Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Paulo Vinícius Simões de Lima

Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A549

Rio de Janeiro
2016

Paulo Vinícius Simões de Lima

Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A549

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memoriam*)

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

L732 Lima, Paulo Vinícis Simões de
Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de Aloe vera (L.) Burm. f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A 549/ Paulo Vinícis Simões de Lima. – 2016.
112 f. : il.

Orientador: José Carlos Pelielo de Mattos.
Coorientador: Adriano Caldeira de Araujo.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Plantas medicinais – Toxicologia - Teses. 3. Aloe vera – Teses. I. Mattos, José Carlos Pelielo de. II. Araujo, Adriano Caldeira de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV Título.

CDU 633.88

Ficha catalográfica elaborada por Patrícia Bello Meijinhos – CRB7/5217

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte

_____ _____

Assinatura Data

Paulo Vinícius Simões de Lima

Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A549

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de Julho de 2016.

Orientador:

Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo*(in memoriam)*

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Norma Albarello

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Andre Luiz Mencalha

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Cassiano Felippe Gonçalves de Albuquerque

Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, Tatinha (meu porto seguro) e a Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir chegar até o final com saúde;

Ao meu orientador Dr. José Carlos Pelielo de Mattos que me recebeu no LRF em 2010, durante a graduação. Agradeço pela paciência, confiança, amizade, por todos os ensinamentos;

Ao Dr Adriano Caldeira de Araújo(*in memoriam*), por todos os ensinamentos, amizade e confiança;

À banca examinadora por aceitar o convite e por toda ajuda no trabalho;

Aos meus pais, que são razão do meu viver. Obrigado pela conversa, educação, presença em todas as fases da minha vida. Amor de vocês é algo sobrenatural. Amo vocês!

À Tatinha, amor da minha vida. Você me mostra diariamente como o amor se reinventa nas coisas pequenas. Obrigado por entrar em minha vida e por todo seu amor. Amo te!

Ao amigo Marcos Murata (Kiko Wayne ou Hank Pim). Foram 6 anos trabalhando e aprendendo com você. Obrigado por me ajudar e pela confiança depositada em mim;

À amiga Verônica pelas conversas e amizade. Sua amizade fez tudo ficar mais engraçado no laboratório;

À amiga Thaís pela ajuda e empenho nos experimentos. Sua humildade e respeito te levarão a lugares altos;

Ao amigo Eduardo que vem me ajudando desde a monografia quando participou da banca e agora no mestrado nos experimentos;

Ao Flávio José e Márcia pelas dicas, Michelle, Nathalia, Juliana, Claudia, Simone pelo coleguismo e colaboração em qualquer etapa da minha formação;

Ao Professor André Mencalha pela ajuda nos experimentos e discussão dos resultados;

À Isis, Juliana e Layane pela ajuda nos experimentos e pela força que me deram;

À Professora Mônica Regina da Costa Marques e aos integrantes da Central analítica de química do IQ-UERJ pela análise cromatográfica do extrato de Aloe vera;

Ao meu grande amigo e companheiro de profissão Maxwel. Sou grato demais por sua amizade. Obrigado, irmão!

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível Superior(CAPES) por todo o suporte,

A todos aqueles que por falha de memória possa ter esquecido.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

LIMA, Paulo Vinícius Simões de. **Avaliação da toxicidade induzida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f. associado à radiação ultravioleta A em células da linhagem A549**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Aloe vera é uma espécie pertencente à família Aloaceae. Entretanto, é o nome comum empregado para mais de 400 espécies de plantas. Entre a grande variedade de espécies conhecidas de Aloe, *Aloe vera* (L.) Burm. f. - é a mais utilizada na medicina popular e também pela indústria de cosméticos. É umaespécie suculenta e xeromórfica, cujas folhas armazenam uma substância gelatinosa, a qual são atribuídas propriedades medicinais. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que alguns componentes desse gel podem apresentar propriedades fotoquímicas que, na presença de radiação ultravioleta A, seriam responsáveis por efeitos adversos. Entre esses componentes, duas antraquinonas, aloe-emodina e aloina, foram identificados como capazes de absorver radiação UV e produzir espécies reativas de oxigênio. Assim, o presente estudo tem como objetivos avaliar a toxicidade induzida por um extrato glicólico comercial de *Aloe vera*, em associação com a radiação UVA, na linhagem de células eucarióticas A549 (células epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano), além de realizar uma análise cromatrografica do extrato. O extrato glicólico utilizado foi doado pelaempresa Mapric (São Paulo). A citotoxicidade do extrato foi avaliada pelo ensaio de proliferação celular WST-1 e pelo teste de exclusão do azul de tripan. Inicialmente, as células foram expostas ao extrato glicólico nas proporções de 1,56; 3,13; 12,5; 25 e 50%, durante 2, 6, 12, 24 e 48 horas. Os resultadosmostraram que as três concentrações mais baixas não foram citotóxicas, enquanto as concentrações de 12,5, 25 e 50% induziram uma redução significativa ($p<0,05$) na sobrevivência celular. A exposição ao UVA (10W/s) durante 30, 60, 90 e 120 minutos não induziu aumento da letalidade nas concentrações de 1,56, 3,13%. Porém, extrato de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, nas concentrações 50, 12,5 e 6,25%, induziu aumento significativo ($p<0,05$) na morte celular, quando comparado as amostras não irradiadas. A análise cromatográfica do extrato glicólico de *Aloe vera*, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, apontou ausência da antraquinona emodina. Leituras espectrofotométricas também não registraram a presença de emodina no extrato, além de mostrarem que a radiação UV não modifica o perfil de absorção do extrato. Além disso, uma avaliação da produção de estresse oxidativo produzido pela exposição aos agentes foi realizada por citometria de fluxo. A marcação com DCFDA, um corante fluorogênico,foi realizada 1 e 24horas após a exposição e os resultados demonstraram que houve um aumento de espécies reativas de oxigênio proporcional ao tempo, porém sem diferença significativa. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o extrato glicólico de *Aloe vera* pode ser prejudicial para as células, principalmente quando associado ao UVA, sugerindo a necessidade de um maior cuidado quanto ao uso de produtos dermatológicos contendo *Aloe vera* em sua composição, especialmente quando da exposição à luz solar.

Palavras-chave: Linhagem A549. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Radiação UV.Espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

LIMA, Paulo Vinícius Simões de.**Analysis of phytochemical profile ofcommercialglycolic extract of Aloe vera (L.) Burm f. and evaluation of its toxicity A549 lineage cellswhen combined with ultraviolet A549**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Aloe vera is a plant that belongs to the Aloaceae family, being the common name for over 400 plant species. Among the large variety of known species of Aloe, Aloe vera (L.) Burm. F. (Aloe vera) is the most used by the population because of its folk medicinal properties and by the cosmetic industry in order to compose shampoos, creams and other cosmetics. Aloe vera is a succulent and xeromorphic plant, whose leaves store a gelatinous substance, rich in substances wich medicinal properties are attributed. However, recent studies have shown that some components of the gel may exhibit photochemical properties that in the presence of ultraviolet A radiation, would be responsible for adverse effects. Among these components, two anthraquinones, aloe-emodin and aloin were identified as capable of absorbing UV radiation and produce reactive oxygen species. This study aims to evaluate the toxicity induced by a commercial glycolic extract of Aloe vera in combination with UVA radiation, in A549 eukaryotic cells line (alveolar basal epithelial cells of human adenocarcinoma). The aloe vera extract glycolic was donated by Mapric (São Paulo). Cytotoxicity of the extract and its association with UVA are being evaluated by cell proliferation assay WST-1 and exclusion of trypan blue test.To evaluate a possible statement of the mechanism of action and its association with UVA, it will be performed by flow cytometry oxidative stress marking flow with DCFDA in the samples tested. Initially, cells were exposed to the glycolic extract of aloe vera at proportions of 1.56; 3.13; 12.5; 25 to 50% for 2, 6, 12, 24 and 48 hours. This data demonstrate that lower proportions of aloe vera (1.56, 3.13 and 6.25%) were not cytotoxic, while the proportions of 12.5, 25 and 50% induced a significant reduction in cell survival. After that,cultures of A549 cells were incubated with the extract (50, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56%) in association with exposure to UVA (10w / s) for 30, 60, 90 and 120 minutes. Again the concentrations of 1.56, 3.13 and 6.25% did not show a toxic profile for the cells. The extract of Aloe vera, at concentrations 50 and 12.5% in combination with UVA radiation, induced greater cell death rate when compared to the results seen in the trials with the non-irradiated sample.Experiments were also conducted to analyze the presence of Emodin, anthraquinone, by cromatografia.The results point to the absence of such antroquinona in the extract. This result was also confirmed by spectrophotometry. Furthermore, to find out if the UVA radiation caused a change in the absorption peaks of these ratios and the medium HAM-F12, samples containing the medium and the proportions were irradiated for 2 hours and there was no difference in the middle absorption peaks and proportions tested, suggesting that the radiation does not cause physical and chemical changes in the extract.In addition, an assessment of oxidative stress produced by exposure to producing agents was performed by flow cytometry. Labeling with DCFDA a fluorogenic dye was performed 1 and 24 hours after exposure and the results showed an increase of reactive species of oxygen proportional to the time without statisticaldifference. This set of results suggest that the glycolic extract of aloe vera can be harmful to the cells when associated with UVA and people should be careful when using skin products with aloe vera under sunlight.

Keywords: A549 lineage.Cytotoxicity. Genotoxicity.UV radiation.Reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotos da planta *Aloe vera*..... 22

Figura 2 – Representação esquemática da planta *Aloe vera* e um corte transversal da folha..... 23

Tabela 1 – Composição da planta de *Aloe Vera*..... 24

Figura 3 – Composição química do gel de *Aloe vera* (L.) Burm. F..... 26

Figura 4 – Estruturas químicas das antraquinonas aloína, emodina e aloe-emodina... 29

Figura 5 – Representação da formação do (a) dímero de ciclobutânico de pirimidina e (b) fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona..... 33

Quadro 1 – Extrato glicólico de *Aloe vera* e suas proporções..... 44

Quadro 2 – Composição do meio de cultura e soluções utilizadas para cultivo celular 49

Figura 6 – Confluência da linhagem A549 em meio HAM F12 com 10% de soro fetal bovino em microplacas de 96 poços..... 52

Figura 7 – Padronização da cinética do metabolismo do WST-1 nas concentrações celulares de 3, 5, 10, 15, 20 e 30 x 10^3 células/poço da linhagem A549 para avaliação de viabilidade..... 53

Figura 8 – Determinação da absorbância do branco da reação (meio HAMF12) e das diferentes concentrações de extrato de *Aloe vera* através do ensaio WST-1 54

Figura 9 – Viabilidade da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* por 48 horas, através do ensaio WST-1..... 56

Figura 10 – Viabilidade da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, por até 2horas, através do ensaio WST– 1 60

Figura 11 – Viabilidade celular da linhagem celular A549 exposta ao UVA, através do ensaio WST-1..... 63

Figura 12 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 50% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do Azul de tripan..... 65

Figura 13 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 12,5% de extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA pela metodologia do Azul de tripan..... 66

Figura 14 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 6,25% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do Azul de tripan..... 67
Figura 15 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 50% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA 69
Figura 16 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 12,5% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA..... 70
Figura 17 – Viabilidade da linhagem A549 exposta a 6,25% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA..... 71
Figura 18 – Espectro de absorção (200 – 800 nm) de uma solução padrão de emodina e de diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera*..... 72
Figura 19 – Espectro de absorção (200 – 800 nm) do meio F12-HAM (A) e de diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera* (B – E), 2 e 24 horas apósexposição à radiação ultravioleta A 73
Figura 20 – Cromatrografia líquida com detector DAD(UV-VIS) do padrão de emodina (10 ppm): (A) Absorção em254nm e (B)em 420nm..... 76
Figura 21 – Cromatrografia líquida com detector DAD(UV-VIS) do extrato glicólico de *Aloe vera*: (A) Absorção em254nm e (B) em 420nm..... 78
Figura 22 – Porcentagem de células marcadas positivamente para estresse oxidativo com DCFDA(2',7' –dichlorofluorescin diacetate): (A) após 1 hora de exposição ao UVA; e (B) 24 horas após a exposição ao UVA..... 80
Figura 23 – Intensidade de fluorescência emitida pela ligação do DCFDA(2',7' – dichlorofluorescin diacetate) com as espécies reativas de oxigênio produzidas pela linhagem celular A549: (A) após 1 hora de exposição ao UVA; e (B) 24 horas após a exposição ao UVA..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Agarose LMP	Agarose de ponto fusão baixo ou Low melting point
Agarose NMP	Agarose de ponto de fusão normal ou normal melting point
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CAM	Metabolismo ácido das crassuláceas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPD	Dímero ciclobutânico de pirimidina
Cox-2	Ciclooxigenase-2
DAD(UV-VIS)	*Diode array detedtor(Ultraviolet- Visible)*
DMSO	Dimetil sufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DCFDA	*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ERO	Espécies Reativas de oxigênio.
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HAM F12	Meio de cultura HAM F12
HPLC	*High Performance Liquid Cromatograph*
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcanta Gomes
LRF	Laboratório de Radio e Fotobiologia- UERJ
MS	Metabólitos secundários
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
MPO	mieloperoxidase
NADPH-oxidase	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato oxidase
OMS	*O*rganização mundial de saúde
PBS	*phosphate buffer salts*
PGE-2	prostaglandinas E2
pH	Potencial hidrogenionico

qsp	Quantidades suficientes para
rpm	Rotações por minuto
SCGE	*Single Cell Gel Electrophoresis*
SFB	Soro fetal Bovino
Tris	(Hydroxymethyl)aminomethane
UV	Radiação Ultravioleta
UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B
UVC	Radiação Ultravioleta C
WST-1	*Water-soluble tetrazollium 1*
XOR	Xantinaoxidorredutase
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina

LISTA DE SÍMBOLOS

A549	Linhagem epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano
%	Porcentagem
×	Multiplicação
B	Beta
CG	Citosina-Guanina
°C	GrauCélsius
Cm^2	Centímetro quadrado
Cm	centímetro
CO_2	Dióxido de Carbono
G	gravidade
HeLaS3	carcinoma uterino humano
H	hora
H_2O	Molécula da água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
$J/m^2/s$	Joule por metro quadrado por Segundo
kJ/m^2	Kilojoule por metro quadrado
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
m	minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
mm^3	Milimetro cúbico
mA	Miliamper
µL	Microlitro
µM	Micromolar
nm	Nanômetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico

$Na_2HPO_47H_2O$	Fosfato dissódico heptahidratado
N/N0	Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle
OH•	Radical Hidroxila
O_2	Oxigênio
$^1O_2$	Oxigênio singlet
$^3O_2$	oxigênio triplet
O_3	Ozônio
$O_2•^-$	Radical ânio superóxido
S	Segundos
TA	Timina-Adenina
V/V	Volume por volume
V	volts
W/m^2	Watt por metro quadrado

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	18
1.1	**Plantas medicinais**.....	18
2	***ALOE VERA* (L.) BURM. F**.....	21
2.1	**Classificação Taxonômica**.....	21
2.2	**Caracteristicas morfoanatômicas e etnobotanicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f**	22
2.3	Principais compostos químicos da *Aloe vera* (L.) Burm, f.....	24
2.3.1	Composição do gel e do látex da *Aloe vera* (L.) Burm. f.....	25
2.3.2	Metabólitos secundários em *Aloe vera* (L.) Burm. f.....	28
2.4	**Extrato glicólico de *Aloe vera* (L.) Burm. f**.....	30
3	**RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS**.....	31
4	**ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)**.....	35
4.1	**Formação e decomposição de ERO**.....	35
5	**JUSTIFICATIVA**.....	38
6	**OBJETIVOS.**.....	40
6.1	**Objetivogeral**.....	40
6.2	**Objetivo específico**.....	40
7	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	41
7.1	**Linhagem celular A549**.....	41
7.2	**Cultivo celular**.....	41
7.3	**Curvas de crescimento para padronização do número de células**.....	42
7.4	**Padronizações do ensaio de proliferação WST-1**.....	42
7.4.1	Avaliações da cinética do metabolismo do WST-1 na linhagem A549 e do tempo de incubação do WST-1.....	43
7.4.2	Determinação da absorbância do branco da reação e das proporções do extrato...	43
7.5	**Exposições das células ao extrato glicólico de *Aloe vera* comercial**.....	44
7.6	**Condições de iluminação com radiação ultravioleta A (UVA – 365 nm)**.....	45
7.7	**Exposições das células ao extrato glicólico de *Aloe vera* comercial em associação com a radiação UVA**.....	45
7.8	**Exposições da linhagem A549 a diferentes taxas de dose de UVA**.....	46
7.9	**Ensaio de exclusão por Azul de tripan**.....	46

7.10 **Marcação de estresse oxidativo com DCFDA(*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*)**..... 47

7.11 **Avaliação do extrato glicólico de *Aloe vera* por espectrofotometria**..... 48

7.12 **Análise por cromatrografia líquida de alta eficiência(CLAE).**..... 48

7.13 **Composição do meio de cultura e soluções empregadas no estudo**..... 48

8 **ANÁLISE ESTATISTICA**..... 51

9 **RESULTADOS**..... 52

9.1 **Padronizações do cultivo da linhagem celular A549 em placa de 96 poços**.... 52

9.2 **Padronização do ensaio do WST-1**..... 53

9.3 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de Aloe vera**..... 55

9.4 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 exposta ao extrato glicólico de *Aloe vera* associado à radiação UVA**..... 59

9.5 **Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 exposta ao UVA**..... 62

9.6 **Ensaio de viabilidade celular da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* em associação com a radiação UVA pelo método de exclusão do Azul de Trypan**..... 64

9.7 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 exposta ao extrato glicólico de *Aloe vera* associado â radiação UVA após 24horas**..... 68

9.8 **Análise dos espectros de absorção da emodina e das diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera***..... 72

9.9 **Análise dos espectros de absorção das diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera*, após exposição à radiação ultravioleta** A..... 73

9.10 **Análise do extrato glicólico de *Aloe vera* por cromatrografia líquida de alta eficiência**..... 76

9.11 **Detecção de estresse oxidativo em células da linhagem a549 expostas ao extrato glicólico de *aloe vera*, associado ou não à radiação UVA** 79

10 **DISCUSSÃO**..... 84

CONCLUSÕES..... 93

PERSPECTIVA..... 94

REFERÊNCIAS..... 95

ANEXO- Extrato glicólico de Aloe Vera (HG) 112

INTRODUÇÃO

Diferentes fatores exógenos podem iniciar ou contribuir para alterações na homeostasia celular, sendo que a exposição à radiação solar, por seus efeitos cumulativos, tem papel de destaque nessa ação(GUARATINE, MEDEIROS e COLEPICOLO, 2007). O espectro solar que atinge a superfície da Terra é composto por diferentes comprimentos de onda, que incluem os raios infravermelhos, a radiação ultravioleta (UV) a luz visível. A pele, por ser o órgão mais externo, está mais exposta à radiação UV e ao foto envelhecimento causado por ela.

Atualmente há um crescente interesse da população mundial no uso de produtos derivados de espécies vegetais para o combate de doenças, proteção contra o estresse e os radicais livres e também para a composição de cosméticos, xampus e cremes.

Assim, como a utilização de extratos vegetais em produtos farmacêuticos e cosméticos tem mostrado ser uma tendência mundial que cresceu substancialmente nas duas últimas décadas, a identificação de compostos com propriedades antioxidantes e fotoprotetoras é de grande importância na prevenção da foto carcinogênese e outros efeitos nocivos da radiação UV. Por outro lado, a fototoxicidade dos produtos cosméticos também é um fator de preocupação porque estes produtos são geralmente aplicados em uma superfície grande da pele que pode ser também exposta à luz solar, razão pela qual são relevantes os estudos sobre as interações de produtos naturais e de cosméticos com a radiação UV(VIOLANTE et al., 2009).

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 **Plantas medicinais**

É de conhecimento geral que as populações humanas convivem com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo formas de explorá-las para distintas finalidades. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993; OLIVEIRA,BARROS& MOITA NETO,2010).

Durante séculos as plantas medicinais têm sido utilizadas pelo ser humano para fins terapêuticos. Em um grande número de países ao redor do mundo, medicamentos de origem vegetal são comumente utilizados em cuidados básicos. A preparação e utilização desses tipos de medicamentos são em grande parte baseadas no empirismo (HARTMAN et al, 1990; OLIVEIRA, BARROS & MOITA NETO, 2010). Alguns têm sido utilizados com sucesso diretamente no tratamento e prevenção de doenças infecciosas ou, indiretamente, por estimular o sistema imunológico, graças aos efeitos farmacológicos causados por substâncias com funções importantes no desenvolvimento e nas respostas adaptativas das plantas a fatores bióticos e abióticos (DJAFOUA et al, 2015; JUNIOR et al., 2005).

Os estudos sobre o uso das plantas para fins medicinais desenvolvidos por AMOROZO & GELY (1988), MILLIKEN & ALBERT (1996), GONÇALVES & MARTINS (1998), RÊGO (1998), CASTELLUCCI et al. (2000), RODRIGUES & CARVALHO (2001), AMOROZO (2002), COUTINHO (2002), FRANCO & FONTANA (2002), RITTER et al. (2002), NUNES et al. (2003), MEDEIROS et al. (2003), MACÊDO & FERREIRA (2004), PEREIRA et al. (2004), FUCK et al. (2005), SOUSA & FELFILI (2006), AZEVÊDO & SILVA (2006), BORBA & MACEDO (2006) e PINTO et al. (2006) demonstram crescente interesse acadêmico pela medicina popular, especialmente após o reconhecimento de que a base empírica pode, muitas vezes, ter comprovação científica e de que a análise da exploração do ambiente pelos povos tradicionais fornece subsídios para estratégias de manejo e uso adequado de determinados ambientes(OLIVEIRA, BARROS & MOITA NETO, 2010).

No entanto, os produtos naturais, apesar de serem utilizados por séculos, também podem promover efeitos colaterais indesejáveis e ainda são poucos os estudos científicos acerca de sua ação tóxica e/ou genotóxica (HARTMAN et al, 1990; JUNIOR et al., 2005; MELLO et al, 2015).

A OMS define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (ZHANG, 1998). Segundo a ANVISA, em sua portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário[1]. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas(VEIGA JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005).

Apesar da portaria emitida pela secretaria de vigilância sanitária, a maior parte dos fitoterápicos, que são utilizados atualmente por automedicação ou na prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA-JUNIOR, 2008). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contraindicações ou uso concomitante com outros medicamentos (COELHO, 1998; CORDEIRO, CHUNG&SACRAMENTO, 2005; AMORIM et al., 2007; SILVEIRA, BANDEIRA & ARRAIAS, 2008).

A crença na"naturalidade inócua" dos fitoterápicos e plantas medicinais não é facilmente contradita, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso de plantas medicinais consistem em informações que dificilmente chegam ao alcance dos usuários atendidos nos serviços de saúde pública, caracterizado como indivíduos de baixa escolaridade e acervo cultural (SILVA, 2003; SILVA et al., 2006; ALEXANDRE, BAGATINI&SIMÕES, 2008; SILVEIRA, BANDEIRA & ARRAIAS, 2008).

[1] Acesso em 2016: http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/eF

O exercício da fitoterapia representa uma prática sociocultural da comunidade, que vem sendo aceita e utilizada por médicos do mundo todo, ainda que estes tenham sido formados em instituições pertencentes a um modelo biomédico-farmacológico de atenção à saúde (SILVA, 2003; SILVEIRA, BANDEIRA & ARRAIAS, 2008).

Segundo a OMS, especialmente em países em desenvolvimento, uma parcela significativa da população ainda confia nos produtos à base de plantas medicinais no tratamento de suas doenças, ou utiliza a medicina tradicional (ou alternativa, não convencional, não ortodoxa ou medicina complementar) na atenção primaria à saúde (RAHMAN & SINGHAL, 2002, SILVEIRA, BANDEIRA & ARRAIAS, 2008). Esses produtos são utilizados para várias finalidades, sob diversas combinações (com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros) baseados em evidências históricas ou pessoais, onde geralmente não são atribuídos nenhum evento adverso (CALIXTO, 2000; FUNARI & FERRO, 2005, SILVEIRA, BANDEIRA & ARRAIAS, 2OO8).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente(VEIGA JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR, PINTO &MACIEL, 2005).

Segundo SANTOS(2005) estudos mostram que polifenóis, compostos fitoquímicos presentes em produtos como cosméticos, xampus e sabonetes à base de plantas, administrados de forma tópica em humanos, podem interagir com a radiação ultravioleta proveniente do Sol e sofrer alteração no seu modo de ação e/ou no efeito celular produzido (SANTOS et al, 2005).

2 *ALOE VERA* (L.) BURM F.

Aloe vera é uma espécie pertencente à família Aloaceae (FREITAS, RODRIGUES & GASPI, 2014). É popularmente conhecida como babosa, nome comum para mais de 400 espécies vegetais, como por exemplo: *Aloe ferox* Mill. e seus híbridos como *Aloe africana* Mill. e*Aloe spicata* L. f.; *Aloe vera* (L.) Burm. F. (sinonímia: *Aloe barbadensis*Mill.) (BOZZI et al., 2007; SINGH & SOOD, 2009).

2.1 **Classificação Taxonômica**

Reino – *Plantae*
Subreino – *Tracheobionta (Plantas vasculares)*
Superdivisão – Espermatófita (Plantas com sementes)
Divisão – *Magnoliophyta (Flantas com flores)*
Classe – *Liliopsida (Monocotiledonea)*
Subclasse - Liliidae
Ordem – *Liliales*
Familia – *Aloaceae*
Gênero – *Aloe* L.
Espécie – *Aloe vera* (L.) Burm. f. (USDA, 2016)[2].

Em grande parte da bibliografia de referência, *Aloe barbadensis* Mill. é tido como o nome correto da espécie e *Aloe vera* (L.) Burm. f. é considerado um sinônimo. Contudo, de acordo com a *International Rules of Botanical Nomenclature* (Regras Internacionais de Nomenclatura Botânica), *Aloe vera* (L.) Burm. f. é o nome legítimo desta espécie (WHO, 1999).

Na literatura é encontrada com as sinonimias: *Aloe chinensis* Bak., *A. elongata* Murray, *A. indica* Royle, *A. officinalis* Forsk., *A. perfoliata* L., *A. rubescens* DC, *A. vera* L. var. *littoralis* König ex Bak., *A. vera* L. var. *chinensis* Berger, *A. vulgaris* Lam.. Existem muitos nomes comuns utilizados para denominar a *A. vera* e os seus produtos como *Aloe*

[2] Retirado do site da USDA: http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ALVE2

capensis, *Aloe curacao*, *‚Aloes*, *Aloé de barbados*, gel de *Aloe vera*, gel de *Aloé*, *Aloé do cabo*, entre outros (WHO, 1999; FREITAS, RODRIGUES & GASPI, 2014).

2.2 **Características morfoanoatômicas e etnobotânicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f.**

Aloe vera (L.) Burm. f.; (Figura 1) é uma espécie herbácea, sendo difícil estabelecer sua origem pois cresce em todas as regiões quentes do globo. Contudo acredita-se que seja nativa do norte da África ou da região do Nilo, no Sudão . Ela cresce em regiões de clima quente e seco, incluindo África, sul da Ásia e dos Estados Unidos, Brasil e outros países da América do Sul (BOZZI et al., 2007). Em países orientais, como Índia, China e Japão, ela tem um tradicional uso em medicamentos (WANG, 2012).

Figura 1 - Aspectos morfológicos da *Aloe vera*

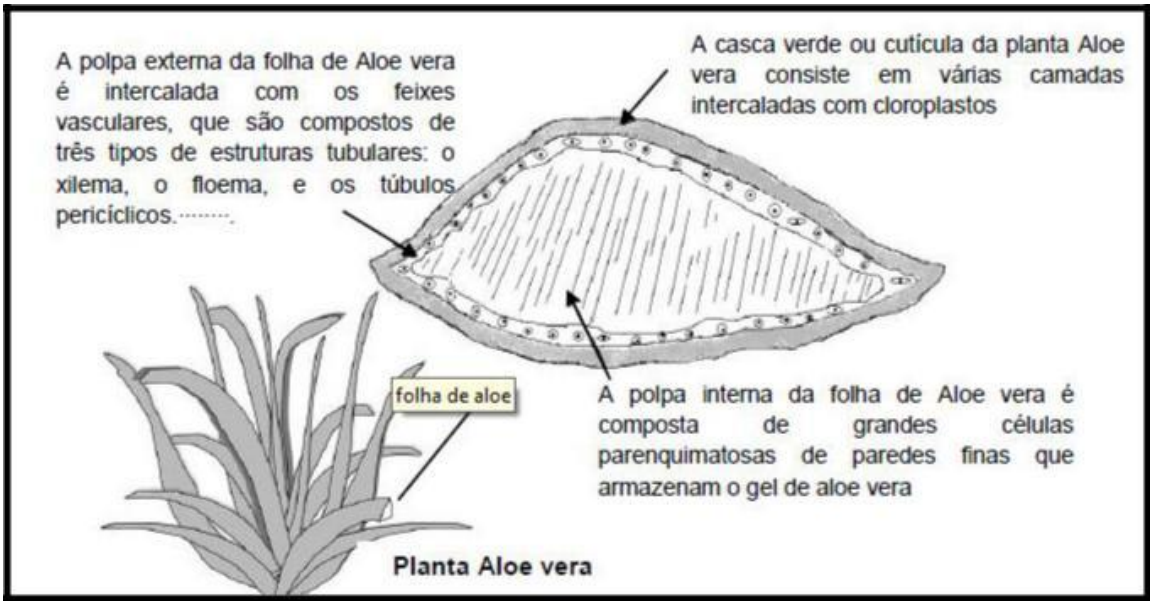
Fonte: SHARRIF; SANDEEP, 2011.

