas como, por exemplo, o ácido boswellico, um triterpenoide isolado da *Boswellia* ssp, também já teve sua atividade anti-elastase relatada (THRING, HILI e NAUGHTON, 2009). Apesar das diferentes espécies utilizadas nos estudos, é importante ressaltar que há limitações nas comparações estabelecidas, pois as diferentes condições de ensaio (substrato, tempo de incubação) e métodos de obtenção de extratos, podem influenciar na resposta enzimática (WITTENAUER et al., 2015).

EH também foi capaz de inibir a MMP2, sendo que, diferentemente da elastase há uma relação entre a concentração do EH e o percentual de inibição, isto é, uma relação de dose dependência. O maior percentual de inibição ocorre a 300 µg/mL, sendo que nas duas menores concentrações (16,75 e 32,5 µg/mL) não apresentou atividade. Dessa maneira, o EH se mostrou eficiente em inibir a elastase assim como a MMP2. A relação de dose dependência no modelo de inibição da MMP2 em zimografia também foi encontrada por Limtrakul e colaboradores (2016) em estudo realizado com extrato butanólico de flores da espécie *Cassia fistul*. Nesse mesmo estudo, foram testadas concentrações entre 50 e 200µg/mL as quais em todas elas houve inibição enzimática. Os fibroblastos quando submetidos a estresse oxidativo são estimulados a produzir MMP2, além de induzir a apoptose dos mesmos (GALICKA et al., 2014). Em posse desses resultados, pode-se inferir que o emprego do EH com finalidade anti-rugas é uma possibilidade viável, uma vez que é capaz de inibir enzimas relevantes no processo de envelhecimento.

6 CONCLUSÃO

Diante ao exposto, extratos de *Cecropia pachystachya* são passíveis de serem utilizados em formulações dermocosméticas com finalidade antissinais, uma vez que age em diferentes fatores que culminam no envelhecimento cutâneo. Possui notável efeito antioxidante, é capaz de inibir enzimas que participam da degradação da matriz extracelular, assim como possui relevante efeito antiglicante e efeito proliferativo sobre fibroblastos.

REFERÊNCIA

- ABORDO, E. A.; MINHAS, H. S.; THORNALLEY, P. J. Accumulation of α -oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 641-648, 1999.
- ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 987-1000, 2003.
- AKAZAWA-OGAWA, Y. et al. Singlet-oxygen-derived products from linoleate activate Nrf2 signaling in skin cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 164-175, 2015.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- ALMEIDA, R. R. et al. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p.109 –113, 2006.
- ALMEIDA, A. P. et al. The Cytotoxic Effect of Extracts Obtained from *Cecropia catharinensis* Cuatrec (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n.1, 27-34, 2016.
- ALONSO-CASTRO, A.J.; MIRANDA-TORRES, A.C.; GONZÁLEZ- CHAVÉZ, M.M.; SALAZAR-OLIVO, L.A. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2- NBD glucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.458 – 464, 2008.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H.. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ALVES, G.S.P.; POVH, J.A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita-Ituiuba-MG. **Biotemas**, v. 26, p.231–242, 2013.
- ALVES, G. de A.D. et al. *Cecropia obtusa*, an Amazonian ethanolic extract, exhibits photochemoprotective effect in vitro and balances the redox cellular state in response to UV radiation. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 893-902, 2016.
- AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L.. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. **Free radical research**, v. 49, n. 5, p. 633-649, 2015.
- ANDRADE-CETTO, A. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, n.1, p:163-171, 2009.
- ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.3,p.325-348, 2005.

ANDRADE-CETTO, A.; VÁZQUEZ, R.C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p.93 – 97, 2010.

ANTIGNAC, E. et al. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 324-341, 2011.

ARAGÃO, D. M.O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J. C.; GARCIA, R. M.G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.629–633, 2010.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BAILLIE, L. et al. Strategies for assessing the degree of photodamage to skin: a systematic review of the literature. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 4, p. 735-742, 2011.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 940-950, 2008.

BEHELLI, L. M.; CURBAN, G. V. **Compêndio de dermatologia**. Atheneu, 1975.

BEM, A. F. de; KUNDE, J. The importance of glycated hemoglobin determination in the management of chronic complications associated with diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185-191, 2006

BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 4, p. 841-849, 2003.

BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F.; *Cecropia*, **Flora Neotropica** , 2005.

BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F.; DAVIDSON, D. W. *Cecropia*. **Flora Neotropica**, p. 1-230, 2005.

BESSA, N.G.F. et al. Prospecção fitoquímica de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale-verde-Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15,692–707, 2013.

BIETH, J.; SPIESS, B.; WERMUTH, C. G. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. **Biochemical medicine**, v. 11, n. 4, p. 350-357, 1974.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 339, 2006.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M. C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics and toiletries**, v. 109, n. 11, p. 63-70, 1994.

BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BORGES BUBOLS, G. et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 3, p. 318-334, 2013.

BRANDÃO, M. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.141-148, 2008.

BREATHNACH, A. S. Aspects of epidermal ultrastructure. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 65, n. 1, p. 2-15, 1975.

BRENNEISEN, P.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 973, n. 1, p. 31-43, 2002.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural product reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

CÁCERES, A. et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.48, n.2, p.85-8, 1995.

CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n. 2-3, p.293-316, 2004.

CONDELLI, N. et al. Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. **Food chemistry**, v. 177, p. 233-239, 2015.

CALLAGHAN, T. M.; WILHELM, K.-P. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 5, p. 313-322, 2008.

CAMPOS, J. S.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Laflorensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2012.

Cecropia in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2017 Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15041>>. Acesso em: 28 janeiro 2017

CHAVEZ, J. O.; VELANDA, J. R.; PABON, M. G. Perfil neurofarmacológico de la fracción butanólica de las hojas de *Cecropia peltata* L **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 42, n.2, p.244-259, 2013.

CIARLETTA, P.; AMAR, M. B. Papillary networks in the dermal–epidermal junction of skin: a biomechanical model. **Mechanics Research Communications**, v. 42, p. 68-76, 2012.

CONSOLINI A. E.; MIGLIORIG. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 96, p. 417–422, 2004.

CONSOLINI, A. E.; RAGONE, M. I.; MIGLIORI, G. N.; CONFORTI, P.; VOLONT, M. G. Cardiostimulant and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 90–96, 2006.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p.1096-1102, 2011.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 913-920, 2011.

CONTRERAS, C. L.; NOVAKOFSKI, K. C. Dietary advanced glycation end products and aging. **Nutrients**, v. 2, p. 1247-1265, 2010.

CRAGG G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

CRISAN, M. et al. Expression of advanced glycation end-products on sun-exposed and non-exposed cutaneous sites during the ageing process in humans. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75003, 2013.

CRUZ, E.M; et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p.71–77, 2013.

DEHIMI, K. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Algerian *Thymelaea microphylla* coss. and dur. extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 47, p. 203, 2016.

DELARCINA Jr., S. et al. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea-pig treated with *Cecropia glaziovii* Sneth. extracts and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v.14, p. 328–332, 2007.

DE SOUZA, Cynthia Domingues; FELFILI, Jeanine Maria. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959.

DREWRY, D. H.; MACARRON, R. Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective. **Current opinion in chemical biology**, v. 14, n. 3, p. 289-298, 2010.

DAUD, M. N. H. et al. Evaluation of antioxidant potential of *Artocarpus heterophyllus* L. J33 variety fruit waste from different extraction methods and identification of phenolic constituents by LCMS. **Food Chemistry**, v. 232, p. 621-632, 2017.

DUQUE, A.P. do N et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 128-138, 2016.

ELOSTA, A. et al. Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract in vitro. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

FARSI, D.A. et al. Inhibition of non-enzymatic glycation by silk extracts from a Mexican land race and modern inbred lines of maize (*Zea mays*). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 108-112, 2008.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377-388, 2015.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FISHER, G. J. et al. Molecular Mechanisms of Photoaging in Human Skin In Vivo and Their Prevention by All-Trans Retinoic Acid. **Photochemistry and photobiology**, v. 69, n. 2, p. 154-157, 1999.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

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

FOLGUERAS, A. R. et al. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 411-424, 2004.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the radar: Advanced glycation end products that detour around the side. **The Clinical Biochemist.Reviews**, v. 26, p. 123-134, 2005.