É monocotiledônea, perene e atualmente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais (SINGH & SOOD, 2009). Suas folhas são verdes, túrgidas e possuem pontas afiadas. São folhas simples, triangulares e alcançam entre 30 a 50 cm de comprimento e 10 cm de largura na base. As flores da *Aloe vera* são tubulares, de cor amarela com 25-35 cm de comprimento em que os estames se encontram frequentemente projetados para além do tubo do perianto. Esta planta é um membro da família Aloaceae e não da família dos cactos como

normalmente se supõe devido à disposição em forma de roseta das longas folhas no caule central (WHO, 1999; CHOW et al., 2005; SILVA et al., 2010). A reprodução é vegetativa, devido à esterilidade das flores masculinas, e os brotos são formados no caule subterrâneo, em frequência muito baixa e sazonal (SINGH & SOOD, 2009; WANG, 2012). *Aloe vera* é classificada como xerófita, por ser uma planta adaptada a viver em áreas de baixa disponibilidade de água e é caracterizada por possuír um enorme tecido de armazenagem de água (planta suculenta). Seu metabolismo segue a via das Crassuláceas (CAM), uma adaptação da fotossíntese que envolve a concentração e armazenamento de CO_2, sob a forma de ácido málico (NI et al., 2004).

As folhas da planta armazenam uma substância gelatinosa que pode ser facilmente extraída e incorporada em vários produtos comercializados livremente em muitos países. O "gel de *Aloe vera*" também é conhecido como suco de Aloe ou simplesmente Aloe (BOUDREAU & BELAND, 2006). Na figura 2, pode-se observar um esquema de corte transversal da sua folha.

Figura 2 - Representação esquemática da planta *Aloe vera* e um corte transversal da folha.



Nota: Adaptado de BOUDREAU & BELAND, 2006.

Aloe vera é amplamente usada como um ingrediente em alimentos, bebidas, suplementos alimentares, cosméticos e produtos farmacêuticos, devido às suas propriedades aromáticas e atividades farmacológicas (WANG, 2012).

No Brasil, produtos à base de *Aloe vera* estão autorizados pelos órgãos competentes como fitoterápico,de uso tópico, para cicatrização. No entanto, não há registro de medicamento a base de *Aloe vera* para uso oral (CARVALHO, 2008).

2.3 **Principais compostos químicos da *Aloe vera* (L.) Burm. f.**

A composição química das diferentes Aloes(*A. arborescens*, *A. saponária*, *A. aristata*, *A. brevifolia*, *A. ciliares*, *A. ferox*, *A. striata*, *A. variegata*, *A. juvenna*, etc.) pode variar, dependendo das condições de crescimento, da espécie e do clima. A composição química da folha de *Aloe vera* (L.) Burm. f. está representada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da planta de *Aloe Vera* (L.) Burm. f.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAALOE VERA (L.) BURM F.	
ANTRAQUINONA/ANTRONA	Aloe-emodin, ácido-aloético, antranol, aloina A e B (ou de modo geral, barbaloina), isobarbaloina, emodina, éster de ácido cinâmico.
CARBOIDRATOS	Manana pura, acetilato de manana, acetilato glicomanana, glucogaloctomanana, galactano, galactogalacturano,arabinogalactano, celulose, galactoglicoarabinomanana, substancia péptica, xileno.
ENZIMAS	Fosfatase Alcalina, amilase, carboxipeptidase, catalase, ciclooxidase, ciclooxigenase, lipase, oxidase, carboxilase fosfoenolpiruvato, superóxido dismutase
COMPONENTES INORGÂNICOS	Cálcio, cloro, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, fósforo, sódio, zinco.
AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina.
COMPONENTES ORGÂNICOS E	Ácido araquidônico, ácido α-linolenico, esteróides (colesterol, campestrol, β-

LIPÍDICOS	sitosterol), triglicerídeos, ligninas, sorbato de potássio, triterpenóides, giberilina, ácido salicílico, ácido úrico.
PROTEÍNAS	Lectina, substância lectina-*like*.
SACARÍDEOS	Manose, glicose, aldopentose, *L*-rhamnose, celulose.
VITAMINAS	Vitaminas A, B1, B2, B6, C, beta-caroteno, colina, ácido fólico, alfa-tocoferol.

Nota: . Adaptado HAMMAN, 2008 e SHARRIF& SANDEEP, 2011.

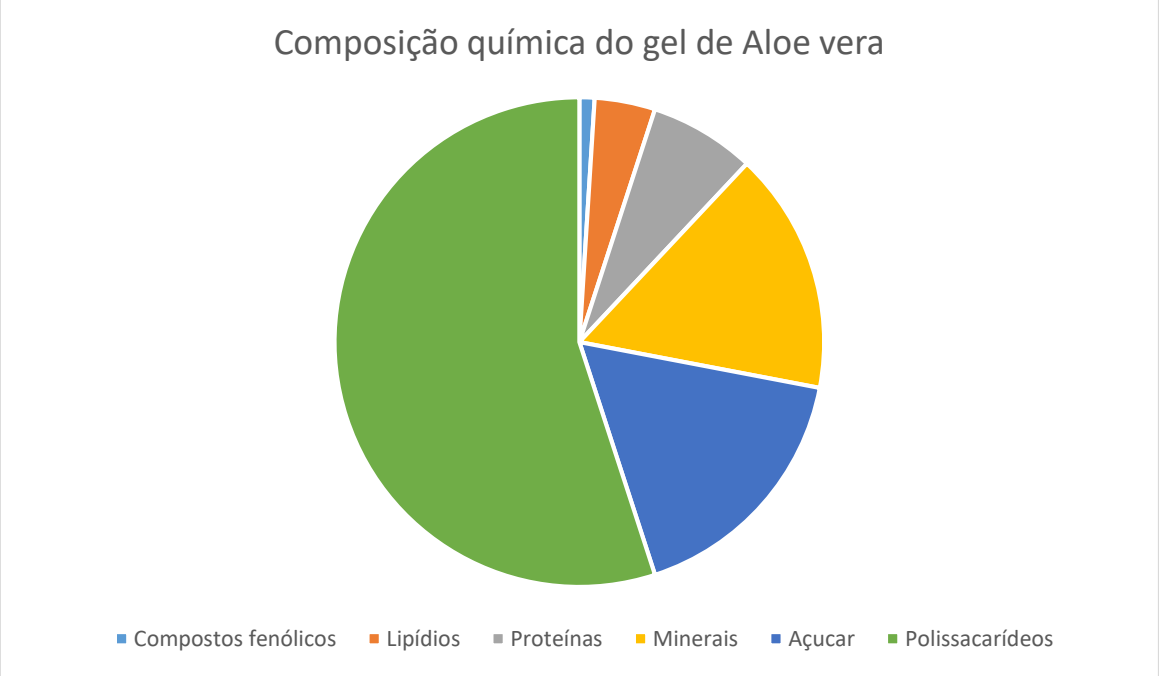
Essa planta contém mais de 75 ingredientes ativos identificados no gel de *Aloe vera*. Muitos desses efeitos medicinais produzidos por ela têm sido correlacionados com a presença de polissacarídeos encontrados no tecido parenquimatoso da parte interna da folha, sendo esses efeitos provenientes mais de uma ação sinérgica dos componentes do que de uma única substância (DAGNE et al., 2000).

A partir da *Aloe vera* são extraídos dois produtos comerciais: o látex e o gel (BOZZI et al., 2007).

2.3.1 Composição químicado gel e do látex da *Aloe vera* (L.) Burm, f.

O gel da babosaé incolor, e contém cerca de 98% água (BOZZI et al., 2007). O teor de sólidos totais do gel é de 0,66% e de sólidos solúveis é de 0,56% com alguns flutuações sazonais. Em matéria seca o gel é constituído de polissacáridos (55%), açúcares (17%), minerais (16%), proteínas (7%), lípidos (4%) e de compostos fenólicos (1%) (Figura 3,adaptado de LUTA & MCANALLEY, 2005).

Figura 3 - Composição química do gel de *Aloe vera* (L.) Burm. f.(segundo a matéria seca, adaptado de LUTA & MCANALLEY,2005)



O gel de *Aloe vera* contém muitas vitaminas, incluindo vitaminas antioxidantes importantes como A, C e E. As vitaminas B1 (Tiamina), niacina, vitamina B2 (riboflavina), colina e ácido fólico também estão presentes (LAWLESS & ALLEN, 2000). Alguns autores também sugeriram a presença de vitamina B12 (Cianocobalamina), que é normalmente disponível em carne de animais, em quantidades vestigiais (COATS, 1979; ATHERTON, 1998; AHLAWAT & KHATKAR, 2011).

Os carboidratos são obtidos a partir da camada de mucilagem da planta, em torno do parênquima interior ou gel e compreendem mono e polissacarídeos. Os mais importantes são os polissacáridos de cadeia longa conhecidos como glucomananos [β (1, 4) - ligados manano acetilado]. Xilose, ramnose, galactose e arabinose também estão presentes em quantidades vestigiais juntamente com o lupeol (um triterpenoide), colesterol, campesterol e β-sitosterol. Estudos estruturais sobre os polissacarídeos do gel de *Aloe vera* têm mostrado que o gel é composto de pelo menosquatro diferentesglucomananosparcialmenteacetilados, sendoos polímeroslinearessemnenhuma ramificaçãoe tendo ligações glicosídicas 1,4comglicose emanosena proporçãode1: 2: 8. A viscosidade dogeldiminuiquando há hidrólise dessesaçúcares. Quandoadministrado o gel por via oralalguns dosaçúcares parece ligarem-sea receptores locaisque revestem ointestinoeformamuma barreira, possivelmenteajudando a evitar a"síndromedo intestino solto" (ATHERTON, 1997; AHLAWAT & KHATKAR, 2011).

Segundo MEADOWS (1980) pelo menos seis enzimas estão presentes no gel de *Aloe vera*incluindo bradiquinase, celulase, carboxipeptidase, catalase, amilase e oxidase. A carboxipeptidase inativa a bradiquinase no local da ferida ou corte no corpo e produz o alívio da dor e efeito anti-inflamatório. Durante o processo inflamatório, bradiquinase produz dor associada com vasodilatação (SHELTON, 1991). O gel também contém glutationa peroxidase, bem como várias isoenzimas de superóxido dismutase*(*AHLAWAT & KHATKAR, 2011).

WANG e colaboradores (1993) relataram que a concentração de potássio e cloreto e era alta no gel de *Aloe vera,* em comparação com a maioria dos produtos de outras plantas, enquanto que o teor de sódio foi encontrado em menor quantidade. O cálcio, magnésio, cobre, zinco, crômio e ferro foram igualmente encontrados nos produtos de aloe. O lactato de magnésio inibe histidina descarboxilase e impede a formação de histamina a partir do aminoácido histidina (SHELTON, 1991). A histamina é liberada em muitas reações alérgicas e causando coceira intensa e dor. A prevenção da sua formação pode explicar os efeitos anti-alérgicos do gel de *Aloe vera (*AHLAWAT & KHATKAR, 2011).

O látex é o exudado amarelo amargo das células pericíclicas na camada exterior das folhas e é conhecido pelas suas propriedades laxativas (BOZZI et al., 2007). Os constituintes químicos em maior quantidade e mais ativos do látex são compostos fenólicos, mais particularmente, os derivados de hidroxiantracenos (15–40%) tal como a antraquinona aloína (BOZZI et al., 2007). Os outros componentes fenólicos são cromonas como aloesina(anteriormente denominado aloeresinaB), aloeresina A e vários outros constituintes têm sido descritos como aloe-emodina, homonataloina, nataloe-emodina, aloenina A e B, 4 hidroxialoína (ZONTA et al., 1995). A aloína e aloe-emodina foram identificadas como sendo os principais compostos ativos do látex desta planta (TIAN & HUA, 2005). Esses compostosexercem um poderoso efeitopurgativoquando ingeridasem grandesquantidades, masquando em baixa concentração, aparecem facilitar a absorção intestinalesão potentes antimicrobianos epoderososagentes analgésicos (SIMS etal., 1971).

Dentre as substâncias citadas, presentes tanto no gel quanto no látex, as antraquinonas são substâncias pertencentes ao metabolismo secundário das plantas. Diferentes dos compostos que pertencem ao metabolismo primário das plantas, que são essências a vida e comum nos vegetais, os metabólitos secundários aparentemente funcionam como defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas concorrentes) e moléculas sinalizadoras (para atrair agentes polinizadores ou animais de dispersão de sementes). Esses compostos

representam caracteres adaptativos que vem sendo submetidos à seleção natural durante o processo evolutivo (WINK, 2003).

2.3.2 Metabólitos secundários em *Aloe vera* (L.) Burm. f.

Metabólitos secundários (MS) estão presentes nas plantas, geralmente, em uma grande diversidade estrutural. Os tipos e concentrações de MS variam, de uma maneira específica, para tecidos e órgãos; sendo que diferenças podem ser observadas entre estágios de desenvolvimento de um mesmo indivíduo ou entre indivíduos diferentes e populações. Eles podem estar presentes na planta em um estado ativo ou "'pré-ativo"' que se torna ativado após ferimento do vegetal, ou em infecção por herbívoros (WINK, 2003).

Os principais metabólitos secundários descritos para as espécies de babosa são os compostos fenólicos do tipo antronas, cromonas e fenil-pirronas (ESTEBAN-CARRASCO et al., 2001).

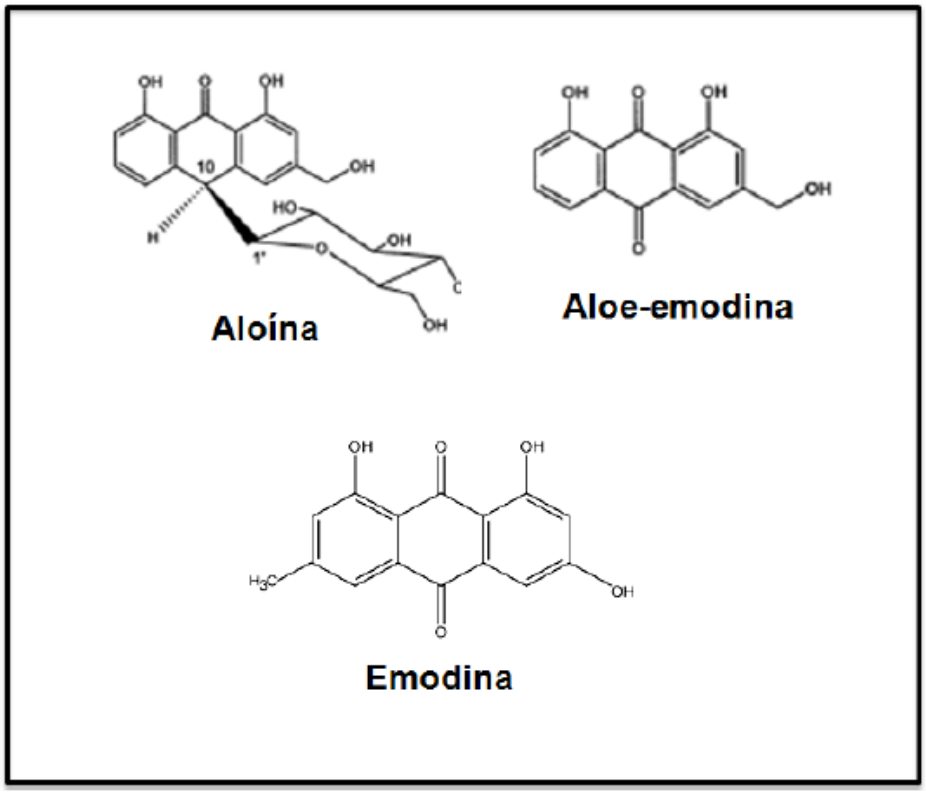
Dentre os derivados antracênicos, as antraquinonas são as mais estáveis; antronas e diantronas são relativamente estáveis em soluções aquosas acidificadas, mas na presença de alcális são rapidamente oxidadas a antraquinonas (FALKENBERG, 2004). As Antraquinonas são moléculas que possuem propriedades hidrofóbicas (antraceno) e hidrofílicas (hidroxilas e carbonilas.)(COSTA, 2012).

Devido à estrutura polifenólica, a aloína, aloe-emodina, emodina e aloesina são consideradas os componentes fisiologicamente ativos responsáveis por efeitos biológicos, tais como o efeito anti-inflamatório (SPERANZA et al., 2005), acelerador da cicatrização de feridas (MAENTHAISONG et al., 2007; MOORE & COWMAN, 2008; NI et al., 2007), e efeito protetor contra a lesão hepática (CHANDAN et al., 2007).

Na sua biossíntese, as antraquinonas que ocorrem naturalmente em plantas possuem dois grupamentos cetônicos nas posições C9 e C10, (YEN et al., 2000) e têm como precursores o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico reage com o ácido α-cetoglutárico, proveniente da desaminação do ácido glutâmico ou do ciclo do ácido cítrico, produzindo o ácido *o*-succinilbenzóico. O ácido 1,4-dihidróxi-2-naftóico (produto da redução do ácido *o* - succinilbenzóico) combina-se com o ácido mevalônico (proveniente do acetato), originando uma antraquinona (WIJNSMA, 1986; SANTOS, 2004).

A *Aloe vera* possui em sua composição a substância aloína (também conhecida comobarbaloína), emodina e aloe-emodina que são estruturalmente semelhantes à emodina (COSTA, 2012) (Figura 4). Essas três substâncias são encontradas em diversas espécies de plantas que são muito utilizadas tradicionalmente devido ao seu potencial laxativo

Figura 4 - Estruturas químicas das antraquinonas aloína, emodina e aloe-emodina



Alguns estudos apontam a emodina e aloe-emodina como potencialmente mutagênicas, além de demonstrarem um aumento da sensibilidade da pele à radiação UV, via danos oxidativos, fato não observado com a aloína (BOSCH et al., 1987; WAMER et al., 2003; XIA et al., 2007). Contudo, o uso da *Aloe vera* como ingrediente de variados produtos cosméticos como cremes, loções, sabonetes, fragrâncias, maquiagens e xampus, dentre outros, continua crescendo (GALLAGHER & GRAY,2003).

2.4 **Extrato glicólico de *Aloe vera* (L.) Burm. f.**

Os extratos comerciais de *Aloe vera* oferecem vantagens para preparação de cosméticos. Além de oferecer mais rapidez para execução do produto, podem ser encontrados em farmácias de manipulação. Eles podem ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em xampus, géis, cremes para banho, loção de limpeza , filtros solares e outros produtos cosméticos. Para cada produto indica-se uma dosagem do extrato vegetal para sua preparação. O extrato glicólico de *Aloe vera*, utilizado neste estudo, foi produzido e doado pela empresa Mapric Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP (Anexo 1 - boletim).

Neste extrato, de acordo com o fabricante, são encontrados os seguintes princípios ativos: compostos antracênicos (aloína, aloe-emodina, aloesina), mucilagem, carboidratos, polissacarídeos, ácido crisofânico, enzimas (celulase, carboxipeptidases, catalase, amilase, oxidase), aminoácidos; vitaminas B, C e E, e sais minerais.

Ainda de acordo com o fabricante, para utilização do extrato deve-se observar que: cremes, géis, leites e loções utiliza-se 1,0 a 5,0%, em cremes dentais de 1,0 a 3,0%, em xampus, condicionadores e sabonetes de 2,0 a 10,0% e em desodorantes cremosos ou líquidos, entre 1,0 e 5,0% do extrato glicólico.

O gel da planta, comumente encontrado nesses extratos, possui diversas propriedades farmacológicas já relatadas. Dentre elas se destaca sua ação anti-inflamatória e cicatrizante, que são as atividades mais estudadas atualmente. Entretanto, na última década, estudos apontam para novas atividades terapêuticas inerentes a droga, como, por exemplo, o trabalho publicado por REYNOLDS E DWECK (1999) que aponta o gel de *Aloe vera* como agente antifúngico, hipoglicemiante, imunomodulador e gastroprotetor.

3 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

A radiação ultravioleta (UV) compõe o espectro eletromagnético, entre os comprimentos de onda dos raios-x e da luz visível. Na superfície de nosso planeta, estamos diariamente expostos às emissões UV, através da maior fonte natural desse tipo de radiação, o sol (DIFFEY, 2002; MAIPAS &NICOLOPOULOU-STAMATI, 2015).

O espectro da radiação ultravioleta é classicamente dividido em três faixas de comprimento de onda, com emissões entre 320 – 400nm (UVA), 280– 320nm (UVB), e 200 – 280nm (UVC) (KIM, PARK & LIM, 2015). O filtro formado pela camada de ozônio absorve, completamente, os comprimentos menores que 290nm (UVC), sendo que parte do UVB e a totalidade do UVA atingem a superfície terrestre (SCHUCH, et al., 2009; SCHUCH & MENCK, 2010; MAIPAS &NICOLOPOULOU-STAMATI, 2015).

A exposição à radiação ultravioleta é um dos fatores ambientais que afetam a fisiologia da pele. A exposição da pele humana aos raios solares pode ter consequências em curto e longo prazo, incluindo eritema (queimadura solar), fotoenvelhecimento, fotoimunossupressão e câncer de pele (MARIONNET, TRICAUD & BERNERD, 2015).

O surgimento de dermatoses e neoplasias cutâneas está relacionado aos efeitos nocivos causados pela radiação UV, entretanto, a hiperplasia e pigmentação cutânea, que costumam ocorrer após uma longa exposição a esse tipo radiação, são apontadas como mecanismos de proteção, uma vez que o aumento da espessura da epiderme associado a uma maior concentração de melanina, levam a uma menor penetração da radiação UV na pele (BROWN, 2001; WHITE & ZON, 2008).

Os seres humanos estão em contato diário com a luz solar e a exposição da pele à essa radiação, associada a produtos xenobióticos fotoreativos, pode produzir reação anormal na pele, chamada de fototoxicidade (KIM, PARK & LIM 2015). Esse fenômeno é uma resposta aguda induzida por luz, que ocorre quando os produtos químicos fotoreativos são ativados pela luz solar e transformados em produtos citotóxicos que geram sintomas multifatoriais como irritação na pele, eritema, prurido e edema, que são semelhantes aos da queimadura solar exagerada. (KIM, PARK & LIM 2015).

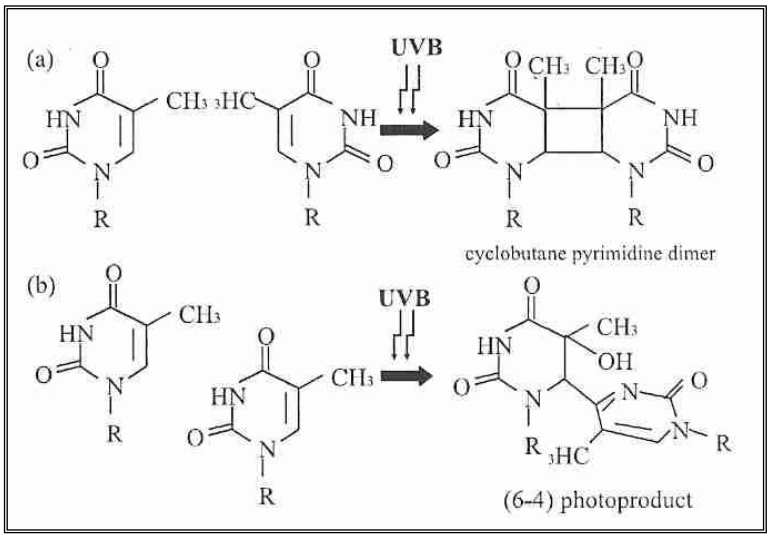
Responsável pela indução de uma grande variedade de efeitos biológicos importantes nos seres vivos, a radiação UV é extremamente relevante como fator ambiental. Seus fótons são capazesde causar danos em variadas moléculas biológicas como, por exemplo, proteínas e material genético (CALDEIRADE-ARAUJO & FAVRE, 1986; STARY & SARASIN, 2000;

BUDAI et al., 2004; CADET et al., 2009; GROFF et al., 2010). Atualmente, sabe-se que há uma maior exposição aos raios UV devido a uma menor filtração desses raios pela camada de ozônio, o que leva a um aumento de estudos acerca de seus efeitos causados na saúde (GROFF etal., 2010; HU et al., 2010; SHEN et al., 2010).

Emboraos raios UVBexibamefeitos benéficos, como a produção de váriospeptídeos antimicrobianosepré-vitaminaD, eles são mais energéticosdo que os raiosUVA e podem danificardiretamente oDNAdas células epidérmicas, induzir areação de queimadura solar e a longo prazosão os principais contribuintesda fotocarcinogênese (MARIONNET, TRICAUD & BERNERD, 2015). O UVB é o principal indutor de efeitos carcinogênicos e mutagênicos. No entanto, o UVA também é responsabilizado por causar tais efeitos em células e organismos (STARY & SARASIN, 2000; PFEIFER, YOU &BESARATINIA,2005; CHIARELLI-NETO et al.,2014;).

Alguns estudos recentes apontam para um aumento na incidência de radiação UVB (SHEN, et al. 2010), sendo essa fração responsável pela formação de eritema, pela redução da concentração de células de Langerhans, imunossupressão e edema, entre outros fatores inflamatórios que, quando exacerbados, estão diretamente ligados ao desenvolvimento de um carcinoma (EL-GHORR & NORVAL, 1997; TANAKA et al., 2004). Os processos inflamatórios gerados por esse tipo de radiação parecem ser mediados pelo aumento da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) que, em estudos com queratinócitos humanos, pareceu elevar a expressão de prostaglandinas E2 (PGE2) (TANAKA et al., 2004). Os raios UVB são quase completamente absorvidos pelos componentes celulares da epiderme (WANG & KOCHEVAR, 2005),levando à formação de dímero ciclobutânico de pirimidina (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona, (figura 5) que podem, ou não, levar as células afetadas à apoptose. Esse tipo de radiação pode, ainda, causar danos indiretos ao material genético pela produção de espécies reativas de oxigênio (KAWAGISHI et al., 1998; TANAKA et al., 2004; MONTAGNER & COSTA, 2009; HUR et al., 2010).

Figura 5 - Representação da formação do (a) dímero de ciclobutânico de pirimidina e (b) fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona



Nota: Adaptado de MONTAGNER & COSTA, 2009

Devido ao UVA não ser absorvido diretamente pela molécula de DNA, acreditava-se que ele não induziria a formação de CPDs. Contudo, foi demonstrado em alguns estudos que essa parcela da radiação UV também é capaz de gerar CPDs, tanto de forma direta quanto de forma indireta, através de fotossenbilizadores, muito embora o mecanismo pelo qual se dá essa formação permaneça inexplicado (MOURET et al., 2010; JIANG et al., 2009; ROBINSON et al., 2010). A citotoxicidade e genotoxicidade oriundas desse tipo de radiação dependem da intensidade da radiação recebida bem como da taxa de dose (BUDAI et al., 2004; HANSON, GRATTON&BARDEEN, 2006).

Além de penetrarem mais profundamente na pele e representar cerca de 95% da radiação ultravioleta recebida na superfície da Terra, a radiação UVA é a mais associada à produção e aos danos causados por estresse oxidativo. Os efeitos genotóxicos da radiação UVA são atribuídos, principalmente, ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio. Ela tem seus efeitos mediados pela excitação de fotosensibilizadores endógenos que consequentemente levam à produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo o oxigênio-singleto ($^1O_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo. Embora já tenham sido identificados vários fotosensibilizadores endógenos, seus mecanismos de produção de lesões através de ERO ainda não foram totalmente elucidados (VILE & TVRRELL, 1995; PFEIFER, YOU & BESARATINIA, 2005; RÜNGER & KAPPES, 2008; CADET, et al., 2009; CHIARELLI-NETO et al., 2014; MARIONNET, TRICAUD & BERNERD, 2015). Em

virtude disto, estudos têm sido realizados de modo a se identificar e compreender os mecanismos de indução de lesões por esse tipo de radiação.

4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas quimicamente instáveis e extremamante reativas encontradasna maioria dos sistemas biológicos e ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio, desempenhandopapéis importantes nasinalização celular ehomeostase (DEVASAGAYAMet al., 2004*)*. O termo ERO inclui as espécies radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade. Como exemplo pode-se citar o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o radical hidroperoxil ($HO_2^{\bullet}$), e algumas espécies não-radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet ($^1O_2$), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3), que são agentes oxidantes e facilmente convertidos em radicais. (KUNKEL, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001; EVANS, DIZDAROGLU & COOKE, 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

Durante períodos de estresseambiental(por exemplo, radiação UV), os níveis de EROpodeaumentar drasticamente (DEVASAGAYAMet al, 2004*)*.Isso pode resultar emdanos significativosas estruturascelulares e cumulativamenteisso é conhecidocomo o estresseoxidativo (SOSA TORRES,SAUCEDO-VÁZQUEZ &KRONECK, 2015).

No geral, estudos mostram que os principais que efeitosnocivosdasERO na célulasão: danos ao DNA,oxidaçõesde ácidos graxos poli-insaturadosemlipídios(peroxidação lipídica), oxidações deaminoácidoseproteínas, desativação de enzimas específicas por oxidação deco-fatores(BROOKER, 2011).

As espécies reativas de oxigênio são produzidos naturalmente por reações metabólicas. Essas reações ocorrem principalmente nas mitocôndrias, mas também no citosol e no retículo endoplasmático e dependem da ação dos peroxissomos para degradar os radicais que produzem(VASCONCELOS et al., 2007).

4.1 Formação e decomposição de ERO

Durante o processo de respiração celular, 95% do oxigênio é reduzido pela ação da enzima citocromo C oxidase, mediante a captura de 4 elétrons e 4 átomos de hidrogênio, levando à formação de água. Contudo, em decorrência de sua configuração eletrônica, 5% do

oxigênio utilizado é reduzido por uma via monoeletrônica, recebendo um elétron de cada vez, tendo como consequência a formação sucessiva de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) (LEITÃO & ALCANTARA-GOMES, 1997). Além disso, através da peroxidação lipídica, que é o processo através do qual as ERO atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, pode ocorrer a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares e promover o estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

A defesa antioxidante celular é formada por moléculas que podem ser divididas em dois tipos principais, não enzimáticas e enzimáticas.

Pertencentes ao primeiro grupo pode-se citar a vitamina E (alfa-tocoferol), que é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação (KAY et al., 1986); a vitamina A, que tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio singlet, mas seu precursor, o beta-caroteno, é tem alta afinidade por essa forma reativa de oxigênio. O beta-caroteno é um pigmento presente em todas as plantas e também pode ser encontrado em membranas celulares, inclusive nos lipossomos (MACHLIN & BENDICH, 1987); e a vitamina C (ácido ascórbico), que é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres e o oxigênio singlet. O ácido ascórbico participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Dentre as enzimas com atividade antioxidante, a glutationa peroxidase (GPx) catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutationa reduzida (GSH) para formar glutationa oxidada (GSSG) e água. A continuidade do ciclo catalítico da GPx depende da redução da glutationa oxidada pela enzima glutationa redutase, redutase por intermédio da oxidação de NADPH. Não se observa a presença de GPx em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrada em algumas algas e fungos (HALLIWELL & GUTTERIDGE,1989).

Catalase é uma hemeproteína que tem especificidade para o peróxido de hidrogênio, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos, exceto nos eritrócitos e ter pouca afinidade pelo peróxido de hidrogênio comparado a glutationa peroxidase, a catalase se torna mais importante em condições que ocorram a formação de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, como por exemplo, no fígado e nas hemácias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que desempenha papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na

remoção do radical ânion superóxido.. Há duas formas dessa enzima nas células eucarióticas: a forma que contém cobre e zinco, denominada de superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZn-SOD), é muito estável e parece estar presente no citoplasma de praticamente todas as células de plantas e animais. A outra forma, dependente de manganês (Mn-SOD) é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando um átomo de manganês por subunidade. A atividade da MnSOD em relação a CuZnSOD depende do tecido e das espécies onde atuam (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

5 **JUSTIFICATIVA**

Considerando o crescente consumo global de produtos derivados de plantas, incentivado pela mídia sob o argumento de por ser natural é inócuo e oferecer benéficios supostamente comprovados, o presente trabalho pretende avaliar a ação fototóxica de um extrato comercial de *Aloe vera* (L.) Burm. f.,planta amplamente utilizada pela população em geral.

Aloe vera,ou babosa, é uma planta suculenta que tem uma distribuição global e compõe diversos produtos cosméticos e alimentos. A planta é bem popular e o gel da folha é utilizado de forma empíricapara tratamento capilar, queimaduras e como cicatrizante. Além disso, diversas farmácias de manipulação, fabricam o extrato glicólico de *Aloe vera*comercial para incorporar em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em xampus, géis, cremes para banho, loção de limpeza, filtros solares e outros produtos cosméticos (HAMMAN, 2008).

O extrato é rotulado e sugerida a dosagem eficiente para a preparação cosmética, apontando benefícios como ação cicatrizante, tonificante, antiinflamatória, suavizante, lenitiva, refrescante, hidratante, protetora e restauradora de tecidos. Em 16 de novembro de 2011, a ANVISA liberou o Informe Técnico Nº47 (ANVISA, 2011) proibindo a importação, comercialização e consumo de produtos que contenham *Aloe vera* para uso oral, devido à ausência de informações suficientes quanto a sua segurança, como alimento. Isso demonstra que não há, ainda, dados suficientes na literatura sobre os efeitos benéficos e/ou nocivos que essa planta pode apresentar, bem como de seus princípios ativos, quando utilizados isoladamente.

Embora o consumo oral tenha sido proibido no Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a incorporação de *Aloe vera*como componente na fabricação de uma variedade de produtos cosméticos já citados acima. Alguns autores têm demonstrado que componentes do gel da folha de *Aloe vera* contêm propriedades fotoquímicas que, na presença de radiação ultravioleta A, seriam responsáveis por efeitos nocivos (WAMER et al., 2003; XIA et al., 2007).

Dentre os componentes presentes no gel da planta, se destacam as antraquinonas, que têm sido apontadas como capazes de absorver a radiação UV e produzir ERO potencializando, portanto, os efeitos tóxicos, via oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e outras moléculas importantes do metabolismo(XIA et al., 2007). Recentemente foi verificado

que a atividade tóxica de uma antraquinona (emodina) em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e em diferentes cepas de *Escherichia coli*foi potencializada pela presença da radiação UV, indicando que a interação de antraquinonas com radiação UV pode ser responsável por uma série de efeitos biológicos nocivos (BHERING, 2012).

Por isso, o presente trabalho busca avaliar a toxicidade do extrato glicólico de *Aloe vera*, e sua associação com a radiação UVA em células eucarióticas, visto que é um produto comercial utilizado na produção de cosméticos, além de realizar uma análise cromatrográfica do extrato.

6 **OBJETIVOS**

6.1**Objetivo geral**:

Avaliar a toxicidade induzida pelo extrato glicólico de *Aloe vera*, em associação com a radiação UVA, em células da linhagem A549 (adenocarcinoma de células epiteliais basais alveolares humanas).

6.2 **Objetivos específicos**:

a) Determinar a citotoxicidade do extrato glicólico comercial de *Aloe vera* em células eucarióticas, através dos ensaios de proliferação por WST-1 e exclusão por azul de tripan;

b) Caracterizar a produção de espécies reativas de oxigênio nas amostras com o extrato e com sua associação à radiação UVA pormarcação de estresse oxidativo com DCFDA (*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*);

c) Determinar a presença de emodina no extrato comercial de *Aloe vera* por cromatrografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

d) Avaliar o perfil espectofotométrico (UV-Visível) do extrato comercial de *Aloe vera*, antes e após sua associação com a radiação UVA.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Linhagens celular A549

As células escolhidas para o estudo são da linhagem A549 (adenocarcinoma de células epiteliais basais alveolares humanas). As células foram cultivadas em meio HAM F12 (10% de soro fetal bovino – SFB) com anfotericina B e gentamicina, em garrafas de 25 mm^3, à temperatura de 37ºC e atmosfera contendo 5% de CO_2. O meio e as condições de cultivo foram retirados e seguidos de acordo com o site ATCC.[3]

7.2 Cultivo celular

Para dar inicio ao cultivo células, um tubo do tipo criotubo (2mL) contendo células A549 e armazenado em nitrogênio líquido, foi descongelado em água ultrapura (37ºC) e o conteúdo transferido para um tubo do tipo *falcon* (15 mL) que foi centrifugado (200*g*, 5 min – Eppendorf modelo 5804R) e o sobrenadante desprezado. Após isso, foi adicionado PBS para lavagem e o tubo novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado para retirada de qualquer resíduo de DMSO, um crioprotetor usado para o congelamento das células.

Após a realização dessas etapas, um volume de 10mL de meio HAM F12 suplementado com SFB 20%, foi adicionado ao tubo do tipo *falcon* com o precipitado (pellet), suavemente agitado para suspensão das células e vertido para uma garrafa de cultivo celular (25 mm^3), que foi mantida 24 horas na estufa (37ºC, 5% de CO_2). Ao final desse tempo, o meio nutritivo foi retirado e um volume de 10mL de meio HAM F12 fresco com SFB 10% foi adicionado. Em seguida, a garrafa foi colocada novamente na estufa para ampliar o número de células, formando uma monocamada celular.

---

[3] Retirado do site: https://www.atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx#

Quando a garrafa atingia uma densidade célular de 80% de sua área, o meio de cultura era trocado para repor os nutrientes e eliminar os excretas celulares. Ao atingir o estágio de confluência desejado, foram adicionados PBS para limpeza da garrafa e 3mL de tripsina (0,1% tripsina e 0,01% EDTA), sendo levada para estufa (4min, 37ºC, 5% de CO_2). Após o isolamento das células, visualizado por meio de microscópio invertido, um volume de 5mL de meio nutriente suplementado com SFB 10% era adicionado. Todo o volume era então transferido para um tubo do tipo *falcon* (15mL) e levado à centrifuga (200*g*, 8 min). O sobrenadante era eliminado e o pellet era usado para contagem do número de células.

Para contagem do número de células, 2mL de meio de cultura HAM F12 era adicionado ao tubo do tipo *falcon* (15mL) que continha o pellet. Uma alíquota (10µL) era retirada e diluída com 90µL de Azul de tripan. O número de células era determinado em câmara de Neubauer com o auxílio do microscópio invertido.

7.3**Curvas de crescimento para padronização do número de células**

Após obter e determinar o número total de células conforme descrito no item 6.3, suspensões correspondentes às concentrações de 3, 5, 10, 15, 20 e 30 x 10^3 células por poçoforam semeadas em microplaca de 96 poços. As células foram mantidas em estufa (37ºC; 5% CO_2), por 72 horas para avaliar o crescimento das células em poços de 0,33cm². O crescimento foi visualizado por microscópio invertido e determinado pela confluência (densidade celular) observada em 24, 48 e 72 horas.

7.4 **Padronizações do ensaio de proliferação WST-1**

O Ensaio de proliferação por WST-1 (KOYANAGI, KAWAKABE & ARIMURA, 2015) é uma técnica colorimétrica que avalia o metabolismo celular, medindo, de forma indireta, a viabilidade das células.

A técnica é baseada na clivagem do WST-1 (sal de tetrazólio) por desidrogenases mitocondriais (succinato – tetrazólio redutase) e é uma medida de avaliação da respiração celular e consequentemente da taxa metabólica.

O produto originado da reação entre as células e o WST-1 é o formazan, que tem cor amarelo-alaranjado, é estável e quantificado a 450 nm, utilizando um leitor de placa ELISA (Leitor de microplacas da polaris, Celer).

O ensaio foi padronizado de acordo com a as especificações da *Roche Applied Science* (Manual Versão 16/ Fevereiro de 2011 – *Cell Proliferation Reagent* WST-1)[4] e dividido em duas etapas.

7.4.1 Avaliações da cinética do metabolismo do WST-1 na linhagem A549 e do tempo de incubação do WST-1.

De acordo com o fabricante, algumas etapas do ensaio necessitam ser padronizadas para cada linhagem celular utilizada. Otempo de incubação adequado, após a adição do reagente WST-1e a cinética do metabolismo do reagente (sensibilidade da concentração celular ao ensaio) podem variar de acordo com a configuração individual do experimento. Por isso, para fins de padronização, suspensões de células A549 correspondentes às concentrações 3, 5, 10, 15, 20 e 30 x 10^3 células por poço foram semeadas em placas de 96 poços durante 72 horas. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas foi adicionado 10 µl de solução WST-1 (2 µl de reagente WST-1 e 8 µl de meio HAM F12) sendo em seguida incubadas em estufa durante 4 horas a 37 °C e 5% de CO_2. A cada 30 minutos foi realizada uma medida da absorbância a 450 nm, de acordo com recomendações do fabricante.

7.4.2 Determinação da absorbância do branco da reação e das proporções do extrato.

Como o ensaio de proliferação por WST-1 é uma metodologia colorimétrica, foi determinada a absorbância do branco da reação (solução de referência) e das proporções do extrato. A leitura da absorbância do branco foi determinada adicionando-se 10 µL de solução WST-1 (diluído 5x - 2 µL de WST-1 + 8 µLde meio HAM F12) em 100µL de meio HAM F12. A absorbância do extrato e de suas proporções foram determinadas adicionando-se 10

[4] Disponível em: http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-2/J2-2.pdf

µL de solução WST-1 em 100µL do extrato (100%) e em 100 µL das seguintes proporções do extrato em meio HAM F12 (v/v):50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; e 1,56% - Quadro 1). Os valores de absorbância obtidos nessa padronização foram utilizados como normalizadores em todos os experimentos posteriores.

Quadro 1 - Extrato glicólico de *Aloe vera* e suas proporções

Proporção do extrato (v/v)	Extrato	Meio HAM F12
100%	100 µL	0
50%	50 µL	50 µL
25%	25 µL	75 µL
12,5%	12,5 µL	87,5 µL
6,25%	6,25 µL	93,75 µL
3,12%	3,12 µL	96,88 µL
1,56%	1,56 µL	98,44 µL

7.5 **Exposições das células ao extrato glicólico de *Aloe vera* comercial**

Para exposição das células ao extrato glicólico de *Aloe vera*, foi escolhida e padronizada a concentração de $3x10^3$ células por poço, semeadas, previamente, por 48 horas. Os poços foram divididos em grupos controle, controle positivo e expostos ao extrato (50%, 25%, 12,5%, 6,25% , 3,13% e 1,56%). Cada amostra foi preparada em triplicata, contendo $3x10^3$ células por poço.

Após 48 horas na estufa (37ºC, 5% de CO_2),omeionutritivoeraretirado de todos os poços,e adicionado meio nutriente fresco nas amostras controle e meio acrescido de diferentes proporções de extrato de *Aloe vera* nas demais amostras. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – 8mM em meio HAM F12) foi usado como controle positivo e o volume final em cada poço era de 100µL.

As células permaneciam na estufa por 2, 6, 12, 24 e 48 horas e, ao final de cada um destes períodos, 10 µL desolução WST-1 era adicionado aos poços para determinar a viabilidade celular. Após 1 hora de reação, a absorbância era lida em um leitor de microplacas

(Leitor de microplacas polaris, Celer), a 450 nm e descontados os valores de absorbância do branco e das proporções do extrato, determinadas conforme o ítem 6.5.2. Foram realizados 4 experimentos independentes.

7.6 **Condições de iluminação com radiação ultravioleta A (UVA – 365 nm)**

Para o tratamento com a radiação UVA foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio 125 W (Philips), emitindo mais de 95% dos fótons em 365 nm. A taxa de dose foi ajustada com dosímetro Vilbert Lourmat VLX 365 para 10J/m²/s (taxa de dose que atinge a superfície do planeta em um dia de verão no hemisfério sul). As células foram iluminadas durante 30 minutos (dose total 18kJ/m²), 1 hora (36kJ/m²), 1 hora e 30 minutos (54kJ/m²) e 2 horas (72kJ/m²).

7.7 **Exposições das células ao extrato glicólico de *Aloe vera* comercial em associação com a radiação UVA.**

Para exposição das células ao extrato de *Aloe vera* em associação com UVA, foi escolhida a concentração de $3x10^3$ células por poço, semeadas previamente por 48 horas. Os poços foram divididos em 4 grupos: controle, exposto ao UVA , exposto diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera* (12,5%, 6,25% , 3,13% e 1,56%) e exposto ao extrato associado a radiação UVA. Cada amostra foi preparada em triplicata e realizados, no mínimo, 5 experimentos independentes.

Após 48 horas na estufa (37ºC, 5% de CO_2),omeionutritivoeraretirado de todos os poços,e adicionado meio fresco nos grupos controle e exposto ao UVA e meio acrescido de extrato vegetal, nas diferentes proporções citadas acima, nas demais amostras. O volume final em cada poço era ajustado para 100µL e, em seguida, as amostras eram iluminadas, ou não, com radiação UVA por diferentes períodos de tempo.Ao final de cada período de exposição ao UVA (30 min, 1h, 1h30 e 2h) a viabilidade celular era determinada pela técnica do WST-1, adicionando-se 10 µL de solução WST-1 aos poços de cada grupo,a absorbância era lida a

450 nm, descontados os valores de absorbância do branco e das proporções do extrato, determinadas conforme o ítem 5.5.2.

7.8**Exposição da linhagem A549 a diferentes taxas de dose de UVA**

Para exposição das células a taxas de dose crescentes de UVA (4J/m²/s, 8J/m²/s e 12,5J/m²/s) foi escolhida a concentração de $3x10^3$ células por poço, semeadas previamente por 48 horas. As condições de iluminação foram realizadas conforme o ítem 6.7 e a viabilidade celular após a exposição ao UV determinada pela metodologia do WST-1

As amostras foram preparadas em triplicata em microplacas e após 48 horas de incubação em estufa, as células foram expostas à radiação UVA por 30 minutos, em diferentes taxas de dose. Assim que as microplacas eram retirados da fonte de iluminação, o meio celular era trocado, adicionado 10 µL de solução WST-1 e então era lida a absorbância em 450 nm.

7.9 **Ensaio de exclusão por Azul de Tripan**

O ensaio do Azul de tripan (STROBER, 2015) é uma técnica comumente utilizada para análise de citotoxicidade de determinado agente, uma vez que ele possibilita a visualização de células que perdem a seletividade da membrana plasmática e não expulsam o corante para fora da célula, conferindo a elas uma cor azulada, permitindo, portanto, uma estimativa da viabilidade celular.

A metodologia de viabilidade pelo azul de tripan foi realizada conforme o item 5.6, com uma modificação: as proporções do extrato de *Aloe vera* utilizadas foram 50, 12,5 e 6,25% (v/v).

Imediatamente após realizar a leitura da absorbância no leitor de microplacas pela metodologia do WST-1, o meio foi retirado completamente, e em seguida foi adicionado 50 µL de tripsina (0,1% tripsina e 0,01% EDTA), e a placa levada para estufa (10min, 37ºC, 5% de CO_2). Após o isolamento das células, visualizado por meio de microscópio invertido, uma alíquota de de Meio HAM F12 com 10% de soro fetal bovino (60 µL) foi adicionado para

inativar a tripsina. O volume total foi transferido para um tubo tipo *eppendorf* (2 mL) e centrifugado por 5 minutos em 200g (MiniSpin plus® - Eppendorf). O sobrenadante era descartado,20 µL de meio HAM F12 adicionado e o tubo era suavemente agitado para suspensão das células. Em seguida, um volume de 20µL de Azul de tripan foi adicionado. Essa mistura foi homogeneizada e transferida para uma Câmara de Neubauer e analisada em microscópio otico, utilizando objetiva de 40x, a fim de verificar a viabilidade celular imediatamente após os tempos de 30 minutos, 1hora, 1 hora e 30 minutos e 2 horas de exposição ao extrato de *Aloe Vera* e à radiação UVA, associados ou não. A viabilidade por WST-1 e exclusão de azul de tripan também foram avaliadas após 24horas da exposição, porém, logo após o tratamento o meio de todos os poços foi trocado.

7.10 **Marcação de estresse oxidativo com DCFDA(*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*)**

A linhagem A549 foi semeada em placa de 24 poços e tratadacom a proporção de extrato glicólico de *Aloe vera* de 12,5%(v/v), associado ou não à radiação UVA por 1 hora (10J/m²/s).

Ao final do tratamento, as células foram soltas por tripsinização, ressuspensas em meio de cultura e, em seguida, centrifugada a 1500rpm, 25ºC, por 5min. Após isso, uma contagem de células era realizada e a concentração de 10^5células era transferida para tubos FACS (tubos de poliestireno – 5 mL, 12x75 mm). Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Após secagem total do tubo, o pellet foi dissolvido e em seguida foi adicionado 10uL dE DCFDA (*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*, um corante fluorogênico que mede a atividade de espécies reativas de oxigênio-Invitrogen).

Depois da difusão para a célula, o reagente DCFDA é desacetilado por esterases celulares a um composto não fluorescente, que é posteriormente oxidado por diferentes ERO em 2',7' -dichlorofluorescein (DCF). O DCF é um composto altamente fluorescente, que pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, com excitação máxima e emissão de comprimento de onda em 495nm e 529nm respectivamente. Após 10 minutos protegidos da luz em temperatura ambiente, devido a fotosensibilidade do DCFDA, 500µL de PBS foi adicionado a solução(adaptado de LEBEL, ISCHIROPOULOS& BONDY., 1992) . A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, utilizando o software CellQuestTM

7.11**Avaliação do extrato glicólico de *Aloe vera* por espectrofotometria.**

Alíquotas do extrato glocólico de *Aloe vera* (200 µL), nas concentrações de 100, 50, 12,5% e 6,25% (v/v), foram lidas em espectrofotômetro(Shimadzu UV-160 A), na faixa espectral de 200 a 800 nm, para obtenção dos espectros de absorção. Essas mesmas proporções de extrato glicólico de *Aloe vera* e o meio HAM-F12 foram expostos a radiação UVA (10J/m²/s) por 2 horas e foi realizada uma análise espectrofotométrica 2 e 24 horas após a exposição. A solução padrão de emodina, 1,5 mM em etanol 50% (SIGMA-ALDRICH), também foi lida na mesma faixa espectral (PASCHOAl *et al*., 2003).

7.12 **Análise por cromatrografia líquida de alta eficiência(CLAE).**

A análise cromatrografica do extrato glicólico de *Aloe vera* foi realizada segundo GUO et al. (2014) com adaptações . O extrato glicólico puro e um padrão de emodina (10ppm) foram injetados automaticamente numa coluna fase reversa C18 -Lichrospher 100 RP 18 5µm (25x4mm) Lichrocart Merck-. O fluxo da coluna foi de 1 mL/min e o extrato glicólico foi acompanhado no detector DAD(UV-VIS)monitorado em 254 e 420 nm. O solvente utilizado foi Metanol 100% marca Tedia - grau HPLC/Spectro(bombeamento isocrático). O HPLC usado foi da marca Agilent Technologies 120 Infinity com detector DAD modelo DEAA1260ALS com bomba binária. A temperatura do forno foi 25ºC.

7.13 **Composição do meio de cultura e soluções empregadas no estudo**

As soluções utilizadas para cultivo e manutenção celular estão listadas abaixo:

Quadro 2 - Composição do meio de cultura e soluções empregadas para o cultivo celular (continua)

Soluções e Meios	Composição/Concentração	Procedência
Meio de cultura HAM F-12	Pó para preparo Bicarbonato de Sódio 2,2g/L Água ultrapura pH 7,2	CULTILAB
Soro Fetal Bovino Estéril	Soro fetal 10% pH7,2	CRIPION
Gentamicina 5mg/mL	Gentamicina 1mL Água ultrapura qsp 100mL	CULTILAB
Glutamina 25mg/mL	Glutamina 1mL Água ultrapura qsp 100mL	CULTILAB
Anfotericina B 25mg/mL	Anfotericina B 1mL% Água ultrapura qsp 100 mL	CULTILAB
Tripsina EDTA	Tripsina 0,1% EDTA 0,01% Base 10x Dulbecco 10% (NaCl 8%; KCl 0,3%; Na_2PO_4 $7H_2O$ 0,14% KH_2PO_4 0,02%) Solução Vermelho de Fenol 1% Água ultrapura qsp 100mL	SIGMA LAFAN
Tampão Fosfato	NaCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4	LABORCLIN

Quadro 2 - Composição do meio de cultura e soluções empregadas para o cultivo celular (conclusão)

Salino (PBS)	Reconstituir 1 frasco em 1000mL de Água Ultrapura	
Azul de Tripan	Azul de Tripan 1% PBS	INLAB LABORCLIN
Solução de Congelamento	Dimetilsulfóxido 5% Soro fetal Bovino 95%	VETEC CRIPION

8 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

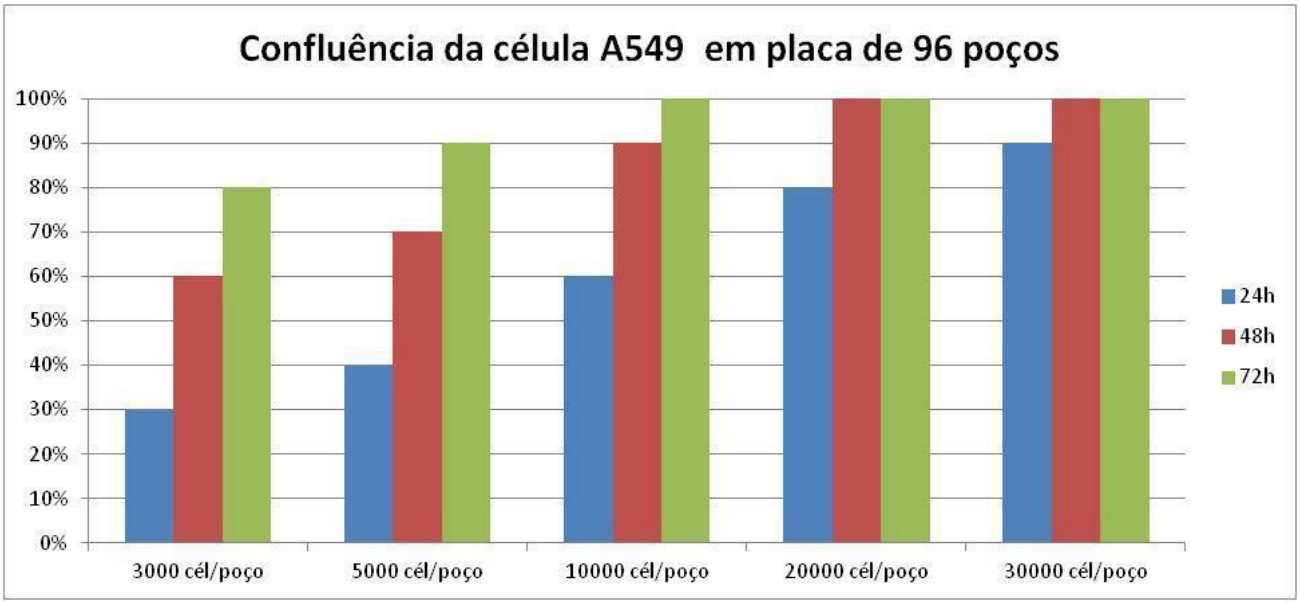
Os dados obtidos durante a realização do presente trabalho foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, tendo se mostrados aptos para serem analisados por testes paramétricos. Assim, o teste ANOVA *oneway*, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, foram aplicados nas situações experimentais onde se comparava o efeito da exposição somente à *Aloe vera* ou sua associação com UVA, em relação a cada tempo testado e, depois, em relação a concentrações testadas e seus respectivos controles. Em ambas as situações foram consideradas significativas as diferenças para valores de $p<0,05$. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes. Os testes estatísticos foram executados no software GraphPadPrism 4.

9 **RESULTADOS**

9.1 **Padronizações do cultivo da linhagem celular A549 em placa de 96 poços.**

Para inicar o trabalho com a linhagem A549, foi avaliado o crescimento e a confluência das células na microplaca de 96 poços durante 24, 48 e 72 horas, nas concentrações 3, 5, 10, 20, 30 x 10^3 células por poço. Uma curva de crescimento foi montada pela observação em microscópio óptico . Os resultados estão apresentados na figura 6.

Figura 6 - Confluência da linhagem A549 em meio HAM F12 com 10% de soro fetal bovino em microplacas de 96 poços.