FORSLIND, B. The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio) physical study program. **Thrombosis research**, v. 80, n. 1, p. 1-22, 1995.

FOSTER, D. et al. AGE metabolites: a biomarker linked to cancer disparity?. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 2186-2191, 2014.

FRANCO-ROSELLI, P., BERG, C. Distributional patterns of *Cecropia* (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. **Caldasia**, v. 19, p.285-296,1997.

GAGLIOTI A.L.; ROMANIUC-NETO S. **Urticaceae no Estado de São Paulo, Brasil. Diversidade e Conservação das urtigas de São Paulo**. 1 ed. Saarbrücken: OmniScriptum GmbH & Co. KG. 2014.208 p.

GALICKA, A.et al. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 394, n. 1-2, p. 217-224, 2014.

GARTNER, L.P; HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier , p. 253-266, 2007.

GAZAL M. et al. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research** , v.40, p. 1421–1430, 2015.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GIACOMONI, P. U. Aging and cellular defense mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 663, n. 1, p. 1-3, 1992.

GIACOMONI, P.U. et al. Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data. *IUBMB life*, v. 49, n. 4, p. 259-263, 2000.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging?. **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259-270, 2012.

GOLDSMITH, L. A. My organ is bigger than your organ. **Archives of dermatology**, v. 126, n. 3, p. 301-302, 1990.

GUERRERO, R.J.; DELABIE, J.H.C. ; DEJEAN, A.. Taxonomic contribution to the *Aurita* group of the ant genus *Azteca* (Formicidae: Dolichoderinae). **Journal of Hymenoptera Research: Festschrift Honoring Roy Snelling**, v. 19: p. 51-65, 2010.

HAN, A.; CHIEN, A. L.; KANG, S. Photoaging. **Dermatologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 291-299, 2014.

HARSHA, P.S.C S. et al. Cyanidin-3-glucoside, nutritionally important constituents and in vitro antioxidant activities of *Santalum album* L. berries. **Food research international**, v. 50, n. 1, p. 275-281, 2013.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HECK, D. E. et al. UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22432-22436, 2003.

HEGDE, P. S.; CHANDRAKASAN, G.; CHANDRA, T. S. Inhibition of collagen glycation and crosslinking in vitro by methanolic extracts of Finger millet (*Eleusine coracana*) and Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*). **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 13, n. 9, p. 517-521, 2002.

HENLE, T.; MIYATA, T. Advanced glycation end products in uremia. **Advances in renal replacement therapy**, v. 10, n. 4, p. 321-331, 2003.

HOLBROOK, K. A. Biologic structure and function: perspectives on morphologic approaches to the study of the granular layer keratinocyte. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 4, p. S84-S104, 1989.

HUANG, H. L.; WANG, B.G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 16, p. 4993-4997, 2004.

HUEBSCHMANN, Amy G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes care**, v. 29, n. 6, p. 1420-1432, 2006.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JARAMILLO, D. A.; RINCÓN, J. V.; GUERRERO; M. F. P. Actividad tipo anti-ausencia del extracto metanólico de *Cecropia membranacea* Trécul en ratones. **Vitae**, v.15 n. 2, p. 267-273, 2008.

JEON, S.; DJIAN, P.; GREEN, H. Inability of keratinocytes lacking their specific transglutaminase to form cross-linked envelopes: absence of envelopes as a simple diagnostic test for lamellar ichthyosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 2, p. 687-690, 1998.

JOSÉ-CHAGAS, F. N.; VIANNA FILHO, M. D. M.; PESSÔA, L. M.; COSTA, S. S. Aspectos Químicos e Ecológicos de Espécimes Masculinos e Femininos de *Cecropia* Loeffl. (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v.6, n. 2, p.432- 452, 2014.