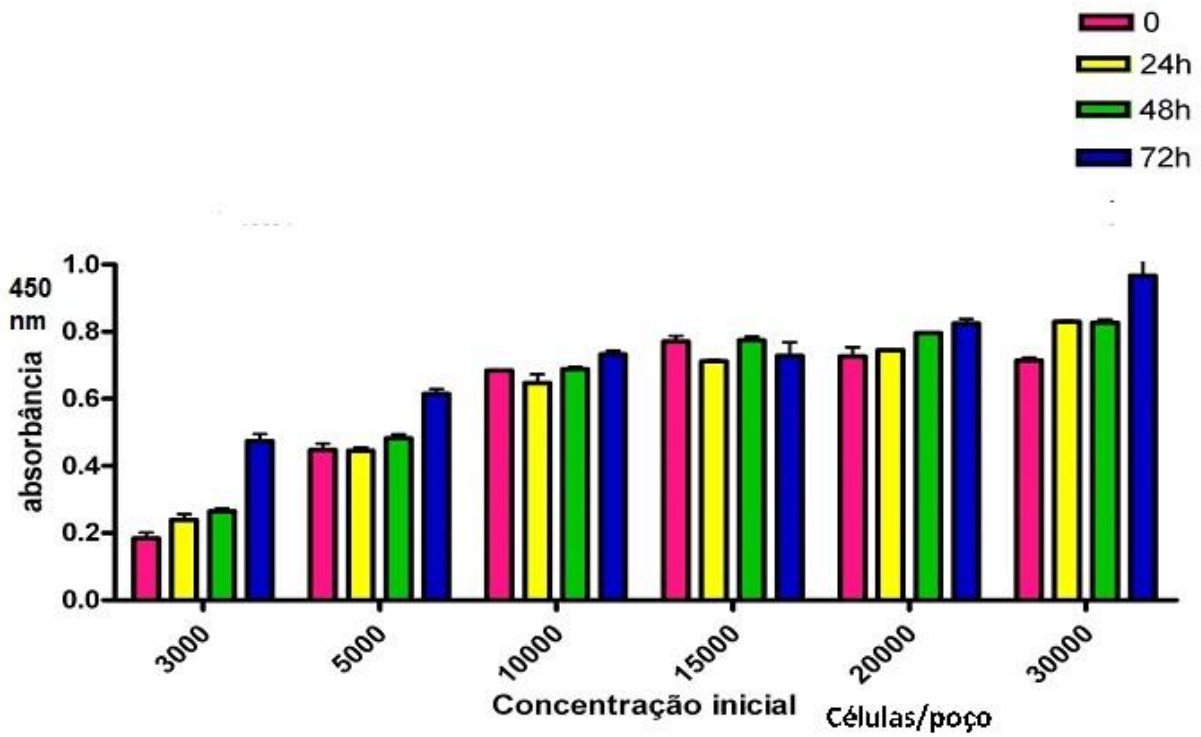
A concentração de 3x10^3 células por poço apresentou uma confluência de 30% em 24horas, 60% em 48horas e 80% em 72horas.O resultado demonstra que a concentração de 3x10^3 células/poço foi a mais indicada para semear células em microplacas de 96 poços pois apresentou uma confluência de aproximadamente 60% após as 48horas de cultivo e após isso poderiam ser tratadas com os agentes.

9.2 **Padronização do ensaio do WST-1.**

A padronização do ensaio de proliferação do WST-1 foi realizada em 2 etapas, seguindo o protocolo do fabricante, laboratório Roche.

Na primeira etapa, que consiste em avaliar a metabolização do reagente na concentração celular utilizada, foram testadas as concentrações 3, 5, 10, 15, 20 e 30 x 10^3 células por poço que permaneceram por, até, 72horas na estufa (37ºC; 5% CO2). Após 24, 48 e 72horas, 10 µL de solução WST-1 foram adicionadosaos poços correspondentes, para serem lidos após 1 hora em leitor de placa de ELISA, a 450 nm. Os resultados estão apresentados na figura 7.

Figura 7 - Padronização da cinética do metabolismo do WST-1 nas concentrações celulares de 3, 5, 10, 15, 20 e 30 x 10^3 células/poço da linhagem A549 para avaliação de viabilidade.

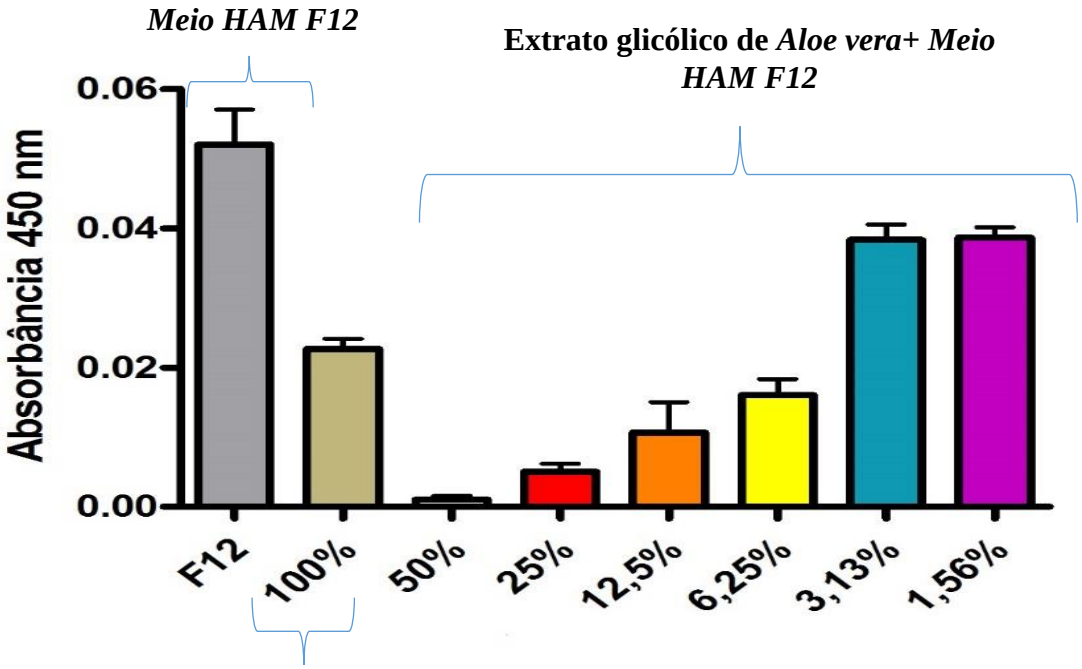


A concentração de 3x10^3 células por poço apresentou uma absorbância de ± 0.190 após adesão na placa(tempo 0), em 24horas ± 0,220, em 48horas ± 0,240 e em 72horas ± 0,500. O resultado demonstra que a concentração de 3x10^3 células/poço, se mostrou a mais

indicada para realização do ensaio de proliferação WST-1, devido a sensibilidade da concentraçãoao método e por ser obtido de forma mais rápida.

Em seguida, com o objetivo de verificar se o meio e as proporções do extrato interferiam na leitura espectrofotométrica,foi determinada a absorbância do branco da reação(Meio HAM F12+WST-1) e do extrato glicólico de *Aloe vera* nas proporções de (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% e 1,56% +WST-1) em leitor de plascas de ELISA por uma metodologia espectofotometrica. Os resultados obtidos encontram-se na figura 8.

Figura 8 - Determinação da absorbância do branco da reação (meio HAMF12) e das diferentes concentrações de extrato de *Aloe vera* através do ensaio WST-1.

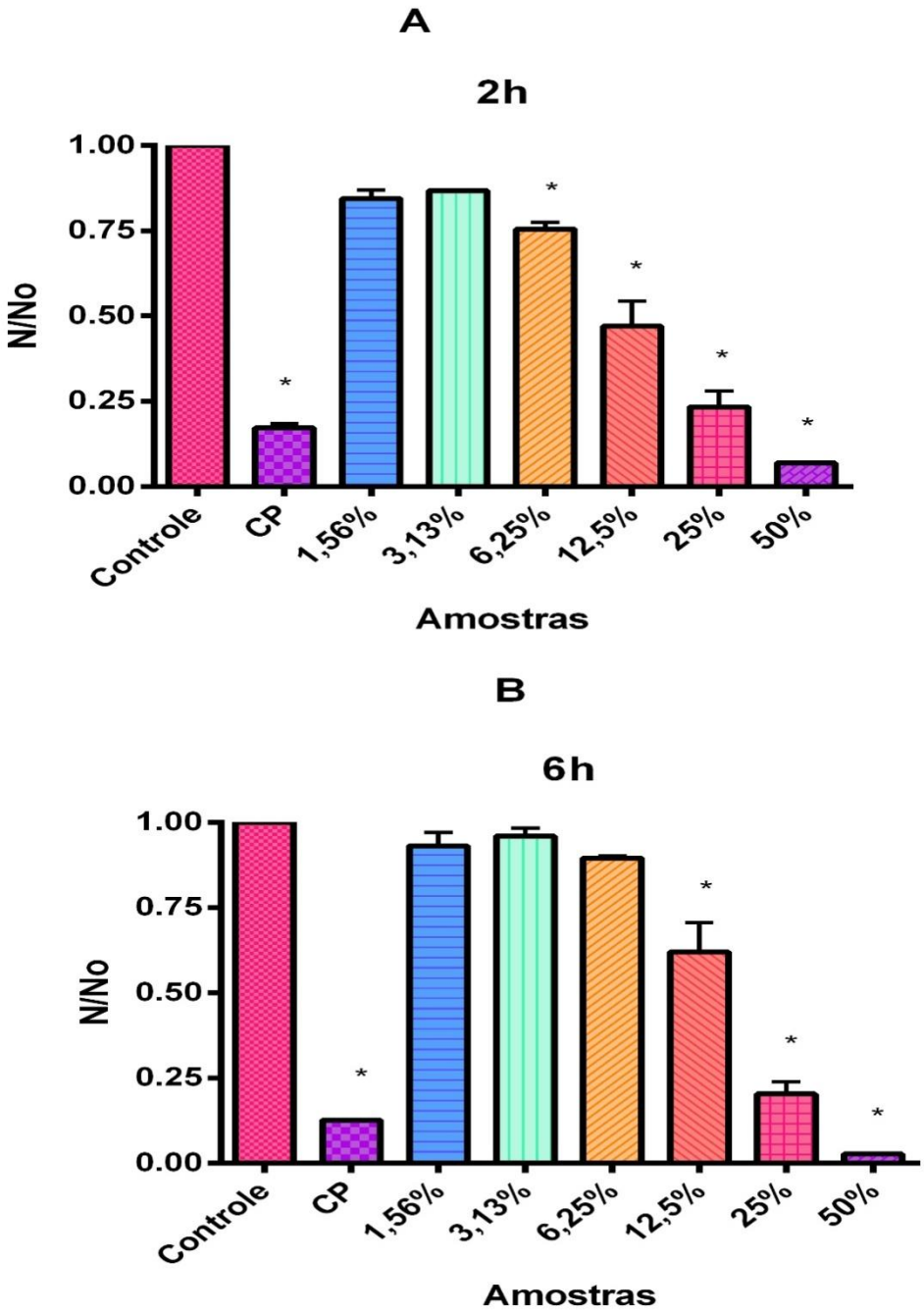


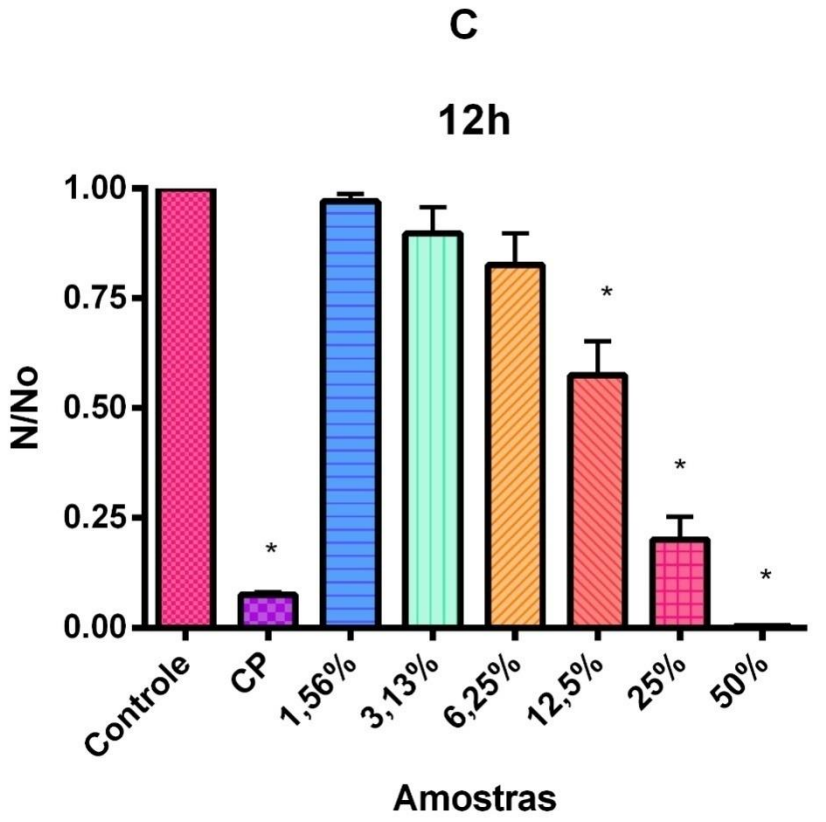
O resultado demonstra que o meio HAM F12 (média da absorbância = 0,052) e as proporções do extrato utilizadas no experimento (média da absorbância: 50% = 0,001; 25% = 0,005; 12,5% = 0,011; 6,25% = 0,016; 3,13% = 0,038; e 1,56% = 0,039) absorvem no comprimento de onda de 450nm e, por isso, podem interferir na leitura espectrofotométrica da reação do controle (Células+Meio HAM F12) e das amostras expostas ao extrato (Célula+Extrato em diferentes proporções), mesmo com os valores de absorção encontrados sendo baixos.

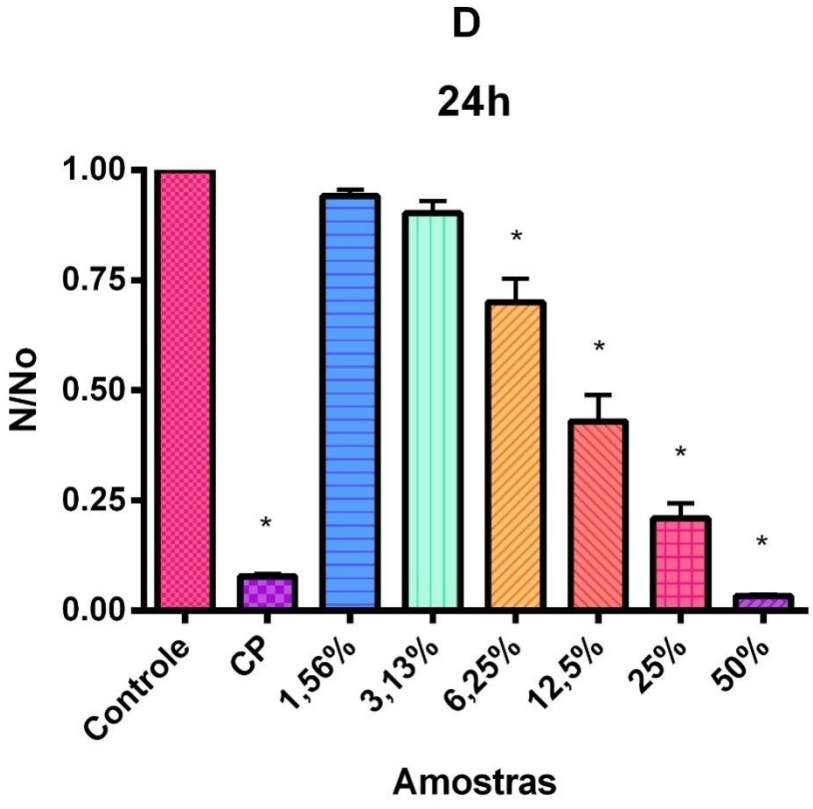
9.3 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de Aloe vera**

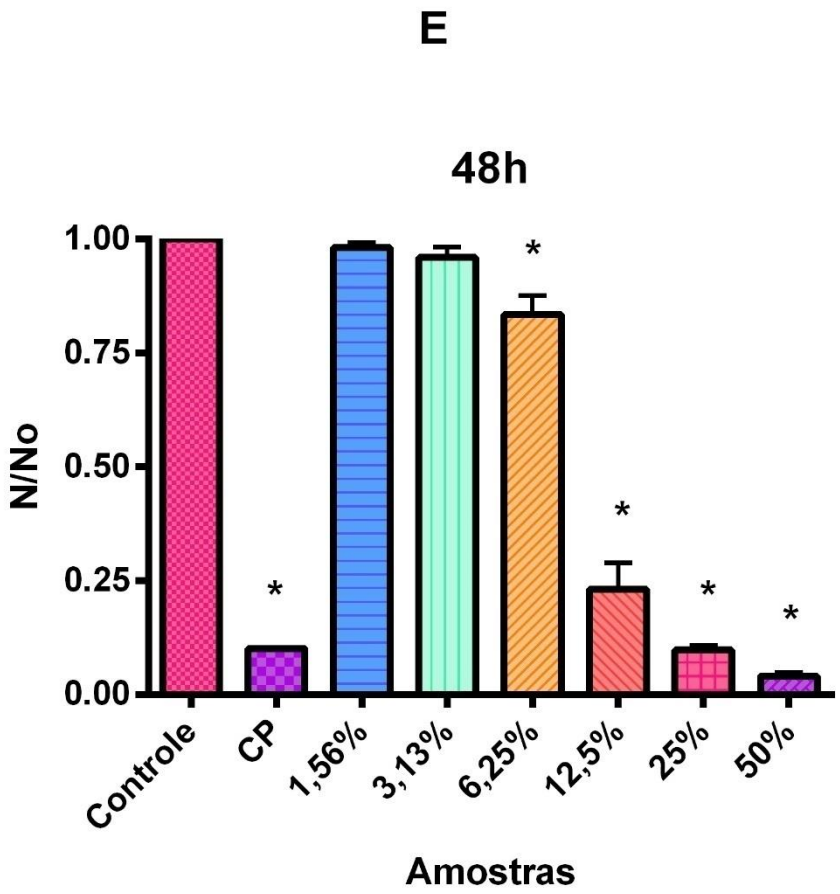
Para avaliação da citotoxicidade do extrato glicólico de *Aloe vera*, foi utilizada a metodologia de proliferação por WST-1, em que as células da linhagem A549 foram expostas durante os tempos 2, 6, 12, 24 e 48 horas, nas proporções de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56% de extrato comercial de *Aloe vera*, em meio F12. Ao final de cada período de incubação era adicionado corante WST-1 à amostra para determinação da viabilidade celular. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio, na concentração de 8mM. Os resultados estão apresentados na figura 9.

Figura 9 - Viabilidade da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* por 48 horas, através do ensaio WST-1.




C
12h
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
N/No
*
Controle
CP
1,56%
3,13%
6,25%
12,5%
25%
50%
Amostras


D
24h
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
N/No
*
Controle
CP
1,56%
3,13%
6,25%
12,5%
25%
50%
Amostras



Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 nas proporções 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% e 1,56 nos tempos 2 horas(A), 6horas(B), 12 horas(C), 24 horas(D) e 48 horas(E) através do ensaio WST-1. Controle positivo(CP) (Peróxido de hidrogênio -8mM) e Controle (meio HAM F12).N/N0=Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.Valores que diferem estatisticamente do controle (*p<0,05- Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey)

Os resultados apontam para ausência de efeito tóxico do extrato, nas proporções 1,56% e 3,13%, durante as 48horas de exposição, uma vez que essas amostras não mostraram diferença na viabilidade em relação ao controle (p>0,05).

A amostra incubada com o extrato vegetal na proporção de 6,25% apresentou resultado inesperado. Houve diferença significativa na viabilidade, em relação ao controle, após 2 horas de exposição (p<0,05), porém as amostras incubadas por 6 e 12 horas não apresentaram diferença na viabilidade, em relação à fração controle (p>0,05). Nos tempos de 24 e 48 horas de exposição ao extrato glicólico houve, novamente, diferença significativa (p<0,05). O resultado não ficou claro nesta etapaporém repetiu-se o experimento, com esta concentração, nas etapas seguintes. (ver item 9.4).

As proporções 12,5%, 25% e 50% mostraram diferença significativa em relação ao controle, já a partir de 2 horas de exposição (p<0,05).

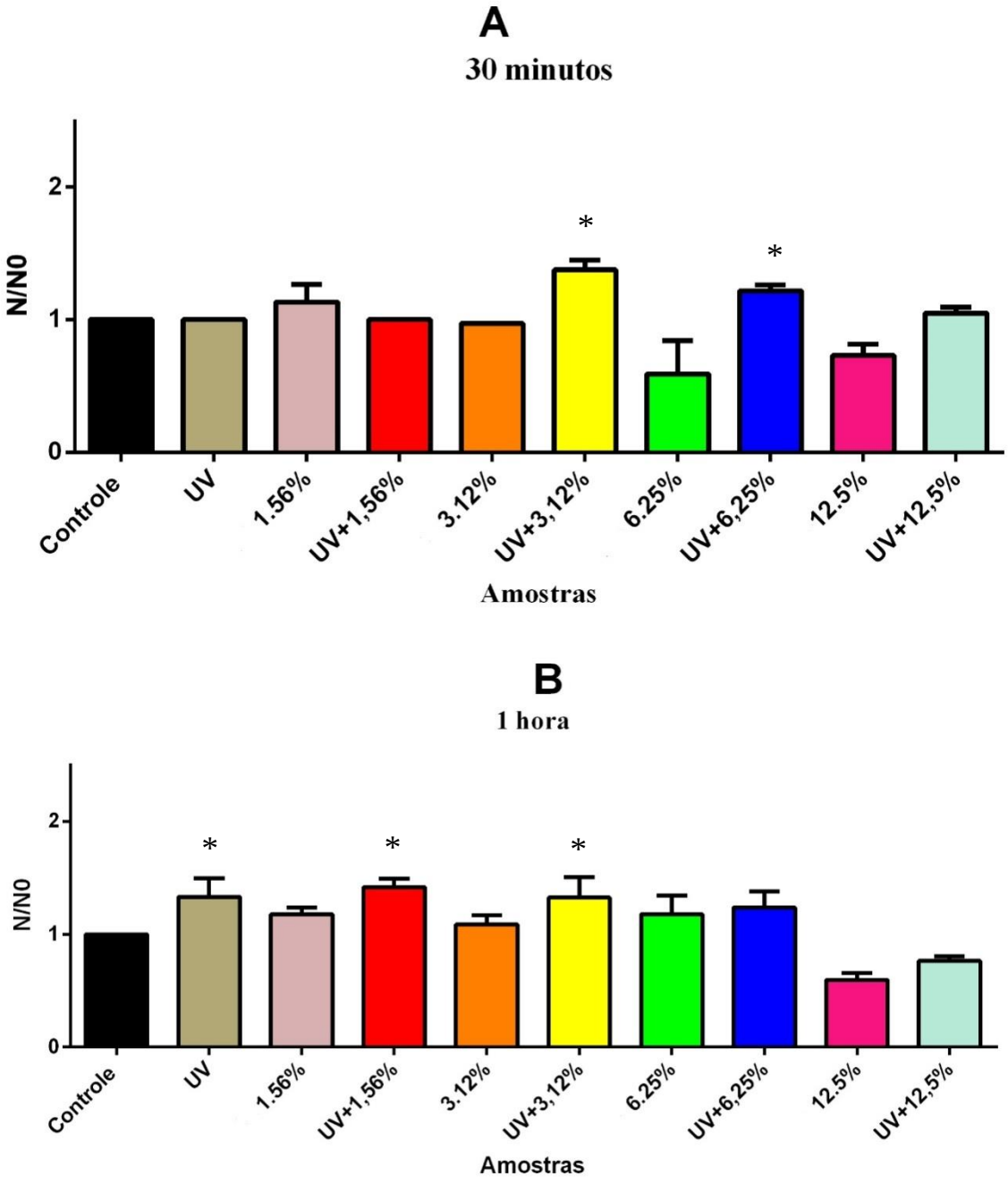
9.4 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 exposta ao extrato glicólico de *Aloe vera* associado à radiação UVA**

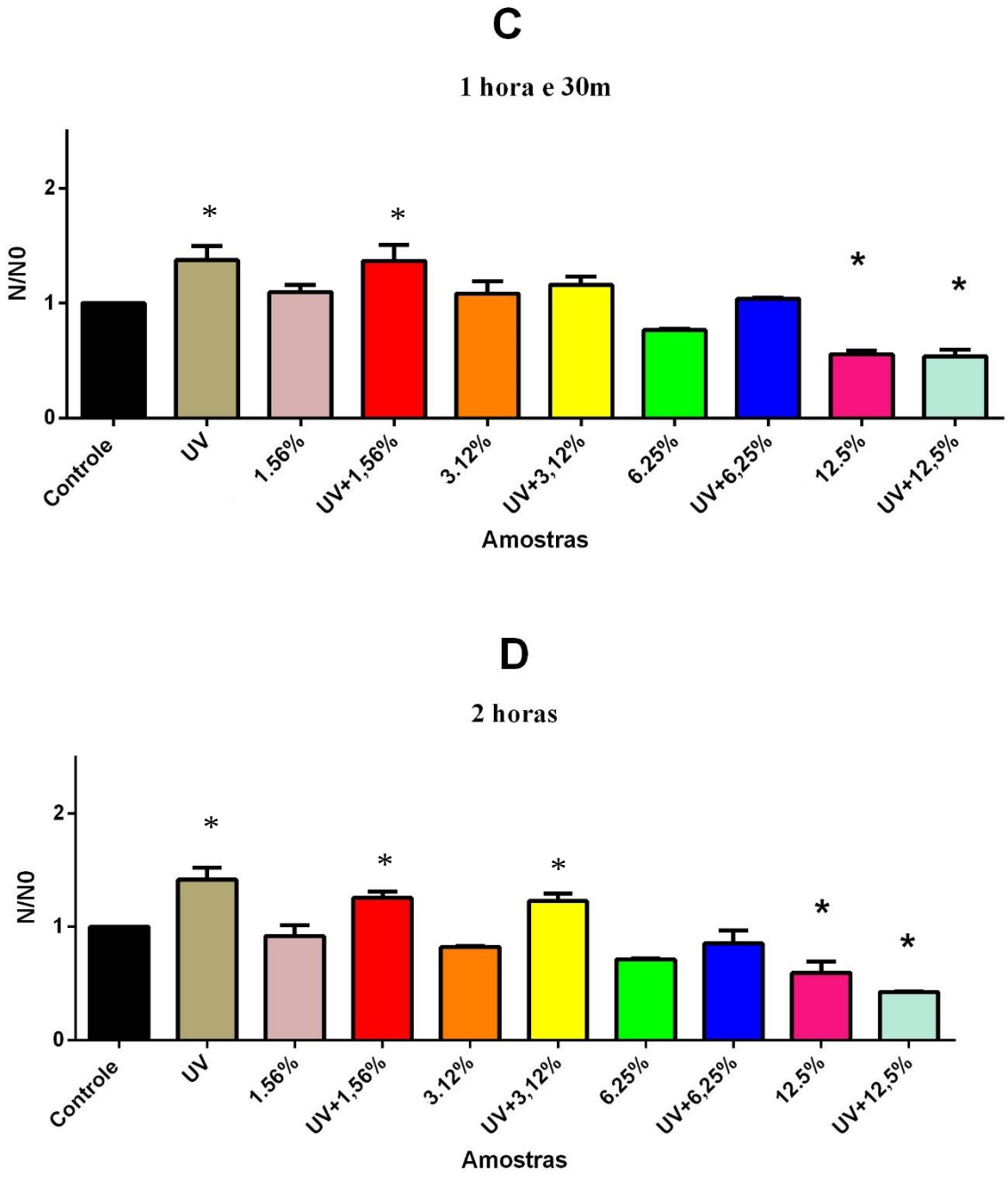
A etapa seguinte foi realizada expondo as culturas celulares ao extrato glicólico de *Aloe vera* associado à radiação ultravioleta A.

Devido aos resultados do experimento de avaliação da viabilidade celular por WST-1 apontarem que as concentrações do extrato de 25 e 50% se mostrarem tóxicas, estas não foram avaliadas nos ensaios com radiação UV. Em relação ao tempo de exposição aos raios UVA, a viabilidade celular foi medida após 30 minutos, 1 hora, 1 hora e 30 minutos e 2 horas. O objetivo foi simular uma situação cotidiana, na qual as pessoas utilizam produtos cosméticos à base de *Aloe vera* e se expõem ao Sol por algumas horas. Por isso foi utilizada no presente estudo a taxa de dose de radiação UVA de $10J/m^2/s$, escolhida por ser próxima àquela que as pessoas estão expostas em um dia de verão na cidade do Rio de Janeiro, por volta do meio dia.

Desse modo, para avaliação da citotoxicidade da associação do extrato glicólico de *Aloe vera* com UVA, células da linhagem A549, na concentração celular de $3x10^3$células/poço, foram expostas durante os tempos mencionados no parágrafo anterior, nas proporções de 12,5%, 6,25%, 3,13% e 1,56% de extrato e na taxa de dose de $10J/m^2/s$. A viabilidade celular foi determinada pelo método de proliferação por WST-1 e os resultados estão apresentados na figura 10.

Figura 10 -Viabilidade da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, por até 2horas, através do ensaio WST-1.





Legenda: Comparação das viabilidades celulares da linhagem A549 exposta ao extrato glicólico de *Aloe vera* (12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%) e UVA nos tempos 30minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2horas - 72kJ/m² (D) através do ensaio WST-1.N/N0=Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle. *Valores que diferem estatisticamente do controle. (*p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey)

A análise dos resultados sugere que as proporções 1,56%, 3,12% e 6,25% de extrato de *Aloe vera* em associação com radiação ultravioleta A não foram citotóxicas, não apresentando diferença significativa de viabilidade celular em relação ao controle, em todos os tempos de exposição testados ($p>0,05$).

A exposição das células a 12,5% do extrato glicólico de *Aloe vera*, tanto sozinha quanto na associação com UVA, a partir de 1 hora e 30 minutos, mostrou diferença entre o grupo exposto e o controle ($p<0,01$).

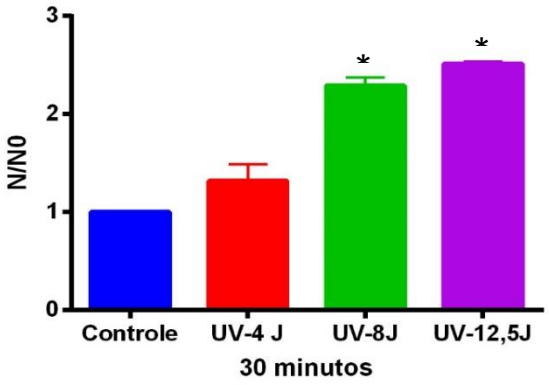
De modo inesperado, as amostras irradiadas com UVA tiveram um aumento significativo na viabilidade celular(efeito estimulatório de proliferação), avaliada pelo aumento da absorbância após metabolização do reagente WST-1. Esse aumento é mais intenso a partir de 1 hora de exposição ao UV, porém menos rigoroso na amostra incubada com 12,5% do extrato vegetal (figura 10).

Por isso, para avaliar se a radiação UVA tinha relação com o aumento da viabilidade exibida no resultado foi realizado um ensaio expondo a radiação UVA a linhagem A549.

9.5 **Avaliação da viabilidade celular da linhagem A549 exposta ao UVA**

Para verificar se a exposição ao UVA tem relação com o aumento da viabilidade medida pelo WST-1, células da linhagem A549, na concentração de $3x10^3$ por poço, foram semeadas em microplaca de 96 poços e expostas durante 30 minutos nas taxas de doses de 4J/m2/s, 8J/m2/s e 12J/m2/s. Ao final o reagente WST-1 foi adicionado nos poços e após 1hora foi lida a absorbância a 450nm. A metodologia empregada foi a de proliferação por WST-1 e os resultados estão apresentados na figura 11.

Figura 11 - Viabilidade celular da linhagem celular A549 exposta ao UVA, através do ensaio WST-1.



Legenda: Comparação da viabilidade da linhagem A549 exposta à radiação UVAnos tempos 30 minutos - 18kJ/m², nas taxas de dose4(7,2kJ/m²), 8(14,4kJ/m²) e 12,5 (22,5kJ/m²) J/m^2/s, através do ensaio WST-1. Controle da reação em azul.Valores que diferem estatisticamente do controle.N/N0= Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.(*p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey)

O experimento mostrou um aumento na viabilidade da linhagem A549, em uma relação direta com o aumento da taxa de dose de UVA utilizada. A viabilidade das células aumenta mais que o dobro ao final de 30 minutos de exposição, para as taxas de dose de 8 e 12,5 J/m^2/s(maior taxa de dose alcançada no experimento).A exposição das células na taxa de dose de 4J/m^2/s, não apresentou diferença significativa em relação ao controle (p>0,05), porém para as taxas de dose de 8 e 12,5 J/m^2/s houve diferença significativa em relação ao controle(p<0,01).

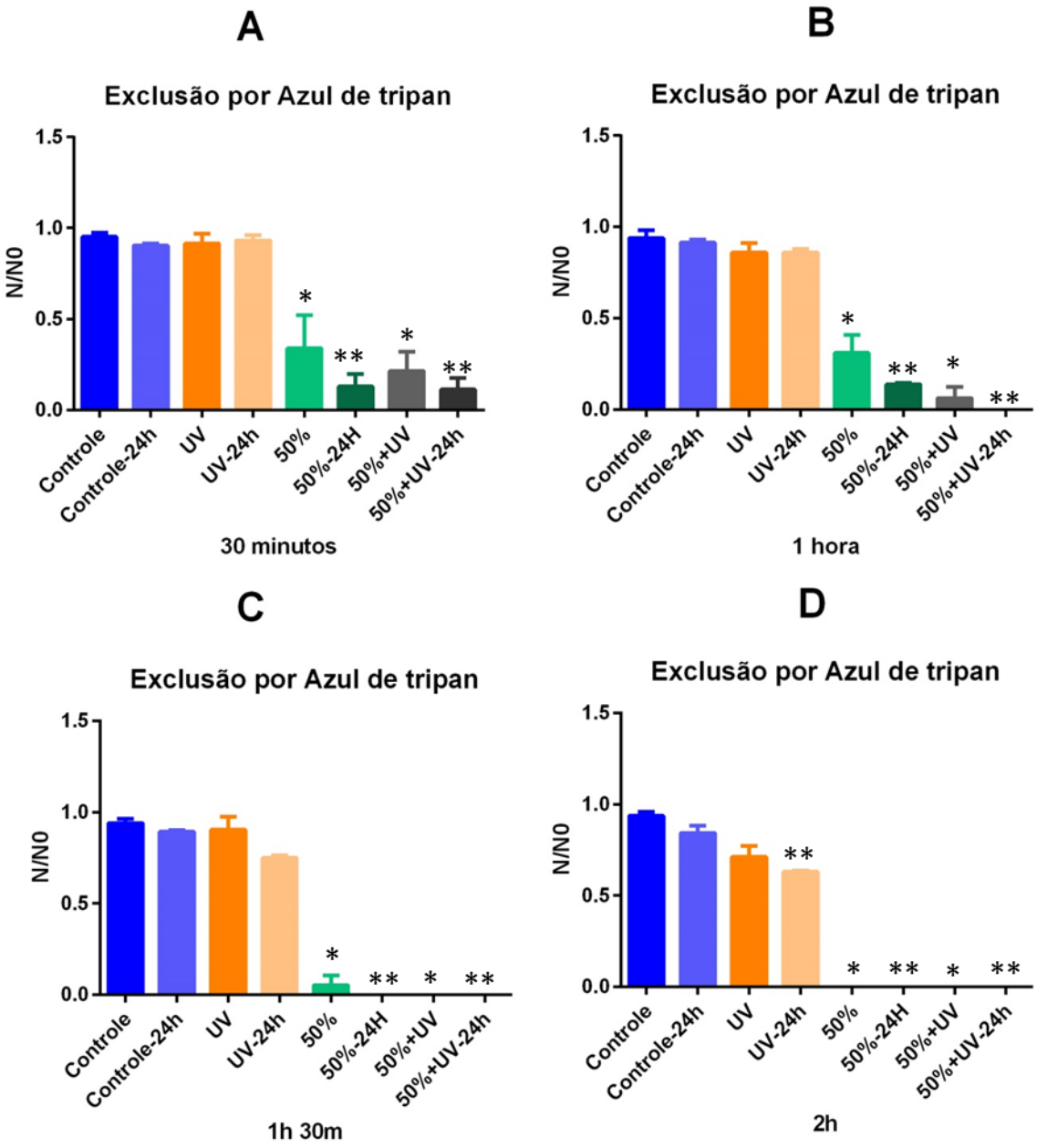
Em seguida, para descartar a hipótese de aumento da divisão celular quando as amostras eram tratadas com a associação do extrato com a radiação UVA, uma outra metodologia de avaliação de viabilidade de forma direta foi utilizada.

9.6 **Ensaio de viabilidade celular da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera* em associação com a radiação UVA pelo método de exclusão do Azul de Trypan.**

Para descartar a hipótese de divisão celular acelerada nas amostras que foram expostas ao extrato em associação com a radiação UVA, foi avaliado de forma direta o percentual de células vivas. Por isso, foi escolhida a metodologia da exclusão de azul de tripan, onde a capacidade das células em expulsar o corante (células viáveis) era avaliada em microscópio óptico e, o percentual de células vivas das amostras controle era comparado com as amostras expostas à radiação.

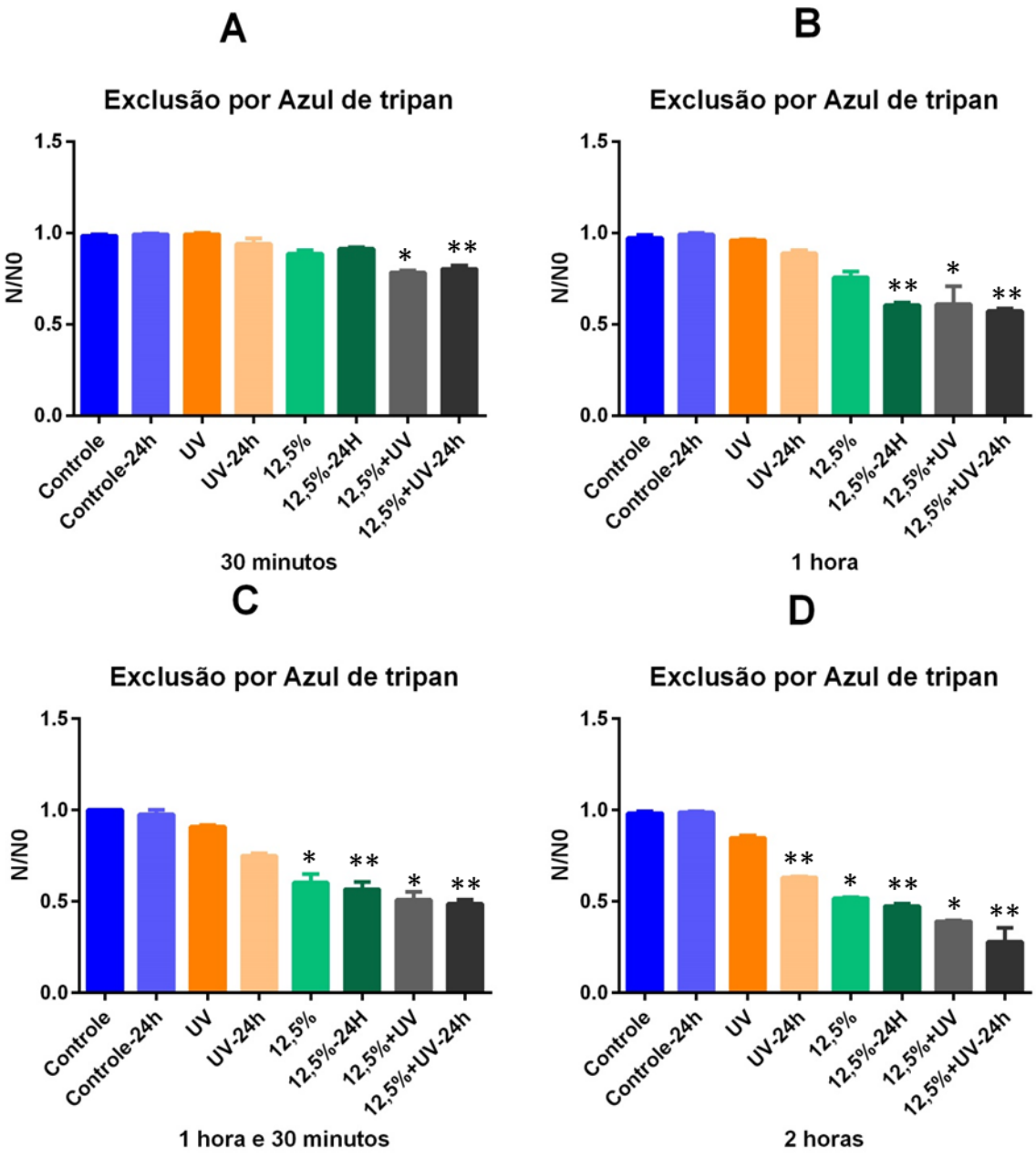
Amostras de células A549 ($3x10^3$ células por poço em meio F12) foram previamente semeadas durante 48 horas, 37 ºC e 5% CO_2, e incubadas com extrato de *Aloe vera* nas condições descritas a seguir. Como o objetivo do experimento era verificar se a metodologia da exclusão do Azul de tripan apresentaria alguma diferença em relação a metodologia do WST-1, foram utilizadas as proporções de 50%, a mais tóxica para as células e que diminuiu a viabilidade celular desde as primeiras horas de incubação; a proporção 6,25% que não apresentou toxicidade; e a a proporção 12,5% que, além de ser intermediária entre as duas, promove a morte das células a partir de 1h30m de incubação. Além disso, foi avaliada a viabilidade celular 24 horas depois da exposição ao extrato.Os resultados estão apresentados nas figuras 12, 13 e 14.

Figura 12 -Viabilidade da linhagem A549 exposta a 50% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do Azul de tripan.



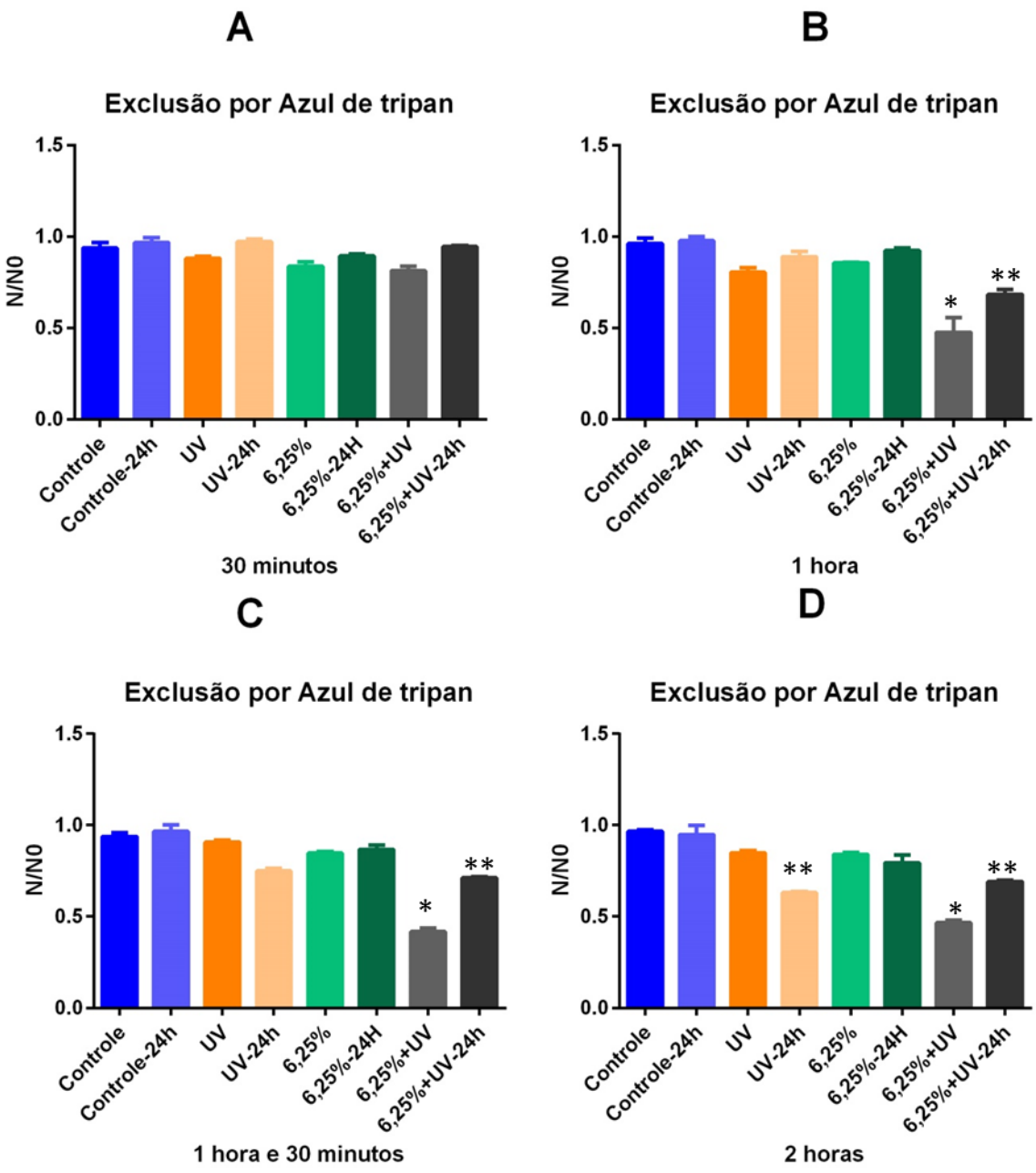
Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 após associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (50%) e UVA nos tempos 30 minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de exclusão do Azul de tripanN/N0=Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey) * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

Figura 13 - Viabilidade da linhagem A549 exposta a 12,5% de extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA pela metodologia do Azul de tripan.



Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 após associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (12,5%) e UVA nos tempos 30 minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2 horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de exclusão do Azul de tripan..N/N0= Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle..(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey). * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

Figura 14 -Viabilidade da linhagem A549 exposta a 6,25% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do Azul de tripan.



Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 após associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (6,25%) e UVA nos tempos 30 minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2 horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de exclusão do Azul de tripan. N/N0=Número de células viáveis / Número de células viáveis docontrole.(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey). * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

As amostras contendo as proporções 50 e 12,5% e suas associações com a radiação UVA apresentaram diferença significativa em relação ao controle desde 30 mintos de exposição ($p<0,01$) e mantiveram-se da mesma forma 24horas após a exposição($p<0,01$). A proporção 6,25% permaneceu segura quando exposta ao extrato, porém quando associada à radiação UVA, resultou numa diminuiçãosignificativa($p<0,01$) da viabilidade da linhagem A549, resultado que se manteve 24horas após a exposição.

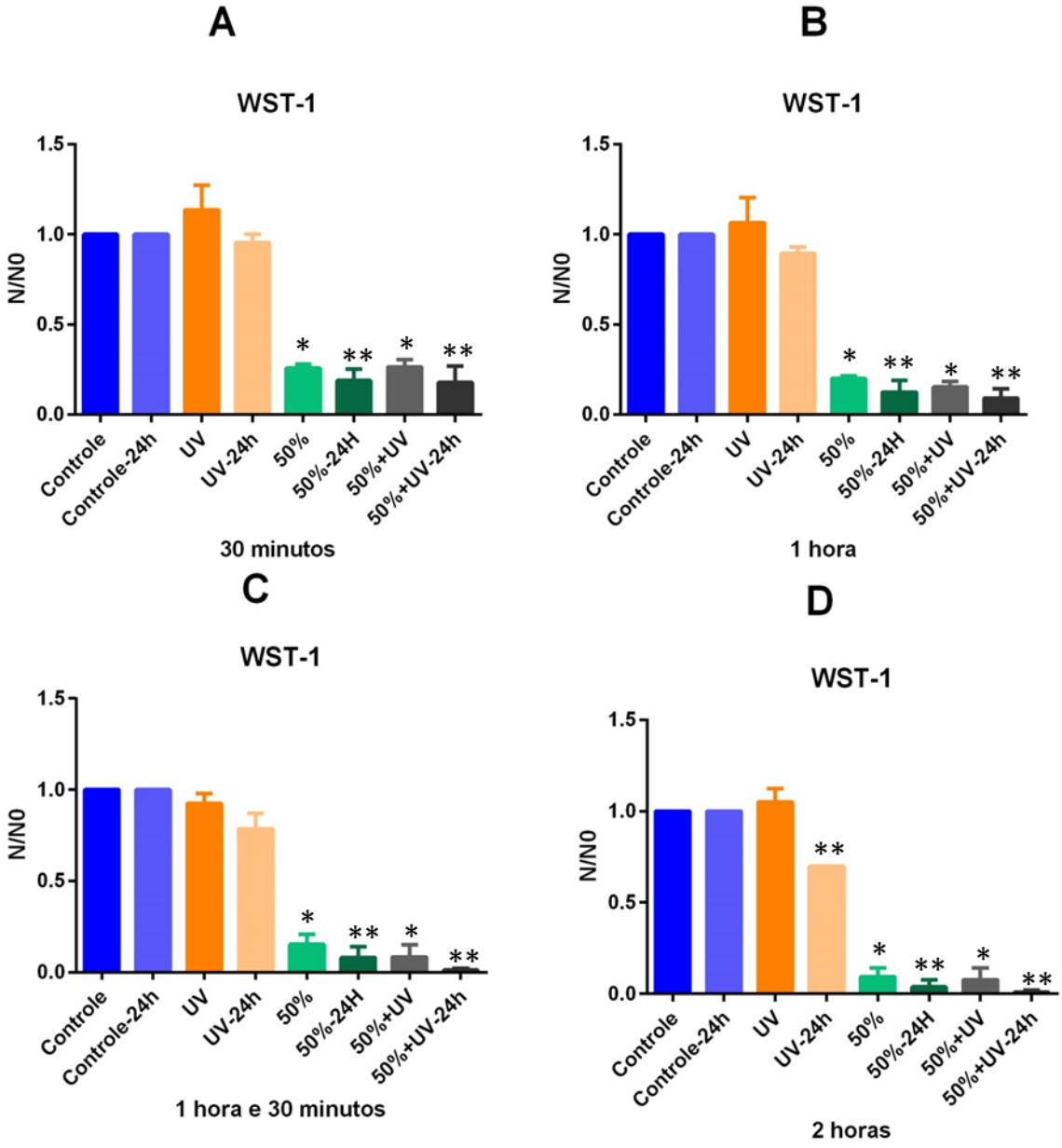
Após confirmar por outra metodologia de viabilidade que não ocorria divisão celular para justificar o aumento da absorção nas amostras de células incubadas com ambos agentes associados, a metodologia do WST-1 foi novamente testada, com algumas modificações. O ensaio de viabilidade pelo WST-1 também foi realizado 24 horas após a exposição ao extrato de *Aloe vera* e UVA.

9.7 **Avaliação da viabilidade celular por WST-1 da linhagem A549 exposta ao extrato glicólico de *Aloe vera* associado â radiação UVA após 24horas.**

Os resultados descritos nos itens 9.4 e 9.5 indicam que há um aumento da viabilidade nas amostras expostas à uma dose subletal de radiação UVA, enquanto que o uso de uma metodologia de análise de viabilidade diferente mostrou que o aumento da viabilidade não pode ser devido ao aumento do número de células, de acordo com os resultados apresentados nas figuras 12, 13 e 14.

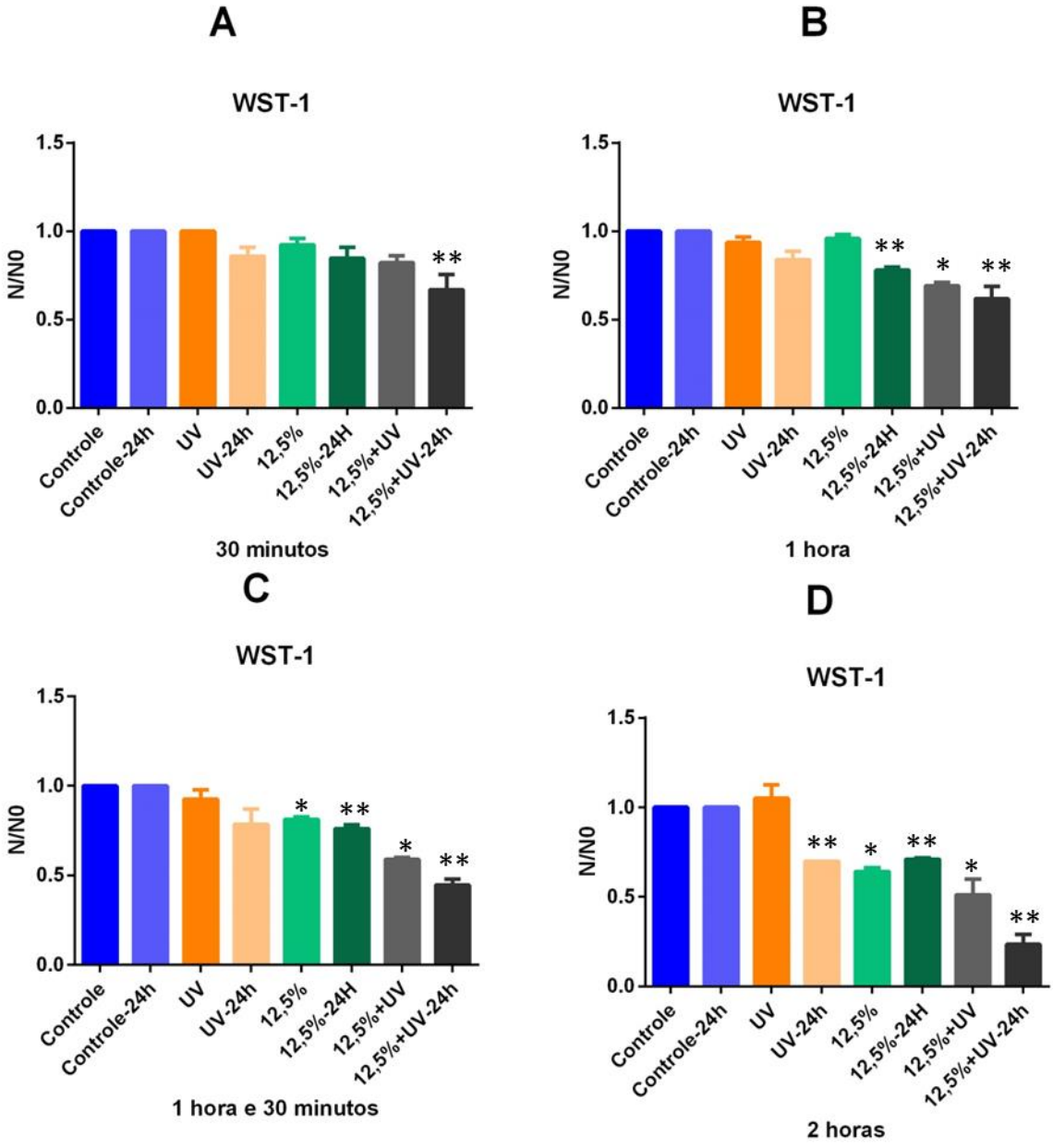
Como objetivo explicar a hipótese de que o UVA poderia ser responsável pelo aumento da absorção em 540nm das amostras expostas a ele, a viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio do WST-1 24h após a exposição à radiação UVA. $3x10^3$ células por poço em meio F12 foram previamente semeadas durante 48 horas, em estufa a 37 ºC e 5% CO_2. As proporções e condições utilizadas foram as mesmas do item 8.6, para que se pudesse comparar as duas metodologias.Os resultados estão apresentados nas figuras 15, 16 e 17:

Figura 15 - Viabilidade da linhagem A549 exposta a 50% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA.