JULKUNEN-TIITTO, Riitta et al. Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. **Phytochemistry reviews**, v. 14, n. 2, p. 273-297, 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, p.358-370, 2004.

KANATT, S.R. et al. Kappaphycus alvarezii: Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

KATTA, R.; DESAI, S. P. Diet and dermatology: the role of dietary intervention in skin disease. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 7, n. 7, p. 46, 2014.

KAWABATA, K. et al. A new objective histological scale for studying human photoaged skin. **Skin Research and Technology**, v. 20, n. 2, p. 155-163, 2014.

KERTON, F. M.; MARRIOTT, R. **Alternative solvents for green chemistry**. Royal Society of chemistry, 2013.

KLANK, F. A. **Estudo etnofarmacológico e avaliação da atividade antinociceptiva de plantas medicinais da comunidade quilombola Mussaca, Laranjeiras/SE**. 2014. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Meio Ambiente Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2014.

KOSMADAKI, M. G.; GILCHREST, B. A. The role of telomeres in skin aging/photoaging. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 155-159, 2004.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

KULMS, D.; SCHWARZ, T. Mechanisms of UV-Induced Signal Transduction. **The Journal of dermatology**, v. 29, n. 4, p. 189-196, 2002.

LEE, J. et al. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). **Food chemistry**, v. 103, n. 2, p. 662-669, 2007.

LEVER, W. F; SHAUMBURG-LEVER, G. **Histopatologia da pele**, 7^a ed. São Paulo: Ed Manole, v. 1, p.27- 29, 1991.

LIMA-LANDMAN, M.T. et al. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an *in vivo* approach to the hypotensive mechanism **Phytomedicine**, v.14, p. 314–320, 2007.

LIMTRAKUL, P. et al. Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of Cassia fistula flower butanolic extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 497, 2016.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin:“la raison d'etre” of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

MAHMOUD, B. H. et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 8, p. 2092-2097, 2010.

MANDAL, S.C; MANDAL, V.; DAS, K.A **Essentials of Botanical Extraction**. 1 Ed. Academic Press, 2015.

MAITY, N. et al. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1300-1305, 2011.

MAQUIAVELI, C.C.et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 49–57, 2014.

MARCO, Gino J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

MATSUDA, H.et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5317-5323, 2003.

MEDIANI, A. et al. Relationship between metabolites composition and biological activities of phyllanthus niruri extracts prepared by different drying methods and solvents extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 184-192, 2015.

MICHEL, J. L.; CACERES, A.; MAHADY, G. B. Ethnomedical research and review of Q'eqchi Maya women's reproductive health in the Lake Izabal region of Guatemala: Past, presente and future prospects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 307–322, 2016.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.419 p.1–15, 2003.

MONTORO, P.et al. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 5, p. 1614-1619, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, P. K. et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 64-73, 2011.

MÜLLER, S.D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 185, p. 255-262, 2016.

NAYAD, S. *Cecropia peltata* L. (Cecropiaceae) has wound-healing potential: A preclinical study in a Sprague Dawley rat model. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 5, n.1, p. 20-26, 2006.

NETO, S.; GAGLIOTI, A.; GUIDO, B. Urticaceae Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea, São Paulo**, v. 1, n. 36, p. 193-205, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICASIO, P.; AGUILAR SANTAMARIA, L.; ARANDA, E.; ORTIZ, S.; GONZALES, M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. **Phytotherapy Research**, v.19, n.8, p.661-664, 2005.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

OENING R., Patrik; CITADIN G., T.; BARROS da S., W. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L.(Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, 2004.

OLIVEIRA, M.O; MINGUZZI, M. Quantificação de fenóis totais e índice de inibição de radicais livres das folhas da *Cecropia pachystachya* Trec. (umbaúba). **Anais Do Enic**, v. 1, n. 3, 2015.

ORTMANN, C.F.et al.Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotoxicity Research**, v.29, n.4, p. 469-483, 2016.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, v. 2, p. 411-429, 2014.

PACHECO, N. R.et al. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **BioMed Research International**, 2014.