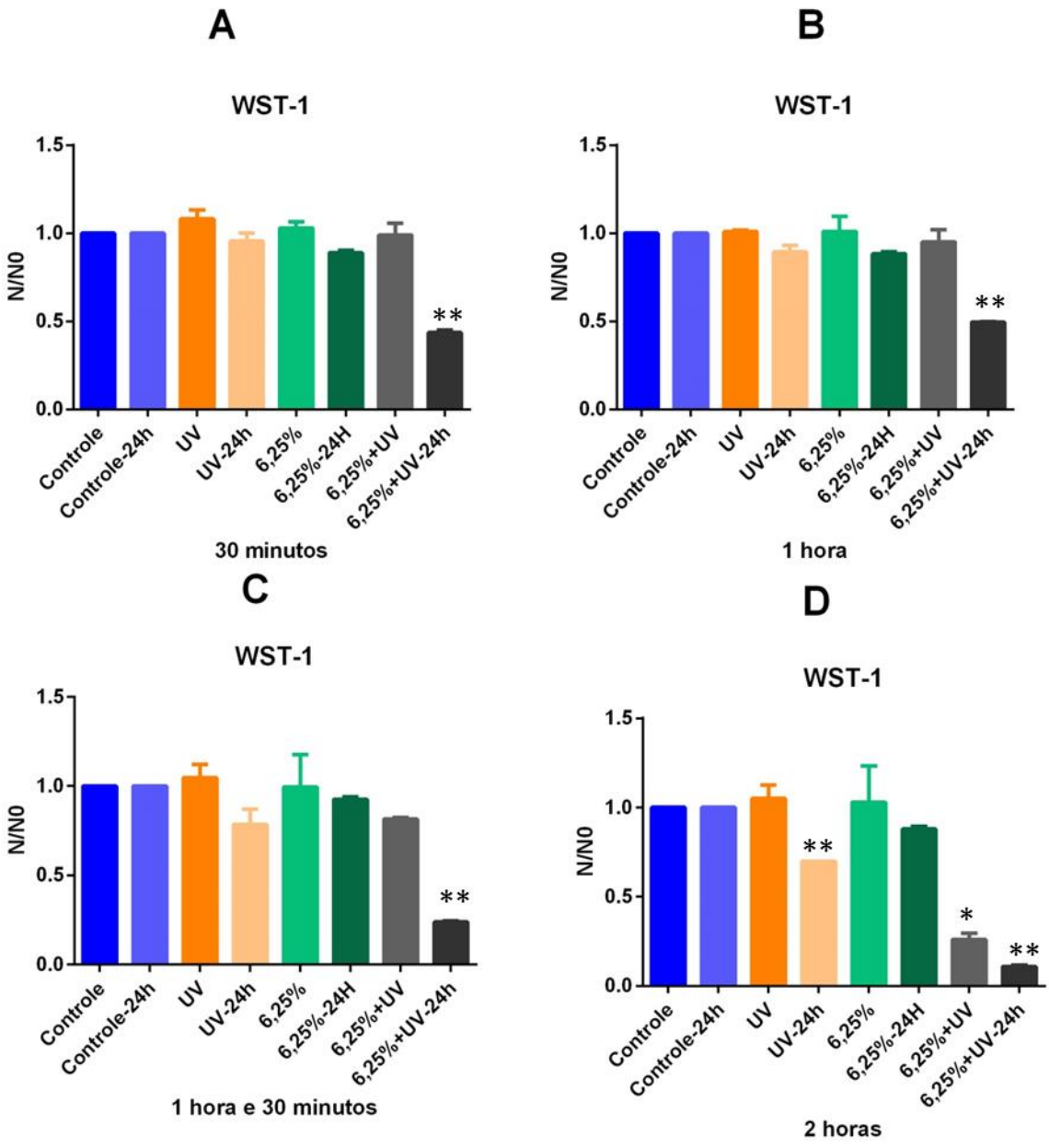
Legenda: Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 24 horas após a associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (50%) e UVA nos tempos 30 minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de proliferação por WST-1.N/N0= Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey). * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

Figura 16 -Viabilidade da linhagem A549 exposta a 12,5% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA



Legenda: Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 24 horas após a associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (12,5%) e UVA nos tempos 30 minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de proliferação por WST-1.N/N0= Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey). * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

Figura 17 - Viabilidade da linhagem A549 exposta a 6,25% do extrato glicólico de *Aloe vera* em associação à radiação UVA, pela metodologia do WST-1, 24 horas após a exposição ao UVA.



Legenda: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 24 hpras após a associação entre extrato glicólico de *Aloe vera* (6,25%) e UVA nos tempos 30minutos - 18kJ/m² (A), 1 hora - 36kJ/m² (B), 1 hora e 30 minutos - 54kJ/m² (C) e 2horas - 72kJ/m² (D), através do ensaio de proliferação por WST-1.N/N0= Número de células viáveis / Número de células viáveis do controle.(*p<0,05 e **p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey). * - diferente do controle / ** - diferente do controle 24h.

O resultado mostra que a radiação UVA pode interferir no resultado da metodologia do WST-1, quando utilizada imediatamente após exposição a radiação UVA. Quando o ensaio foi realizada 24 horas após a exposição a radiação ultravioleta, não ocorreu o aumento da viabilidade nas amostras que eram expostas ao UVA, demonstrando que o ensaio pode ser utilizado mas deve ser adaptado.

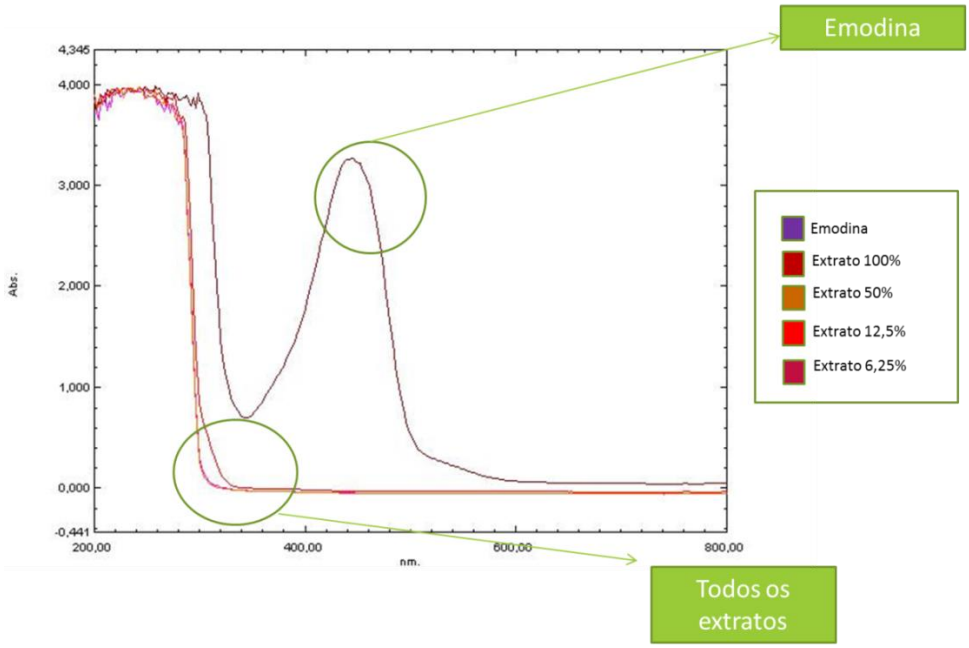
Os resultados da viabilidade por WST-1, 24h após a exposição aos agentes foram bem semelhantes resultado àqueles obtidos por meio do ensaio de viabilidade pelo azul de tripan. Novamente o extrato glicólico de *Aloe vera* mostrou-se citotóxico nas proporções de 50 e 12,5% e não promoveu morte celular na proporção de 6,25%.

A proporção de 12,5%, associada ao UVA promoveu um aumento da morte celular em comparação com a proporção do extrato sozinho, enquanto que a proporção 6,25 que sozinha é segura, após associação coma radiação torna-se lesiva.

9.8 **Análise dos espectros de absorção da emodina e das diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera*.**

Os resultados indicam que no extrato glicólico utilizado no trabalho não há emodina. Em todas as proporções testadas (100, 50, 12,5 e 6,25%) não houve a sobreposição no mesmo pico observado na solução padrão de emodina (440nm).O resultado está apresentados na figura 18:

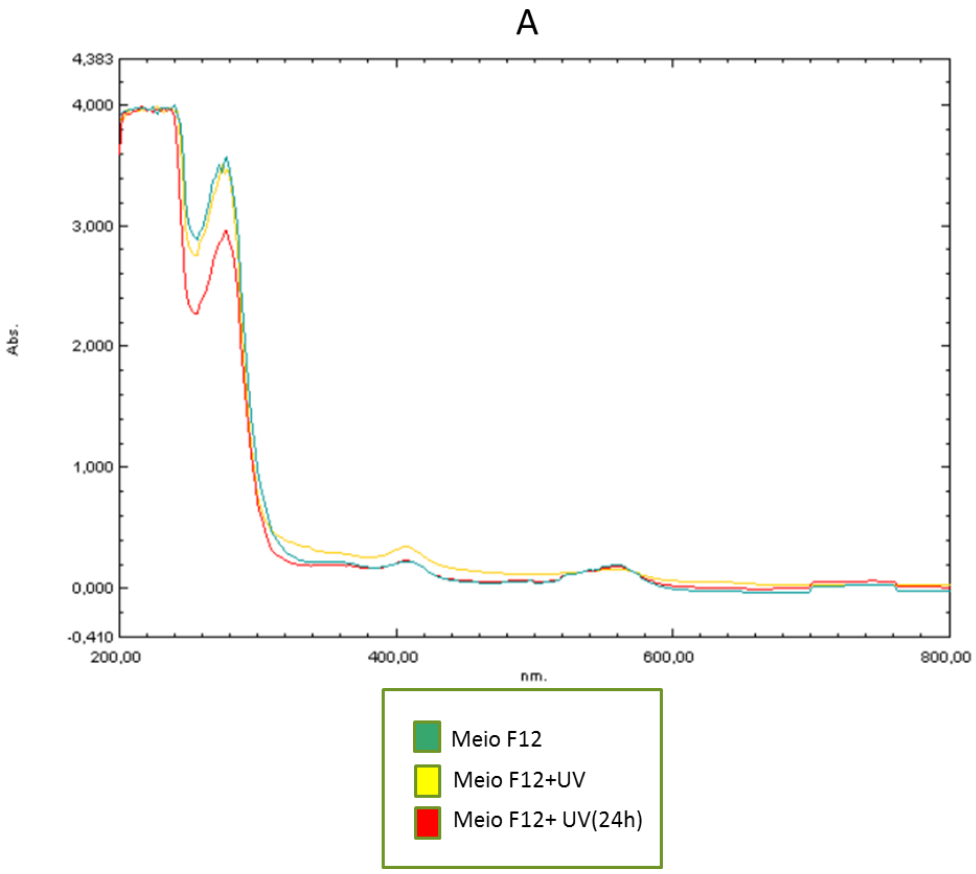
Figura 18 - Espectro de absorção (200 – 800 nm) de uma solução padrão de emodina e de diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera*.



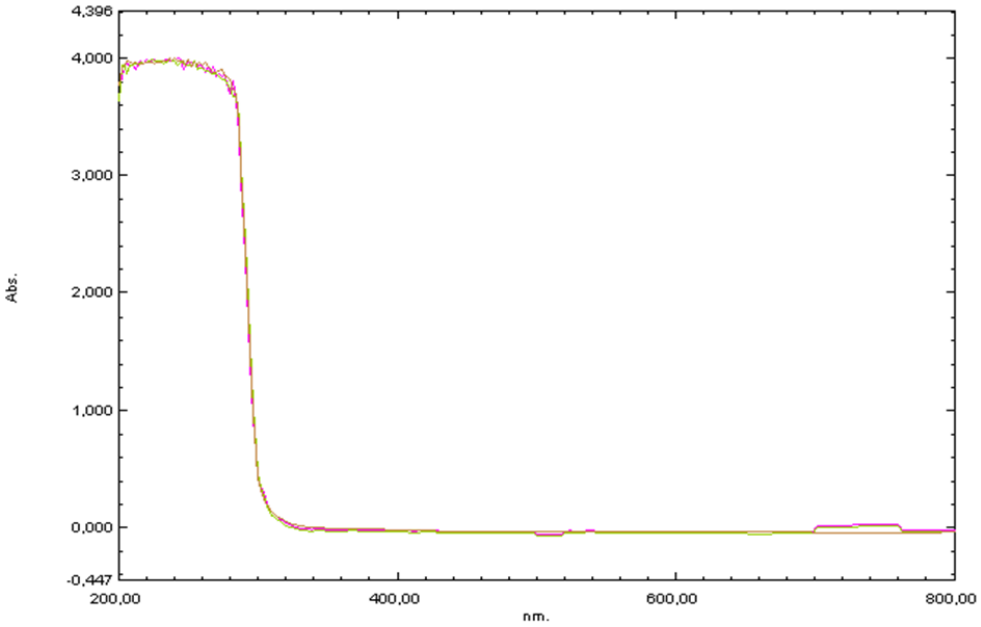
9.9 **Análise dos espectros de absorção das diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera*, após exposição à radiação ultravioleta A.**

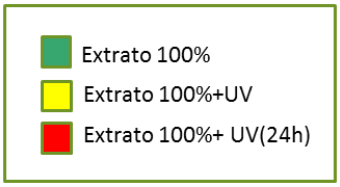
Os resultados indicam que não há modificação no pico de absorção dos extratos glicólicos e no meio celular utilizado tanto após 2 horas da exposição aos raios ultravioleta A, quanto após 24horas.O resultado está apresentado na figura 19:

Figura 19 -Espectro de absorção (200 – 800 nm) do meio F12-HAM (A) e de diferentes proporções do extrato glicólico de *Aloe vera* (B – E), 2 e 24 horas apósexposição à radiação ultravioleta A.

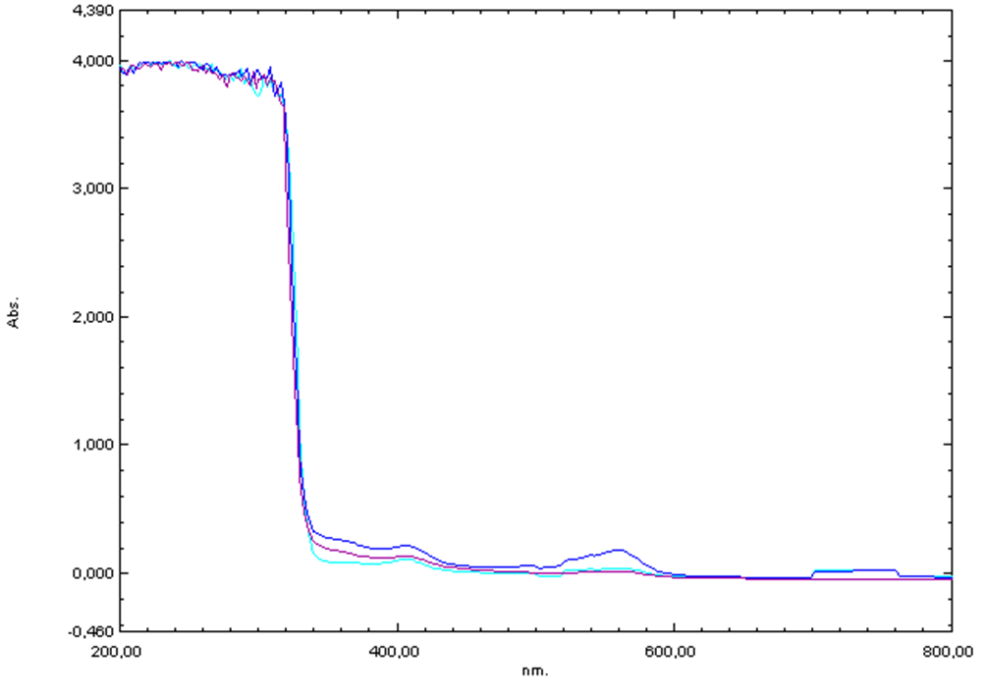


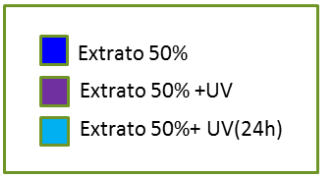
B


4,396
4,000
3,000
2,000
1,000
0,000
-0,447
Abs.
200,00
400,00
600,00
800,00
nm.

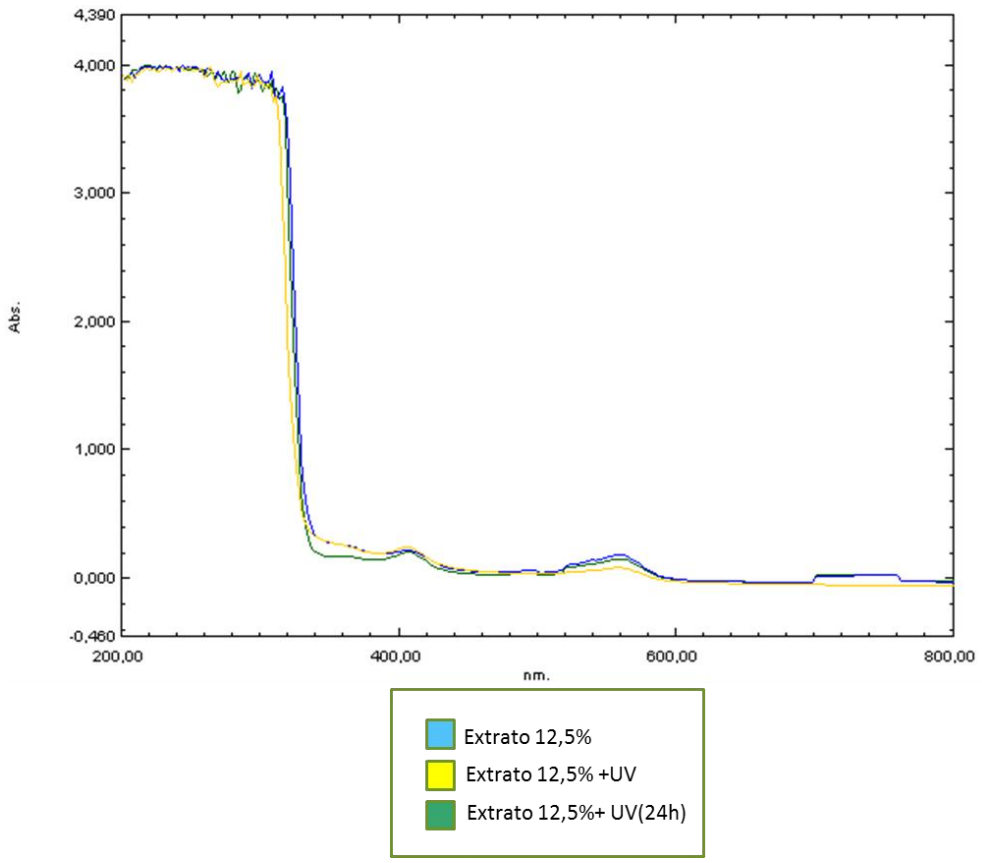

Extrato 100%
Extrato 100%+UV
Extrato 100%+ UV(24h)

C

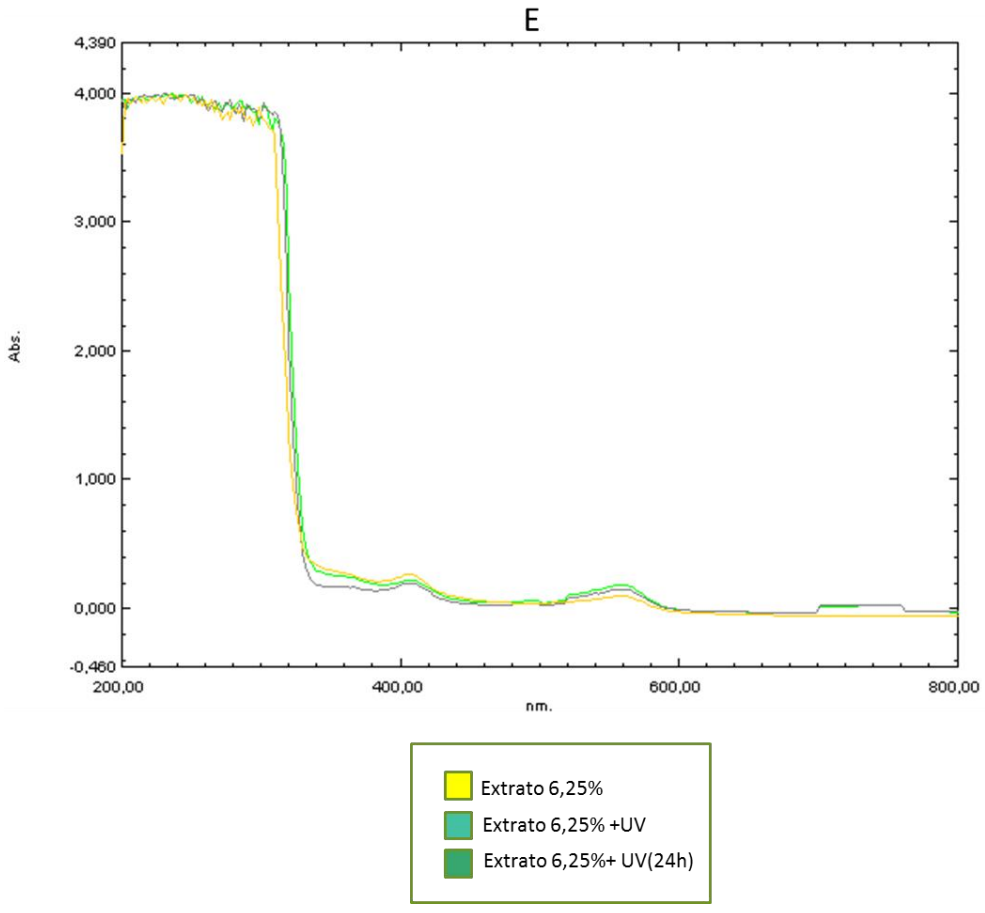

4,390
4,000
3,000
2,000
1,000
0,000
-0,460
Abs.
200,00
400,00
600,00
800,00
nm.


Extrato 50%
Extrato 50% +UV
Extrato 50%+ UV(24h)

D


4,390
4,000
3,000
2,000
1,000
0,000
-0,460
Abs.
200,00
400,00
600,00
800,00
nm.
Extrato 12,5%
Extrato 12,5% +UV
Extrato 12,5%+ UV(24h)

E

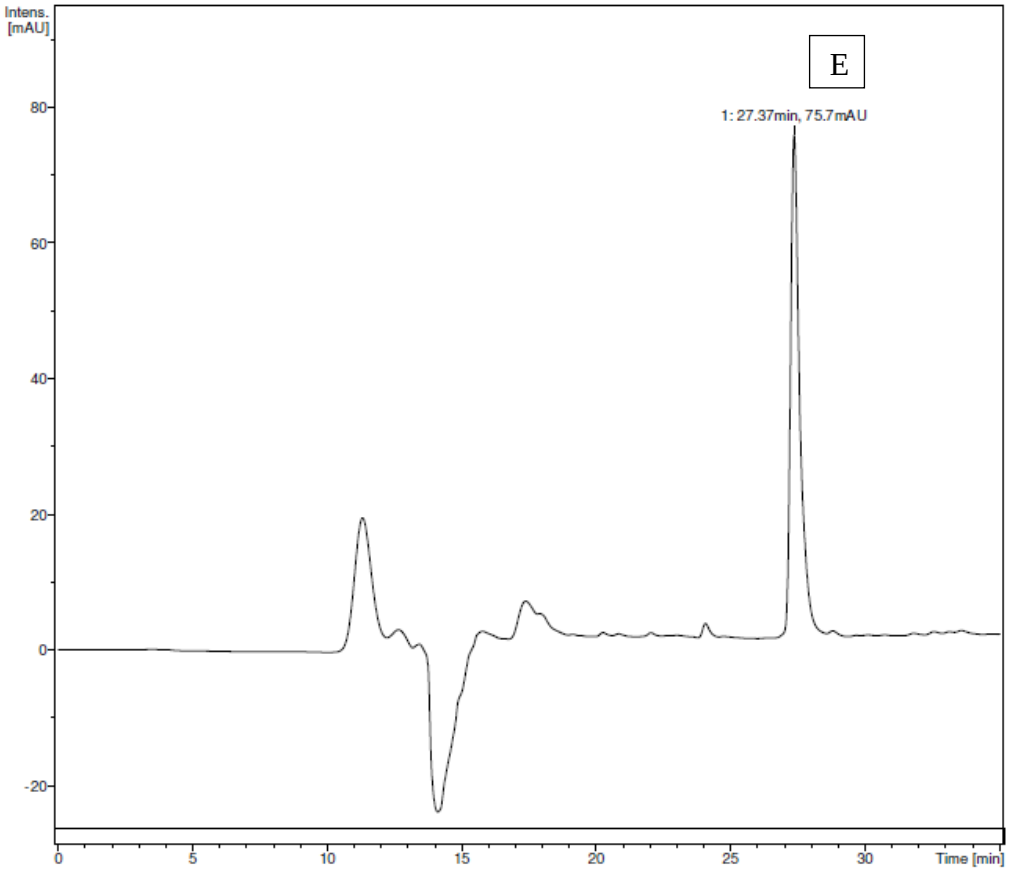

4,390
4,000
3,000
2,000
1,000
0,000
-0,460
Abs.
200,00
400,00
600,00
800,00
nm.
Extrato 6,25%
Extrato 6,25% +UV
Extrato 6,25%+ UV(24h)

9.10 **Análise do extrato glicólico de *Aloe vera* por cromatrografia líquida de alta eficiência**

Os resultados mostrados nos cromatrogramas confirmam o a ausência da emodina no extrato glicólico de *Aloe vera* utilizado, abrindo margem para relacionar os efeitos encontrados a uma outra antraquinona. O pico de absorção do padrão da emodina em 254nm foi em 27 minutos e 37 segundos e em 420nm foi em 26 minutos e 86 segundos. Os cromatrogramas do extrato apresentaram 3 picos em 15 minutos . Os resultados estão apresentados nas figuras 20 e 21.

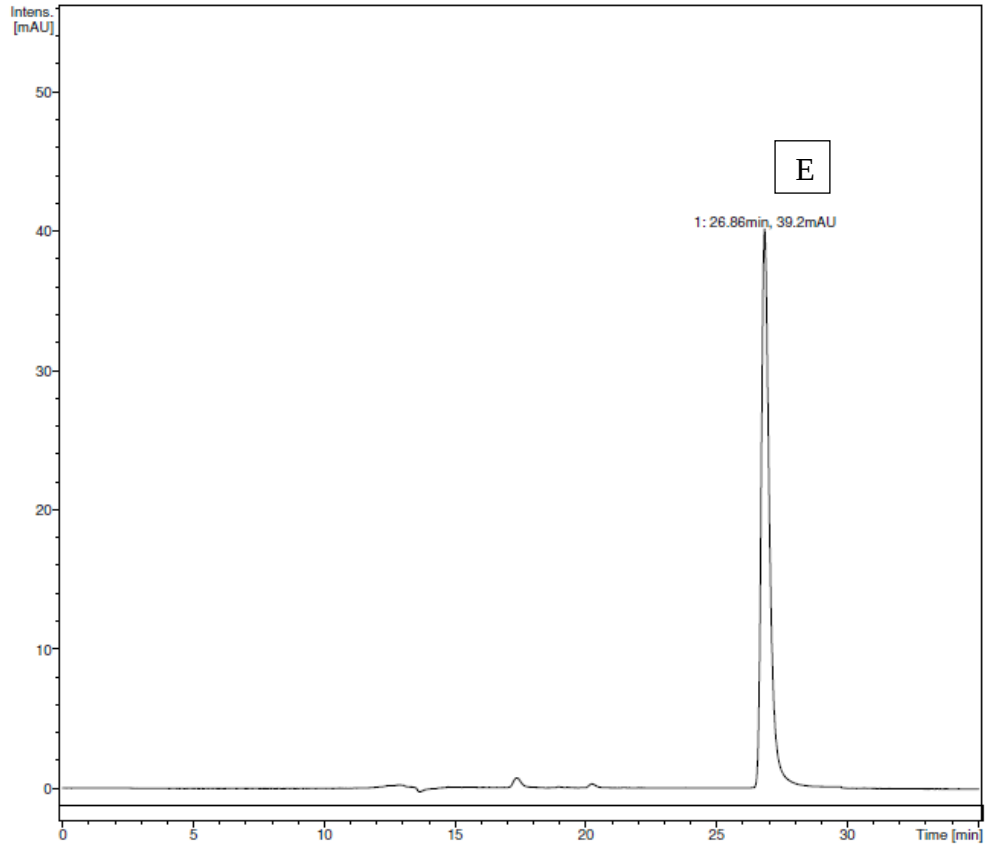
Figura 20 -Cromatrografia líquida com detector DAD(UV-VIS) do padrão de emodina (10 ppm): (A) Absorção em254nm e (B)em 420nm.

(A)



Legenda: E = Emodina

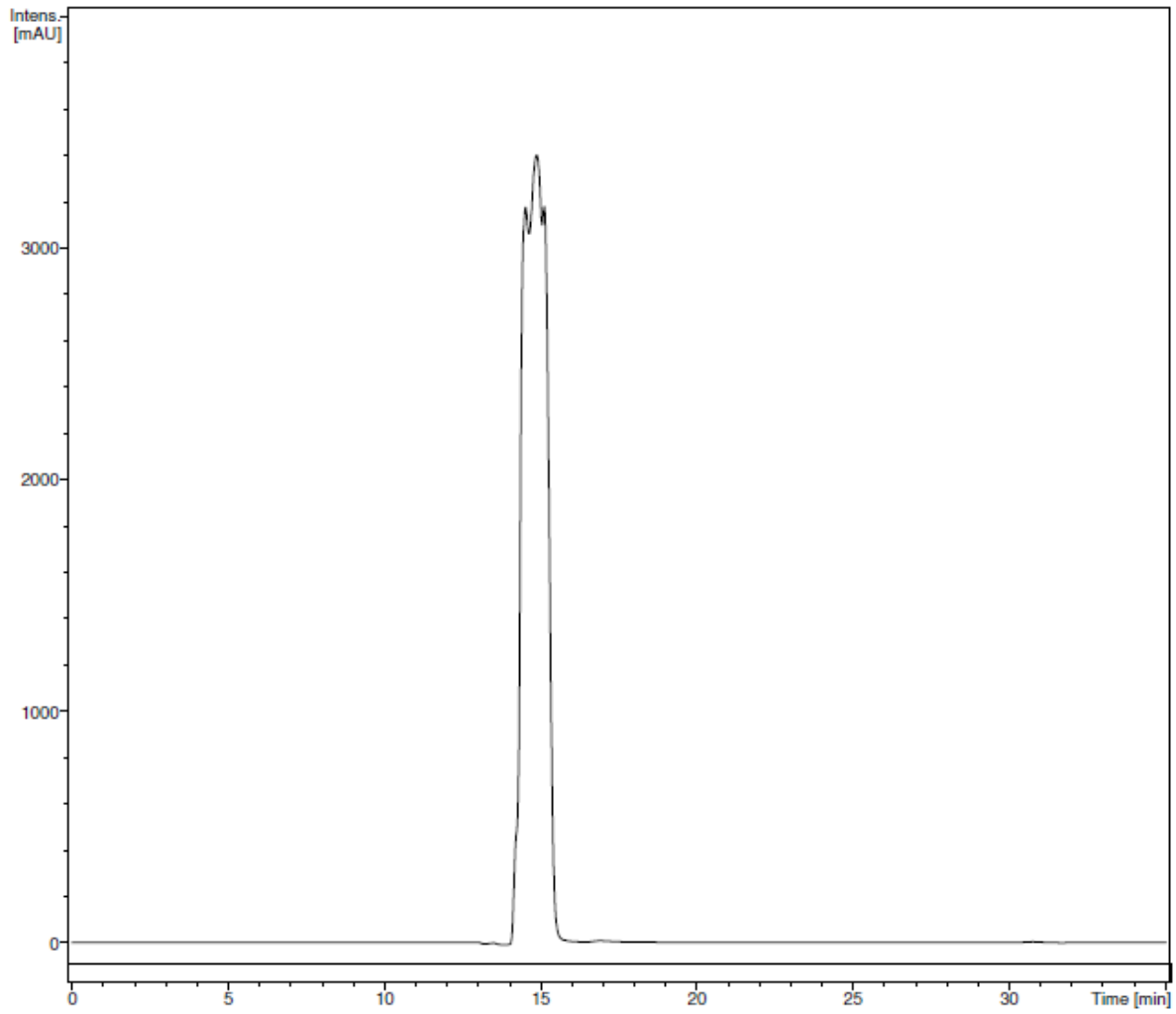
(B)



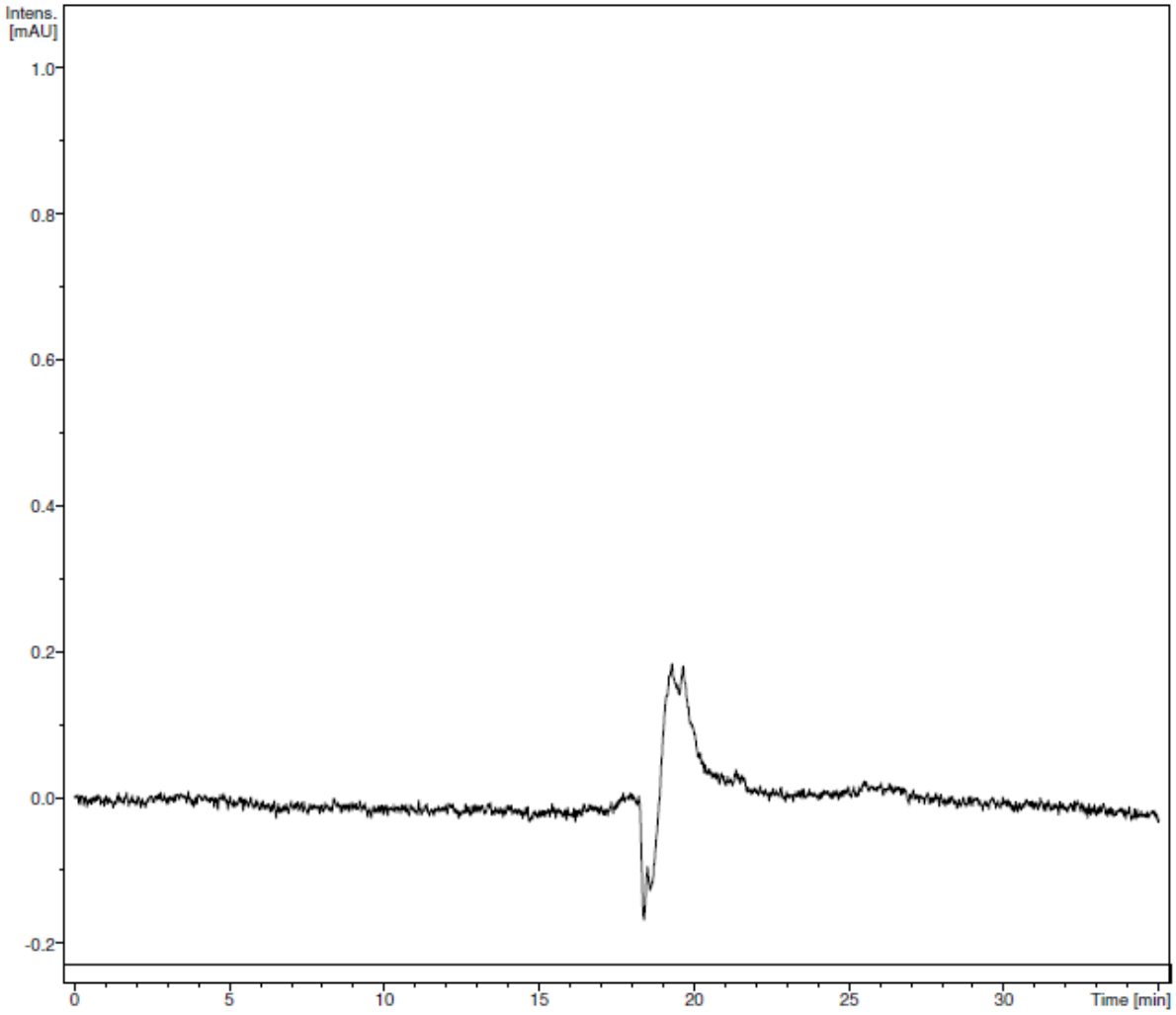
Legenda: E = Emodina

Figura 21 - Cromatrografia líquida com detector DAD(UV-VIS) do extrato glicólico de *Aloe vera*: (A) Absorção em254nm e (B) em 420nm.

(A)



(B)



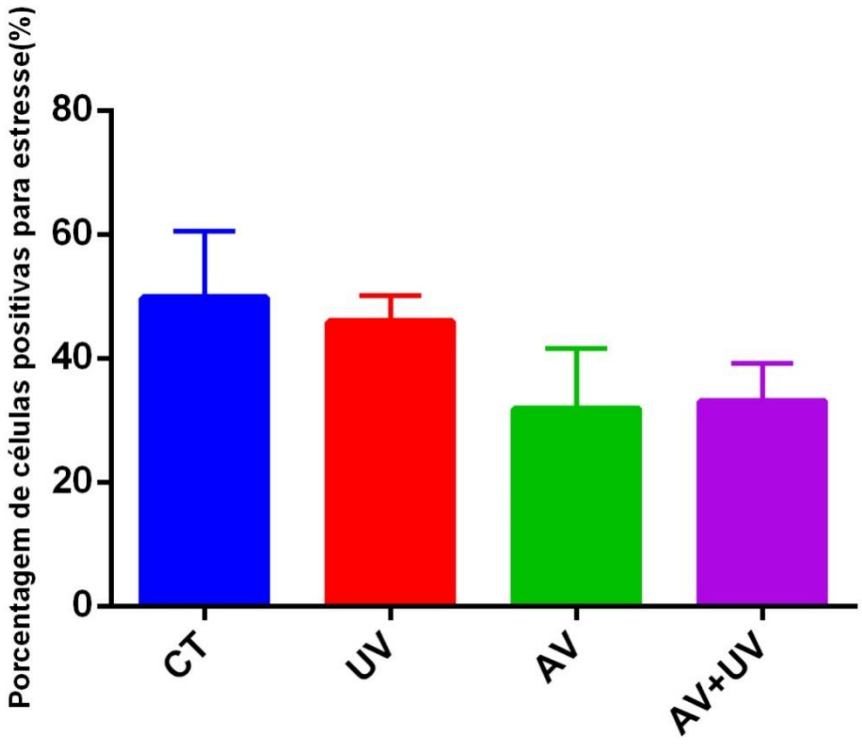
9.11 **Detecção de estresse oxidativo em células da linhagem A549 expostas ao extrato glicólico de *Aloe vera*, associado ou não à radiação UVA.**

Os resultados encontrados demonstram que não houve diferença significativa em relação ao controle na porcentagem de células marcadas positivamente para o estresse após uma 1hora de exposição ao extrato glicólico associado ou não à radiação UVA, assim como 24horas após a exposição ($p>0,05$). Em relação a intensidade do estresse oxidativo de células marcadas positivamente para o estresse, representado pela mediana de intensidade de fluorescência (MFI), não houve diferença significativa das amostras testadas em relação ao controle após 1hora de exposição aos agentes ($p>0,05$). Após 24horas da exposição, somente

a amostra irradiada com ultravioleta apresentou diferença significativa ($p<0,05$). Os resultados estão mostrados nas figuras 22 e 23.

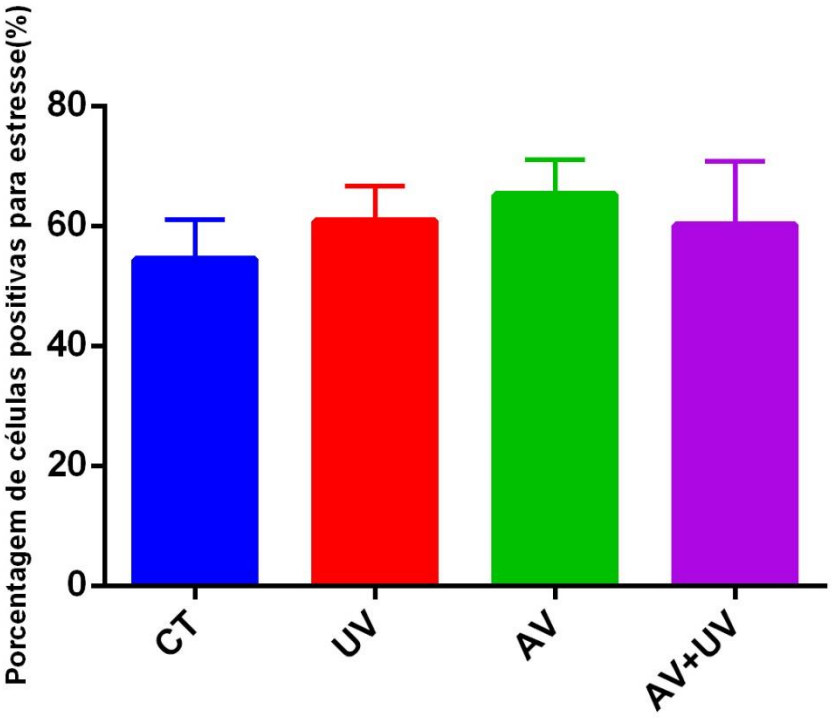
Figura 22 - Porcentagem de células marcadas positivamente para estresse oxidativo com DCFDA(2',7' –dichlorofluorescin diacetate): (A) após 1 hora de exposição ao UVA; e (B) 24 horas após a exposição ao UVA.

(A)



Legenda: Controle (CT), Ultravioleta A (UV), extrato glicólico de *Aloe vera* naproporção de 12,5% (AV)e *Aloe vera* + Ultravioleta A (AV+UV).

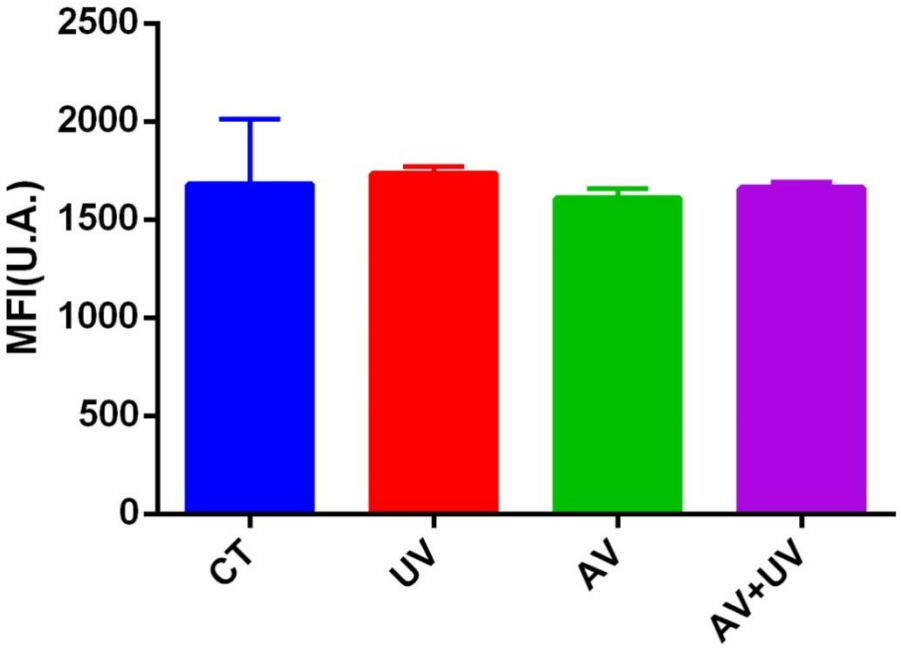
(B)



Legenda: Controle (CT), Ultravioleta A (UV), extrato glicólico de *Aloe vera* naproporção de 12,5% (AV)e *Aloe vera* + Ultravioleta A (AV+UV).

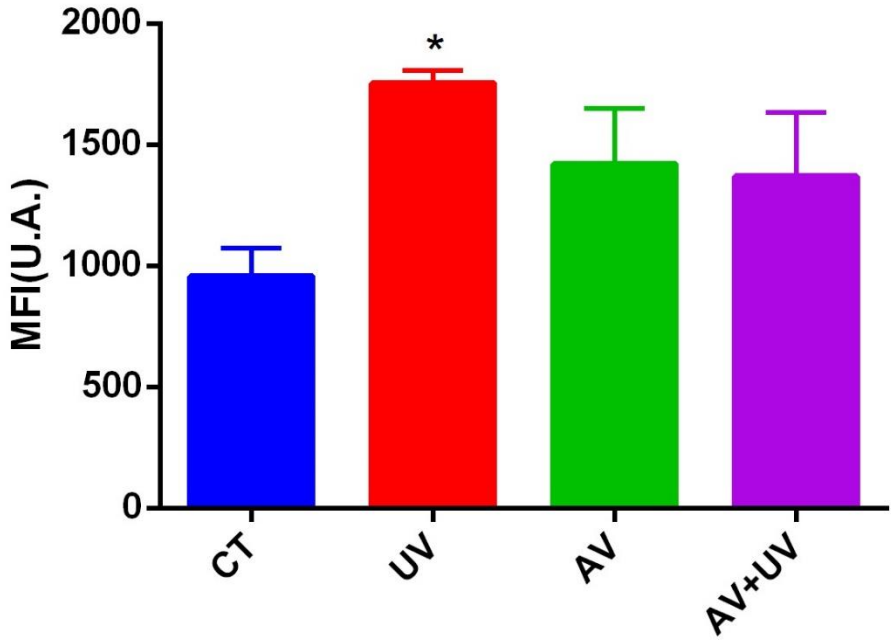
Figura 23 - Intensidade de fluorescência emitida pela ligação do DCFDA(2',7' – dichlorofluorescin diacetate) com as espécies reativas de oxigênio produzidas pela linhagem celular A549: (A) após 1 hora de exposição ao UVA; e (B) 24 horas após a exposição ao UVA.

(A)



Legenda: Controle (CT), Ultravioleta A (UV), extrato glicólico de *Aloe vera* naproporção de 12,5% (AV)e *Aloe vera* + Ultravioleta A (AV+UV).

(B)



Legenda: Controle (CT), Ultravioleta A (UV), extrato glicólico de *Aloe vera* naproporção de 12,5% (AV)e *Aloe vera* + Ultravioleta A (AV+UV). (*p<0,05 – Teste One way ANOVA/ *Post hoc*: Tukey).

10 **DISCUSSÃO**

A babosa é uma planta utilizada no mundo inteiro pelos seus benefícios à saúde. A composição da planta e a avaliação de diferentes propriedades biológicas tem sidoescritas em diversos artigos (HAMMAN, 2008; SHARRIF & SANDEEP, 2011 e RADHA & LAXMIPRIYA, 2015**).** Dentre os compostos que fazem parte da babosa, as antraquinonas presentes na *Aloe vera*, que são compostos orgânicos aromáticos, são conhecidos por terem efeitos mutagênicos e genotóxicos em bactérias e células de mamíferos (LIBERMAN et al., 1980, NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2001 e SHALABI et al 2015). Esses efeitos parecem estar ligados a danos oxidativos desencadeados, por exemplo, pela capacidade de algumas antraquinonas absorverem a radiação UVA (BOSCH et al., 1987; WAMER, VATH & FALVEY., 2003; XIA et al., 2007). Dentre os extratos que são produzidos com a babosa, o extrato glicólico possui poucos estudos acerca do seus efeitos biológicos . Por isso, com os resultados obtidos neste estudo, pretende-se contribuir para um melhor conhecimento da toxicidade promovida pela exposição a um extrato glicólico de *Aloe vera* e sua associação à radiação UVA, visto que um grande número de pessoas utiliza produtos à base de extrato da planta e se expõem ao sol.

Para avaliar a toxicidade exercicida pelo extrato de *Aloe vera* na linhagem celular A549, inicialmente foi feita uma busca bibliográfica para saber qual a concentração celular mais indicada para cultivo em microplacas de 96 poços. O número de células variou entre diferentes artigos revisados, mas em nenhum dos casos esse ultrapassou 10^5 células por poço (LU et al, 2009; LEE et al., 2011; HWANG et al., 2013; SOLOWEY et al., 2014; OMOYENI et al., 2015; BAHMANI et al., 2015; FAN, HUANG&XIAO, 2015). Por isso, no presente trabalho foram testadas as concentrações mais encontradas, ou seja, 3, 5, 10, 20 e 30 x 10^3.

A confluência das culturas foi avaliada por observação em microscópio invertido, com objetiva de 10x. Após analisar os resultados apresentados na figura 6, a concentração escolhida foi $3x10^3$ células por poço. Desse modo, amostras contendo essa concentração celular eram mantidas durante 48 horas em estufa (37ºC; 5% CO_2), alcançando uma confluência próxima a 60% antes da incubação com oextrato de *Aloe vera*. Em virtude dos tempos de exposição ao extrato glicólico, variarem de 2 até 48h após a fase inicial de crescimento celular, a concentração $3x10^3$ células/poço foi considerada ideal para a utilização nessas condições.

Na padronização do ensaio de proliferação pelo WST-1, as concentrações testadas foram 3, 5, 10, 15, 20, 30 x 10^3. Como a melhor concentração para utilizar em microplaca de

96 poços foi $3x10^3$ células/poço, a intenção foi avaliar se ela também seria a melhor opção para padronizar o ensaio. Os resultados demonstraram que a concentração $3x10^3$ células/poço pode ser utilizada, pois a metabolização do reagente acontece logo após a adesão das células a microplaca (Tempo 0) e aumenta proporcionamente ao crescimento celular (figura 7). Essa concentração também é vantajosa pois é obtida de forma mais econômica e em menor tempo. Além disso, apresenta um espalhamento no poço da placa que permite o crescimento confortável das células (mais espaço entre elas) durante o período em que estiverem na estufa. O resultado também demonstrou que, mesmo com baixa concentração celular ($3x10^3$ células por poço), o ensaio de viabilidade pelo WST-1 pode ser realizado, denotando uma boa sensibilidade do método.

Na segunda etapa da padronização do ensaio WST-1, os resultados demonstram que a cor do meio HAM F12 e das proporções do extrato absorvem o feixe de luz emitido (450nm) pelo monocromador do espectrofotometro e, por isso, em todas os experimentos utilizando a metodologia de proliferação do WST-1, a absorbância do branco da reação (células + WST-1) e da proporção de extrato de *Aloe vera* (Proporção do extrato + WST-1) devem ser descontadas da absorbância lida nos poços que contenham o meio HAM F12 e as proporções do extrato com as células ($Abs_{\text{amostra com meio F12}} - Abs_{\text{branco}}$ ou $Abs_{\text{amostras com proporção do extrato}} - Abs_{\text{proporção do extrato}}$) para que a absorbância final seja normalizada (figura 8). Estas padronizações são comuns em ensaio colorimétricos como o WST-1 e necessitam ser ajustadas antes de iniciar os testes,

Na análise da citotoxicidade promovida pelo extrato glicólico comercial de *Aloe vera*, foram avaliadas diferentes proporções, incluindo aquelas que compõem produtos cosméticos à base da planta. De acordo com o fabricante do extrato glicólico de *Aloe vera* , o produto é usado na confecção de cremes, géis, leites, loções de tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas na proporção de 1,0 a 5,0%; em cremes dentais de 1,0 a 3,0%; em desodorantes cremosos ou líquidos de 1,0 a 5,0%; e em xampus, condicionadores e sabonetes de 2,0 a 10,0% (Anexo 1). Por isso, para avaliar a toxicidade do extrato foram escolhidas as concentrações 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% e 1,56%.

As proporções 50% e 25% se mostraram as mais tóxicas para a linhagem A549 desde os tempos iniciais de exposição, diminuindo a viabilidade celular em níveis próximos ao controle positivo (figura 9). A proporção de 12,5% também foi citotóxica, porém menos tóxica que as anteriores. Vale lembrar que a proporção de 12,5% é maior que aquela recomendada como segura pelo fabricante para a composição de sabonetes e xampus (10%).

Visto que a linhagem A549 é de carcinoma humano, essas proporções podem ser indicadas, por exemplo, para o estudo da ação anti-cancerigena da *Aloe vera* descrita em outros trabalhos(ASLANI, GHANNADI &RADDANIPOUR, 2015; JOSEPH & RAJ, 2012). Para isso, além da linhagem A549, também é necessário avaliar a viabilidade em células normais como realizado, por exemplo, por SOLOWEY e colaboradores com extrato vegetal de chá verde (2009). Caso a viabilidade em células normais seja maior do que a apresentada em células cancerígenas, confirma-se a ação anticancerigena dessas proporções.

Os resultados apresentados apontam para a confiabilidade do extrato nas menores proporções utilizadas na preparação de produtos cosméticos (1,56, 3,13 e 6,25%), porém indicam que concentrações acima de 12,5% são tóxicas para as células. Não é ainda possível confirmar a confiabilidade do extrato para humanos, visto que esse ensaio foi realizado *in vitro* e com uma linhagem cancerígena, mas não se pode deixar de ressaltar a importância do resultado, pois foi realizado num modelo eucarioto e indica que as proporções prescritas na bula do fabricante, podem ser seguras, necessitando porém de mais testes. BUDAI e colaboradores(2013), usando um produto comercial de *Aloe vera* composto com 96% da parte interna da planta, observaram que soluções contendo 1 a 10% (v/v) de *Aloe vera* não causaram diminuição significativa na viabilidade celular da linhagem THP-1 (Monócito humano de leucemia monocítica aguda). Por outro lado, 5% do extrato de *Aloe vera* foi capaz de reduzir a viabilidade de macrófagos primários em 50%, chegando a 70% de morte na proporção de 10%. Essa diferença na taxa de inativação promovida pelo extrato mostram que células primárias são muito mais sensíveis ao produto testado que células imortalizadas. Apesar de os extratos serem diferentes, os resultados estão de acordo, com o mostrado neste trabalho, onde a proporção 6,25%(v/v) não diminuiu significativamente a viabilidade da linhagem A549, porém a proporção 12,5%(v/v) a partir de 1hora e 30 minutos, promove uma diminuição da viabilidade celular em relação ao controle. Os resultados podem indicar para estudos mais aprofundados sobre uma possível atividade anti-tumoral do extrato glicólico de *Aloe vera*, sendo que proporções acima de 12,5%(v/v) são recomendadas.

Com estímulo da mídia para consumo de produtos à base de *Aloe vera*, devido aos seus benefícios como cicatrização de feridas, alívio de queimaduras, antifúngico, ação hipoglicêmica e anti-inflamatória, como descrito em CHOI & CHUNG (2003), cada vez mais sabonetes, xampus, cremes e protetores solares são produzidos e comercializados com extrato da planta. A fototoxicidade desses produtos vem sendo discutida por diferentes estudos, devido aos seus efeitos diretos e indiretos sobre moléculas orgânicas (WAMER, VATH & FALVEY., 2003; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004; HUR et al., 2010).

A maior parte dos estudos que abordam os efeitos da radiação UVA presentes na literatura, utiliza taxas de dose muito acima daquelas que atingem a superfície terrestre. Por exemplo, em um dia de sol no verão do Rio de Janeiro, as taxas ficam em torno de 10 W/m², enquanto que em muitos trabalhos as taxas são da ordem de 100 W/m² (KOZMIN et al., 2005; DOUKI et al., 2003 e COURDAVAULT et al; 2004). Associado a isto, também já foi demonstrada a importância da taxa de dose em relação ao efeito biológico induzido (SHORROCKS, PAUL & MCMILLAN, 2008), o que evidencia a relevância da realização de estudos com taxas de dose mais próximas daquelas recebidas na superfície do nosso planeta. Por isso, além de testar a toxicidade do extrato glicólico de *Aloe vera*, também foi avaliada sua ação associada à radiação UVA. Portanto, culturas da linhagem A549 foram incubadas com o extrato, nas proporções de 12,5%, 6,25%, 3,13% e 1,56%, associado à radiação UVA (taxa de dose de 10J/m^2/s).

Os resultados confirmaram a citotoxicidade do extrato na proporção de 12,5%, a partir de 1h30 de exposição, e sugerem uma potencialização do efeito pela associação com a radiação UVA, após 2 horas (figura 10).

A análise da figura 10 também mostra um aumento da viabilidade celular das amostras irradiadas, crescente em função do tempo de exposição ao UVA. Esse aumento poderia mascarar um possível efeito sinergístico letal entre a radiação UVA e o extrato de *Aloe vera*. Uma vez que o tempo de exposição ao UVA (máximo de 2 horas) é bem menor do que o tempo de geração da linhagem A549 (cerca de 24 horas – LIEBER, 1979), foi descartada a hipótese do aumento da viabilidade observada ser devida a um real aumento do número de células.

Para tentar elucidar o fenômeno, culturas de células A549 foram iluminadas com radiação UVA por 30 minutos, com taxas de dose diferentes (4; 8 e 12,5 J/m^2/s) e a viabilidade determinada pelo ensaio de WST-1. Esse teste colorimétrico está baseado na clivagem do sal tetrazólio WST-1 em formazan, pela enzima da cadeia respiratória mitocondrial succinato-tetrazólio redutase, ativa apenas em células viáveis (KOYANAGI, KAWAKABE & ARIMURA, 2015). Os resultados deste ensaio, descritos na figura 11, apontam para um aumento da viabilidade em função do aumento da taxa de dose de UVA. Como esse aumento não pode ser reflexo da divisão das células, uma possível explicação para o aumento da absorbância nas amostras após a irradiação pode estar relacionada à capacidade fotosensibilizadora da radiação UVA de promover a formação de espécies reativas de oxigênio (KIM, PARK & LIM 2015), o que poderia acelerar o metabolismo mitocondrial.

O aumento da taxa de dose poderia contribuir para uma maior atividade enzimática da organela e, com isso, o sal tetrazólio seria metabolizado de forma mais acelerada, aumentando o produto da reação e explicando o fenômeno. De acordo com esses resultados, o possível efeito sinergístico letal da associação UVA e *Aloe vera* poderia ficar subdimensionado, pois haveria um aumento da absorbância devido aos raios UV, mesmo em amostras com menor número de células viáveis.

Esse argumento é reforçado pelo resultado obtido com a amostra incubada com 12,5% de extrato (figura 10 – D). Nesse caso, a inativação promovida pelo extrato glicólico associado ao UVA seria mais relevante do que o aumento do metabolismo induzido pela radiação, resultando na diminuição da absorbância.