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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, n. 1, p. 529-532, 2005.

PAROLIN, P. Life history and environment of *Cecropia latiloba* in Amazonian floodplains. **Revista de biología tropical**, v. 50, n. 2, p. 531-545, 2002.

PENG, X.et al. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1907-1911, 2008.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clinical diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PEREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; ORTIZ, R.; ÁLVAREZ de S. M.; FERNÁNDEZ, M.A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol. aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.3, p. 279-284, 2001.

PIERTO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphor-molybdenum complex; specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2003.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PITTAYAPRUEK, P. et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 868, 2016.

PIWOWARSKI, J. P.; KISS, A. K.; KOZŁOWSKA-WOJCIECHOWSKA, M. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 937-941, 2011.

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

POON, F.; KANG, S.; CHIEN, A. L. Mechanisms and treatments of photoaging. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 31, n. 2, p. 65-74, 2015.

PRABHAKAR, K. R. et al. Bioactivity-guided fractionation of *Coronopus didymus*: A free radical scavenging perspective. **Phytomedicine**, v. 13, n. 8, p. 591-595, 2006.

PRICE, D. L. et al. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48967-48972, 2001.

PROST-SQUARCIONI, C. et al. Functional histology of dermis. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v. 135, p. 5-20, 2008.

QUAN, T. et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, p. 20-24, 2009.

QUAN, T. et al. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 415-424, 2010.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427-434, 2015.

QUINTELA, J. C, da *S.Cecropia catarinensis* Cuatrecasas (Urticaceae): **Chemical and biological studies**. 2013. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade na Área de Especialização em Fármacos e Plantas Mediciniais) – Programa de Pós-Graduação em Controle de Qualidade na Área de Especialização em Fármacos e Plantas Mediciniais, Universidade do Porto, Porto, 2013.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 458, n. 2, p. 221-226, 2015.

RABE, J. H. et al. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.

RADJEL, S. et al. The glyoxalase enzymes are differentially localized in epidermis and regulated during ageing and photoageing. **Experimental dermatology**, v. 25, n. 6, p. 492-494, 2016.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RAHBAR, S. et al. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (part II). **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 3, n. 6, p. 360-366, 2000.

RAMKISSOON, J. S. et al. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 7, p. 561-569, 2013.

RAMOS, M.F.S.; SANTOS, E.P.; ORTIZ, G.M.D. Photoprotective activity and preliminary studies on photodegradation of Aloe spp. and Hamamelis virginiana extracts. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 24, n. 2, p.179-187, 2003.

RAMOS-E-SILVA, M. et al. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 6, p. 750-758, 2013.

RAMOS-E-SILVA, M.; DA SILVA CARNEIRO, S. C.. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 6, n. 1, p. 40-50, 2007.

REVILLA-MONSALVE, Ma. C; ANDRADE-CETTO A.; PALOMINO-GARIBAY M.A.; WIEDENFELD, H.; ISLAS-ANDRADE, S. Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia Bertol. aqueous extracts on type 2 diabetic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.3, p. 636-640, 2007.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2006.

RICE-EVANS C.A; MILLER, N.; PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science** , v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

RICHARDSON, M A. et al. Inhibition and breaking of advanced glycation end-products (AGEs) with bis-2-aminoimidazole derivatives. **Tetrahedron letters**, v. 56, n. 23, p. 3406-3409, 2015.

RINNERHALER, M. et al. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 1, n. 4, p. 705-720, 2002.

ROCHA, F.F. et al. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents—*In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism, **Phytomedicine**, v.14, p. 396-402, 2007.

ROCHA, G. da G. et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15 p. 7355–7360, 2007.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrados na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n.1, p.102-123, 2001.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 160, p. 1-18, 2016.

SANG, S. Y. et al. Influence of drying treatments on antioxidant capacity of forage legume leaves. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 5, p. 988-993, 2014.

SCANLON, V.C.; SANDERS, T. **Essentials of anatomy and physiology**. 7^a ed. Filadélfia: FA Davis, p.104-113, 2014.

SCHALKA, S. et al. Brazilian consensus on photoprotection. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 6, p. 1-74, 2014.

SCHINELLA, G. et al. Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Pomolic Acid Isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, v.74, p.215–220, 2008.

SEMCHYSHYN, H. M. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SEOW, L.-J. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Gynura segetum* leaf. **International immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 186-191, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHI, F. et al. The inhibitory effects of γ -glutamylcysteine derivatives from fresh garlic on glycation radical formation. **Food chemistry**, v. 194, p. 538-544, 2016.

SHIN, S. et al. Ameliorating effect of *Akebia quinata* fruit extracts on skin aging induced by advanced glycation end products. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9337-9352, 2015.

SILVA, M. A. B. da et al. Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

SILVA, W. W. et al. Quantificação e classificação automática de fibras colágenas tipos I e III. In: **21th Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Salvador, BA, Brazil**. p. 1535-1538, 2008.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Research and Technology**, v. 7, n. 1, p. 18-23, 2001.

SINGH, J. P. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 1025-1030, 2016.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SKULACHEV, V. P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 2, p. 283-289, 2012.

SØRENSEN, G.; JØRGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 202, n. 3, p. 205-210, 1996.

SORRELL, J. M.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. **Journal of cellular physiology**, v. 200, n. 1, p. 134-145, 2004.

SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**. v.15, p. 462-469, 2008.

SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. Anatomia, fisiologia e histologia da pele. In: KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**, Rio de Janeiro: Ed Atheneu, v. 2, p. 5-7, 2004.

SOUZA, D. O. et al. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.19, n.1, p.121-132, 2014.

SPOSITO, T.C.; SANTOS, F.A.M. Scaling of stem and crown in eight *Cecropia* (*Cecropiaceae*) species of Brazil. **American Journal of Botany**, v.88, n.5, p.939-949, 2001.

THRING, T. SA; HILL, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 27, 2009.

TSOURELI-NIKITA, E.; WATSON, R. E. B.; GRIFFITHS, C.E.M. Photoageing: the darker side of the sun. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 160-164, 2006.

TU, P. T. B.; TAWATA, S. Anti-Oxidant, Anti-Aging, and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16723-16740, 2015.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. **Micron**, v. 35, n. 3, p. 173-177, 2004.

UCHÔA, V. T.; de PAULA, R. C.; KRETTLI, L. G.; SANTANA, A. E. G.; KRETTLI, A. U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, p.82–91,2010.

URIBARRI, J.; TUTTLE, K. R. Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 1, n. 6, p. 1293-1299, 2006.

USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of histology and cytology**, v. 65, n. 2, p. 109-126, 2002.

VERMA, N.; MANNA, S. K. Advanced Glycation End Products (AGE) Potentiates Cell Death in p53 Negative Cells via Upregulation of NF-kappa B and Impairment of Autophagy. **Journal of Cellular Physiology**, 2017.

WITTENAUER, J. et al. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**, v. 101, p. 179-187, 2015.

WU Z.Y. et al. Molecular phylogeny of the nettle family (Urticaceae) inferred from multiple loci of three genomes and extensive generic sampling. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 69, n. 3, p.814-827, 2013.

WU, J.-W. et al. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food chemistry**, v. 113, n. 1, p. 78-84, 2009.

WU, X.; MONNIER, V. M. Enzymatic deglycation of proteins. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 419, n. 1, p. 16-24, 2003.

ZALAMEA, P.C. et al. Continental-scale patterns of *Cecropia* reproductive phenology: evidence from herbarium specimens. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 278, p. 2437–2445, 2011.

ZENG, J. et al. Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: a robust model of cellular photoaging. **Journal of dermatological science**, v. 73, n. 1, p. 49-56, 2014.

ZENGIN, G. et al. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 244-251, 2014.

ZILLICH, O. V. et al. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. **International journal of cosmetic science**, v. 37, n. 5, p. 455-464, 2015.

ZOUBOULIS, C. C.; MAKRANTONAKI, E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in dermatology**, v. 29, n. 1, p. 3-14, 2011.