De modo geral, esses dados sugerem que a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do WST-1, ou por medologia similar, precisa ser bem controlada, especialmente quando envolver agentes que possam estimular a atividade mitocondrial e mascarar os resultados.

Portanto, para comparação de resultados e avaliação da influência da radiação UVA no ensaio do WST-1, a viabilidade celular das amostras incubadas com o extrato de *Aloe vera* também foi medida pela técnica de exclusão do azul de tripan. Esse corante não é capaz de atravessar membranas plasmáticas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e não adquirem nenhuma coloração; células mortas têm sua membrana danificada e ocorre o fluxo de corante para o interior, fornecendo uma coloração azul a elas.

As modificações no desenho experimental desta etapa do trabalho incluíram: (i) as proporções do extrato glicólico de *Aloe vera* avaliadas foram as de 50; 12,5; e 6,25%; (ii) a viabilidade celular foi medida ao final dos períodos de exposição ao extrato e/ou UV (0,5; 1; 1,5; e 2 horas) e também 24 horas após; (iii) a viabilidade foi determinada pelo ensaio de exclusão do azul de tripan e pela técnica do WST-1.

Os resultados obtidos com a metodologia do azul de tripan (figuras 12, 13 e 14) mostraram que não há aumento na viabilidade das amostras irradiadas, reforçando a ideia de que o fenômeno de aumento da absorbância observado na metodologia do WST-1 seja devido à radiação ultravioleta.

O ensaio de exclusão do azul de tripan confirma que as proporções de 50 e 12,5% são citotóxicas e indica que 24 horas após a exposição continua ocorrendo uma pequena diminuição de viabilidade, porém não havendo diferença significativa (figuras 12 e 13). Essa metodologia também aponta que a proporção de 6,25% do extrato não promove diminuição da viabilidade (figura 14).

De acordo com GUERTLER e colaboradores, o ensaio do WST-1 é um método confiável para determinar a viabilidade celular e, além disso, não apresenta diferença em relação à viabilidade medida pela metodologia de exclusão do azul de tripan, sendo ambas reprodutíveis. Porém, nossos resultados (figuras 15, 16 e 17) indicam que, nas condições testadas, pode sim haver diferença nos resultados obtidos pelas duas metodologias, e que isso ocorre muito provavelmente devido a exposição à radiação UVA. Porém, qualitativamente os resultados obtidos foram semelhantes, sugerindo que as técnicas são reprodutíveis. As medidas realizadas 24horas após exposição ao UVA apresentaram maior coerência entre as duas metodologias.

Esse conjunto de resultados que avaliam a citotoxicidade, reunidos nas figuras 12 – 17, sugerem que a associação com a radiação UVA parece promover um aumento da morte celular para as 3 proporções testadas e que esse efeito é diretamente proporcional ao tempo de exposição aos raios UV. É interessante observar nos resultados da figura 14 que a irradiação das células com UVA diminui significativamente ($p<0,05$) a viabilidade da amostra incubada com o extrato de *Aloe vera* (6,25%), que por si só não é citotóxico, já a partir de 30 minutos de exposição.

Aloe vera pode apresentar em sua composição as substâncias emodina, aloína e aloe-emodina que são estruturalmente semelhantes à emodina (COSTA, 2002). Alguns estudos apontam a emodina e aloe-emodina como potencialmente mutagênicas, além de demonstrarem um aumento da sensibilidade da pele à radiação UV, via danos oxidativos, fato não observado com a aloína (BOSCH et al., 1987; WAMER, VATH & FALVEY, 2003; XIA et al., 2007). STRICKLAND e colaboradores (2000) mostraram que a aloe-emodina aplicada topicamente aumenta a sensibilidade da pele à luz UV. Os autores avaliaram a fotoexcitação da aloína A e da aloe-emodina e mostraram que a incubação de fibroblastos de pele humana com 20 mM de aloe-emodina durante 18 horas, seguida por irradiação com UV, resultou em significativa citotoxicidade. A emodina é um dos compostos antraquinônicos majoritários presente em plantas conhecidas popularmente como babosa e recentemente foi descoberto que ela pode interagir com o DNA, intercalando-se entre as fitas da dupla-hélice e por ligações com os grupamentos TA e CG (SAITO et al., 2012). Outros estudos apontam para a fototoxicidade exibida por derivados antraquinônicos, devido a sua capacidade de absorver a radiação UV e produzir espécies reativas de oxigênio (YI et al., 2004; XIA et al., 2007; HUANG et al., 2008; WANG et al., 2009).

Desse modo, um ou mais produtos presentes no extrato glicólico de *Aloe vera* poderiam ser responsáveis pela morte celular representada nas figuras 12 a 17 e a exposição à

radiação UVA levaria à formação de espécies reativas de oxigênio, mediada ou não por substâncias ativas do extrato, acarretando um desequilíbrio oxidativo e aumento da morte das células.

Para tentar responder essas questões, foi inicialmente realizada uma avaliação espectrofotométrica e também por cromatografia líquida de alta eficiênciacom detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), buscando identificar a antraquinona emodina no extrato glicólico de *Aloe vera*, bem como possíveis alterações no espectro de absorção do extrato após irradiação com luz UVA.

A análise da figura 18, que apresenta o espectro de absorção (200 – 800 nm) do padrão de emodina e de diferentes proporções do extrato de *Aloe vera*, indica que esse composto não está presente no extrato. O ensaio por HPLC-DAD confirma esse resultado (figura 21) e descarta a possibilidade da emodina ser responsável pelos efeitos citotóxicos observados.

A irradiação do extrato com UVA não foi capaz de modificar seu espectro de absorção (200 – 800 nm), em nenhuma das proporções testadas, mesmo após 24 horas (figura 19 A – D). Resultados semelhantes foram obtidos por HPLC-DAD, nos comprimentos de onda testados, 254 e 420 nm (figura 21). Mesmo assim, a geração de estresse oxidativo pela radiação UVA ainda poderia explicar a citotoxicidade aumentada pela exposição a esse agente, pois fotosensibilizadores endógenos promovem a formação de espécies reativas de oxigênio estimulados pelos raios UV (VILE & TYRRELL,1995; PFEIFER, YOU & BESARATINIA, 2005; RÜNGER & KAPPES, 2008; CADET et al., 2009). A empresa MAPRIC, fabricante do produto, descreve genericamente as substâncias presentes no extrato glicólico de *Aloe vera* utilizado no presente estudo, que inclui, dentre outros princípios ativos, os compostos antracênicos aloína, aloe-emodina e aloinase (anexo 1). Na figura 21, os três picos que aparecem em 15 minutos podem ser os compostos descritos na bula, porém necessitam ser confirmados com seus padrões. Dentre essas moléculas, a aloe-emodina é descrita na literatura por apresentar diversos efeitos biológicos, incluindo uma possível capacidade de absorver fótons ultravioleta (YI et al., 2004; XIA et al., 2007; HUANG et al., 2008; WANG et al., 2009). Em um estudo conduzido por WAMER, VATH & FALVEY (2003) a fotoexcitação da aloe-emodina por luz UV promoveu citotoxicidade e dano oxidativo em fibroblastos. Os autores ressaltam que, embora não tenham conseguido identificar o principal alvo celular para a aloe-emodina fotosensiblizada, o estresse oxidativo gerado tem papel fundamental na diminuição da viabilidade celular.

Portanto, é possível que, mesmo sem alteração no perfil de absorção em espectrofotômetro, a radiação UVA pode estar fotoativando a produção de ERO. Visando

esclarecer essa suposição, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com células A549 incubadas com 12,5% do extrato de *Aloe vera*, associado ou não ao UVA, utilizando o corante fluorogênico DCFDA (*2',7' –dichlorofluorescin diacetate*) que mede a atividade de espécies reativas de oxigênio.

De modo inesperado, não houve diferença significativa em relação ao controle nas amostras incubadas por 1 hora com o extrato glicólico (12,5%), a radiação UVA e a associação entre os dois agentes. De acordo com LIOU & STORZ (2010), células neoplásicas apresentam naturalmente um nível alto de estresse oxidativo, o que poderia mascarar pequenas variações induzidas pelos agentes estudados no presente trabalho. Porém, os resultados indicam um aumento em relação ao controle, após 24 horas. Também de modo semelhante há uma tendência ao aumento do nível de estresse oxidativo gerado, após 24 da exposição das células ao UVA, sendo esse aumento significativo ($p<0,05$) na amostra exposta apenas à radiação ultravioleta (Figura 23)

PREMI e colaboradores (2015) mostraram que fotoprodutos da exposição de melanócitos à radiação ultravioleta continuam a serem produzidos mesmo após cessar a irradiação das células. De acordo com os autores, fotoprodutos de DNA tipicamente criados após um fóton do ultravioleta ser absorvido por uma timina ou citosinaformam compostos capazes de degradar a melanina, permitindo que grânulos de melanina sejam transportados ao núcleo e horas após a exposição ao UV ter cessado, sejam excitados para um estágio triplet quantico com a energia de um fóton de UV. Esses grânulos de melanina excitados transportam a energia para o DNA criando dímeros de pirimidina ciclobutano sem fonte de luz. Nas condições experimentais e com a linhagem celular utilizada no presente trabalho, também foi observado um aumento significativo da formação de espécies reativas de oxigênio após a exposição ao UV, indicando que esse fenômeno merece ser melhor estudado, para compreender o real papel das ERO na citotoxicidade e sua possível interação com os compostos presentes no extrato glicólico de *Aloe vera*.

Vários estudos com extratos de *Aloe vera*, obtidos por diferentes métodos de extração, têm apontado as antraquinonas com responsáveis, pelo menos em parte, por efeitos biológicos como indução de espécies reativas de oxigênio, inativação celular e ação antiproliferativa, por exemplo.PERECE e colaboradores (2000), descrevram a Aloe-emodina como inibidora seletiva da linhagem celular de tumor humano neuroectodermal, em cultura de tecidos e em modelos animais. Além disso, o neuroblastoma, um tumor neuroectodérmico periférico e células de sarcoma de Ewing foram susceptíveis a antraquinona, enquanto que células epiteliais malignas e células tumorais derivadas do sangue, fibroblastos e células progenitoras

hematopoiéticas humanas não foram sensíveis ao composto (PERECE et al., 2000). A aloína, uma outra antraquinona presente na babosa não apresentou citotoxicidade em células endoteliais vasculares umbilicais humanas, todavia inibiu o fator de crescimento endotelial angiogênico, um fator essencial para o desenvolvimento vascular de tumores (PAN et al., 2013). O mesmo grupo também fez a análise em linhagens celulares de cancer coloretal humano, observando uma supressão da viabilidade ceular em concentrações de aloína superiores a 200 μmol/L. NICIFOROVIC et al. (2007), também identificaram um potencial antiproliferativo da aloína em células de carcinoma uterino humano (HeLaS3), ocasionando uma parada do ciclo celular na fase S e marcando o aumento da apostose dessa célula, sendo considerada um possível agente de escolha para estudos clínicos para o tratamento do câncer uterino.

A emodina também pode mediar a formação de espécies ativas de oxigênio a indução de apoptose por ativação de caspases e a inibição do crescimento celular em células da linhagem A549 (SU et al., 2005). Os autores afirmam ainda, que o tempo de exposição leva a um aumento persistente dessas espécies reativas.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo e são sustentados por dados da literatura, sugerindo que a citotoxicidade apresentada pelo extrato glicólico de *Aloe vera* pode ser devida à produção de ERO por substâncias presentes na preparação(BOSCH et al., 1987; WAMER et al., 2003; XIA et al., 2007). Neste caso, não foi causada pela emodina. Além disso, o tempo e a concentração de exposição ao extrato vegetal estão relacionados com a diminuição da viabilidade. E ainda, a associação com a radiação UVA pode promover uma produção mais rápida e acelerada de ERO, que poderia ser a responsável pela diminuição da viabilidade observada. Como a associação entre a radiação UVA e o extrato glicólico de *Aloe vera* mostrou uma citotoxicidade aumentada, e considerando que o consumo pela população de produtos de uso tópico contendo *Aloe vera*, seguido de exposição à luz solar é algo frequente, é relevante dar continuidade a esse estudo buscando compreender melhor a ação da radiação ultravioleta e sua interação com os componentes do extrato, além de identificar outras antraquinonas que podem estar presentes no extrato comercial e relacionar seu envolvimento nos efeitos biológicos induzidos nas células.

CONCLUSÕES

- Proporções de extrato glicólico de *Aloe vera* abaixo de 6,25% não induziram morte celular na linhagem A549 e parecem ser seguras para compor cosméticos e outros produtos dermatológicos*;*
- As proporções de 50, 25 e 12,5% foram citotóxicas para a linhagem testada, não sendo recomendada sua utilização na confecção de produtos dermatológicos*;*
- A associação com a radiação ultravioleta potencializou a ação citotóxica do extrato glicólico de *Aloe vera*, tornando inclusive a proporção de 6,25% tóxica para as células A549;
- A determinação da viabilidade celular pelametodologia do WST-1 pode sofrer interferência da radiação UVA;
- Os efeitos biológicos não foram causados pela emodina;
- A exposição aos raios ultravioleta não promovem alteração no perfil espectrofotométrico do extrato glicólico de *Aloe vera*;
- A associação entre a radiação UVA e o extrato de *Aloe vera* parece promover a formação de espécies reativas de oxigênio e contribuir para a diminuição da viabilidade das células.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a genotoxicidade induzida pelo extrato glicólico e pela sua associação com a radiação UVA;
- Determinar a potencialidade mutagênica do extrato e de sua associação com a radiação UVA;
- Identificar as antraquinonas presentes no extrato e sua possível relação com os efeitos biológicos observados;
- Identificar as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo extrato e luz UV;
- Medir a atividade de enzimas antioxidantes relacionadas à detoxificação celular;
- Relacionar a expressão de genes relacionados ao equilibrío redox em células incubadas com o extrato e com a radiação UV;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *Aloe vera* em uma linhagem não neoplásica com a finalidade de identificar uma possível atividade antineoplásica da *Aloe vera*;
- Avaliar o efeito do extrato glicólico de *Aloe vera* e de sua associação com a radiação UVA em melanócitos.

REFERÊNCIAS

ADUSUMILLI, O.S. et al. Acalculuos eosinophilic cholecystitis from herbal medicine: A review of adverse effects of herbal medicine in surgical patients. **Surgery 131**: 352-356, 2002.

AHLAWAT, K.S. & KHATKAR, B.S. Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review. **Journal of Food Science and Technology**.48(5): 525–533, 2011.

AKERELE O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **HerbalGram28** : 13-19, 1993

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia 18**: 455-463, 2008.

AMORIM, M.F.D. et al. The controvertible role of kava (*Pipermethysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia 17:** 448-454, 2007.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.2, p.189-203, 2002.

AMOROZO, M.C.; GELY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Barbacena, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v.4, n.1, p.47-131, 1988.

ANVISA (Brasil).Informe Técnico nº 47, de 16 de novembro de 2011**. Esclarecimentos sobre comercialização de *Aloe vera* (babosa) e suas avaliações de segurança realizadas na área de alimentos da ANVISA**. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c66ea5804924c8f49d829f14d1687af/Informe_Tecnico_n_47_de_16_de_novembro_de_2011.pdf?MOD=AJPE ES>. Acesso em: Fevereiro de 2016

ASLANI, A., GHANNADI, A. &RADDANIPOUR, R. Design, formulation and evaluation of *Aloe vera* chewing gum. **Advanced Biomedical Research**. 4: 175, 2015.

ATHERTON, P. *Aloe vera:* myth or medicine. Disponível em: <http://www.positivehealth.com>. Acesso em: Fevereiro de 2016, 1997.

ATHERTON, P. First aid plant. **Chemistry in Britain**.34:33–36, 1998.

AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.N. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta BotanicaBrasilica**, v.20, n.3, p.185-94, 2006.

AZQUETA, A; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch.Toxicol.**v.87, p.949-968, 2013.

BAHMANI, B. *et al*. The Lcn2 engineered HEK-293 cells show senescence under stressful condition. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences,** Vol. 18, No.5,May, 2015.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine33**: S498–S501, 2005.

BHERING, C.A. **Avaliação da toxicidade da emodina e sua associação com radiação ultravioleta A em cepas de *Escherichia coli* e células da linhagem A549**. 2012, 77p. Dissertação(Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de CiênciasMédicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 2012.

BORBA, A.M.; MACÊDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.20, p.771-82, 2006.

BOUDREAU M.D.; BELAND F.A.An evaluation of the biological and toxicological properties of Aloe barbadensis (miller), Aloe vera.**Journalofenvironmental scienceandhealth**. Apr;24(1):103-54, 2006.

BOSCH, R. et al. Investigation on DNA binding in rat liver and in Salmonella and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone. **Mutation Research**. 188; 161–168, 1987.

BOZZI, A. et al. Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. **Food Chemistry.**103: 22–30, 2007.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; CZICH, A.; EPE, B.; GOCKE, E.; KAINA, B.; MÜLLER, L.; POLLET, D.; UTESCH, D. Photochemical genotoxicity: principles and test methods Report of a GUM - task force.**Mutation Research**. 566; 65–91, 2004.

BROOKER, R.J. Genetics: analysis and principles (4th ed.). **McGraw-Hill Science**, 2011.

BROWN, D.A. Skin pigmentation enhancers**. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology** 63; 148–161, 2001.

BUDAI, M. et al. Effect of UVA radiation on membrane fluidity and radical decay inhuman fibroblasts as detected by spin labeled stearic acids.**Journal ofPhotochemistry and Photobiology. B: Biology** 77; 27–38, 2004.

BUDAI, M. et al. Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production andexpression of NLRP3 inflammasome in human macrophagesMarietta.**Molecular Immunology 56**, **471– 479**, 2013.

CADET, J. et al. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation.**PhotochemistryPhotobiology Science**. 8: 903-911, 2009.

CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. & FAVRE, A. Near ultraviolet DNA damage induces the SOS response in Escherichia coli. **The embojournal**.; 5(1): 175-9, 1986.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian JournalofMedicaland Biological Research33**: 179-189, 2000.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia 71**: 58-65, 2000.

CARVALHO A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 18(2):314-319, 2008.

CASTELLUCCI, S. et al. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na Estação Ecológica de Ataí, Município de Luis Antonio/SP: uma abordagem etnobotânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v.3, n.1, p.51-60, 2000.

CHANDAN, B.K. et al. Hepatoprotective potential of Aloe barbadensis Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Journal Ethnopharmacol**; 111:560-566, 2007.

CHIARELLI-NETO, O. et al. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **Plos One, Volume 9**, Issue 11, e113266, 2014.

CHIANG, H.M. et al. Determination of marked components – Aloin and aloe-emodin- in *Aloe vera* before and after hydrolysis. **Journal of Food and Drug Analisys, vol. 20, N.3, pages 646-652**, 2012.

CHOI, S. & CHUNG, M.H. Aloe vera componentes and their biological effects.Seminars in integrative medicine. Vol 1, Nº1, p. 53-62, 2003.

CHOW, J.T. et al. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L.Ⅱ **Carbohydrate Research.** 340: 1131–1142, 2005.

COATS, B.C. Hypollergenic stabilized aloe vera gel. **US Patent number**. 4 178 172, 1979.
COELHO, H.L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Cadernos de Saúde Pública 14**: 871-875, 1998.

CONSEJO INTERTERRITORIAL DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD-MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO(MADRID). Protocolo de Vigilancia Sanitaria Específica para los trabajadores expuestos a Agentes Citostáticos adoptóel 11 de noviembrede 2003. Disponível em: <http://www.msssi.gob.es/en/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/ Agentescitostaticos.pdf.> Acesso em: Fevereiro 2016.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum.* **Revista Brasileira deFarmacognosia 15:** 272-278, 2005.

CORTES-GUTIERREZ, E. I. et al; New application of the comet assay: chromosome--comet assay. **J.Histochem.Cytochem.**v.59; p.655-660, 2011.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW, WASHINGTON DC 20036, (USA). Final report on the safety assessment of AloeAndongensis Extract, Aloe Andongensis Leaf Juice,aloe Arborescens Leaf Extract, Aloe Arborescens Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Protoplasts, Aloe Barbadensis Flower Extract, Aloe Barbadensis Leaf, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Aloe Barbadensis Leaf Juice,aloe Barbadensis Leaf Polysaccharides, Aloe Barbadensis Leaf Water, Aloe Ferox Leaf Extract, Aloe Ferox Leaf Juice, and Aloe Ferox Leaf Juice Extract. **International journal of toxicology**.26 Suppl 2:1-50**,** 2007.

COSTA, A.F. Farmacognosia. **Fundação Calouste Gulbenkian**. II Volume; p225-241 e 274-280, 5ª edição, 2012.

COUTINHO, D.F. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão. **Visão Acadêmica**, v.3, n.1, p.7-12, 2002.

DAGNE, E. et al. Chemistry of Aloe species.**Current Organic Chemistry.**4: 1055-1078,2000.

COURDAVAULT, S. et al. Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. Mutat Res. 22;556(1-2):135-42, 2004.

DAY, B. J.; Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochem.Pharmacol.**v.77, p.285-296, 2009

DEFFERT, C.; CACHAT, J.; KRAUSE, K.H. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. **Cellular Microbiology 16 (8):** 1168–78, 2014.

DEVASAGAYAM T.P.A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India 52**:794 804, 2004.

DEVASAGAYAM, T.P.A. et al.Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **Journal of Association of Physicians of India (JAPI) 52***:* 796, 2014.

DIFFEY, L.B. Sources and measurement of ultraviolet radiation. **Methods,**Volume 28, Issue 1, September, Pages 4–13, 2002.

DJAFOUA Y.M. et al. Immunomodulatory activity of methanol leaf extracts of Cameroonian medicinal plants. **Journal Complementary Integral Medicine**, 2194-6329, DOI: 10.1515/jcim-2014-0023, 2015.

DOUKI, T. et al. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry**. 5;42(30):9221-6, 2003

DUANSAK, D., SOMBOONWONG, J. & PATUMRAJ, S. Effects of Aloe vera on leukocyteadhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. 29, 239–246, 2003.

EL-GHORR, A. A.; NORVAL, M. Biological effects of narrow-band (311 nm TL01) UVB irradiation:a review.**Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology38**, 99-106, 1997.

ESHUN, K.; HE, Q. *Aloe vera* a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries - A Review. **Food Science and Nutrition,** 44: 91–6**,** 2004.

ESTEBAN-CARRASCO, A et al. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: Possible involvement in defense reactions. **Plant Physiology andBiochemistry.** v. 39, p. 521-527, 2001.

ESHUN, K. &HE, Q. Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries--a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 44(2):91-6, 2004.

ESUAA, M. F.; RAUWALDB, J. Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. **Carbohydrate Research.** 341: 355–364, 2006.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance**. Mutation Research, 567**, 1–61, 2004.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: Farmacognosia da planta ao medicamento[SIMÕES, C. M. O. et al.org]. Florianópolis/Porto Alegre: **Editora daUFSC/Editora da UFRGS**, 2004.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análisefitoquímica. In: Farmacognosia da planta ao medicamento [SIMÕES, C. M. O. et al.org].Florianópolis/Porto Alegre: **Editora da UFSC/Editora da UFRGS**, 2004.

FAN, W.; HUANG, J.; XIAO, H. Histone deacetylase 10 suppresses proliferation and Invasion by inhibiting the phosphorylation of β-catenin and serves as na independent prognostic factor for human clear cell renal cell carcinoma. **International Journal ofClinical and Experimental Medicine**; **8(3):3734**-3742, 2015.

FRANCO, I.J.; FONTANA, V.L. Ervas e plantas:a medicina dos simples. **Erexim: Edelbra**, p. 246, 2002

FRANCOEUR, A.M.; ASSALIAN, D.A. MICROCAT: A Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Based on WST-1. **Biochemica**, nº 3, 1996.

FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v.16, n.2, p.299-307, 2014.

FUCK, S.B. et al. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da zona urbana de Bandeirantes, Paraná. **Semina**, v.26, n.3, p.291-6, 2005.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **NatureReviews Drug Discovery.**9 (6): 447–64, 2010.

FUNARI, C.S.; FERRO V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia 15**: 178-182, 2005.

GALLAGHER, J.; GRAY, M. Is aloe vera effective for healing chronic wounds? **Journal of Wound Ostomy &Continence Nursing**, 30 (2), 68–71, 2003.

GALLO M. et al. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. **Archives of Internal Medicine *160***: 3141-3143, 2000.

GENOVÉS, J.S. et al. Consumo de hierbas medicinales y medicamentos. **AtenciónPrimaria 28**: 311-314, 2001.

GENOVESE et al. Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones Aloe-emodine, emodine, Rheine, Chrysophanol and Physcione in the bark of Rhamnus alpinus L.(Rhamnaceae).**Phytochemical analisys, 21, 261-267,** 2010.

GIBSON, S.B. A matter of balance between life and death: targeting reactive oxygen species (ROS)-induced autophagy for cancer therapy. **Autophagy.**6 (7): 835–7, 2010.

GONÇALVES, M.I.A.; MARTINS, T.D.O. Plantas medicinais usadas pela população do município de Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso. **Revista Brasileira deFarmácia**, v.79, n.3, p.10-25, 1998.

GROFF, A. A. *et al*. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in Colossoma macropomum and Arapaima gigas Amazonian fish. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 99**, 93–99, 2010.

GUARATINE, T., MEDEIROS, M.H.G., COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redoz cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia.**Química nova, vol 30, 1,206-213,** 2007.

GUERTLER, A. et al. The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation sensitive individuals. **Radiation Protection Dosimetry,** Vol. 143, No. 2–4, pp. 487–490, 2010.

GUO, X. et al. In vitro investigation of the mutagenic potential of *Aloe vera* extracts. **Toxicology research, 3, 487**, 2014

GUPTA, S.C. et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxidants & Redox Signaling.** 16 (11): 1295–322, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5ª ed. USA: Oxford University Press, 2015.

HAMMAN, J.H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**,13: 1599-1616, 2008.

HAMPTON, M.B.; ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. **FEBS Letters.** 414 (3): 552–6, 1997.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **The Biochemical Journal.** 353 (Pt 2): 411–6, 2001.

HANSON, K.M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C.J. Sunscreen enhancement of UVinduced reactive oxygen species in the skin.**Free Radical Biology & Medicine, 41**;1205–1212, 2006.

HARTMAN, L.A. et al. Effects of low molecular constituents from *aloevera* gel on oxidative metabolism and cytotoxic and bactericidal activities of humanneutrophils, **International Journal lmmunopharmacology**., Vol. 12, No. 4, pp. 427-434, 1990.

HASHEMI, A.S.; MADANI, A.S.; ABEDIANKENARI, S.The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. **BioMed Research International**. Article ID 714216, 6 pages, 2015.

HU, L.W., et al. Diurnal variations in solar ultraviolet radiation at typical anatomical sites. **Biomedical and environmental sciences.** 23, 234-243, 2010.

HUANG, X-Z et al. The mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1**. Cancer Biology & Therapy**, 7:3, 1-8; 2008.

HUR, S. et al. Homoisoflavanone inhibits UVBinduced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kB nuclear localization**. Journal of Dermatological Science.** 59: 163–169, 2010.

HWANG, Y.J. et al. In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from prunella vulgaris var. lilacina. **BMC complementary and alternaty medicine**,13:310, 2013.

IRANI, K. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. **Science 275 (5306)**: 1649–52, 1997.

IRWIN, M.L. et al. Influence of pre- and postdiagnosis physical activity on mortality in breast cancer survivors: the health, eating, activity, and lifestyle study. **Journal of Clinical Oncology 26 (24)**: 3958–64, 2008.

JIANG, Y. et al. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly**. Biophysical Journal. 96(3)**:1151-8, 2009.

JOSEPH, B. & RAJ, S.J. Pharmacognostic and phytochemical properties of *Aloe vera* linn-an overview. **International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research.**4:106–10, 2010.

KAWAGISHI, N. et al. Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB irradiation: Apoptosisinduced by UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition.**Journal of**

Dermatological Science 18: 43–53, 1998.

KAY, M.M.B. et al .Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., v.83, p.2463-2467, 1986

KIM, H.J. et al. Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-λ regulation in human nasal epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 49 (5)**: 855–65, 2013.

KIM, K.; PARK, H.; LIM, K.M. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. **Toxicogical Resolutions,** Vol. 31, No. 2, pp. 97-104, 2015.

KONG Q.; BEEL, J.Á.; LILLEHEI, K.O. A threshold concept for cancer therapy. **Medical Hypotheses55(1)**: 29–35, 2000.

KOYANAGI, M., KAWAKABE, S. & ARIMURA, Y. A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. **Cytotechnology**, 2015.

KOZMIN, S. et al. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae.**Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 20;102(38):13538-43, 2005.

KUNKEL, T.A. The high cost of living, American Association for Cancer Research Special Conference: endogenous sources of mutations**.Trends Genet.** 15, pp. 93–94, 1999.

LALOI C.; HAVAUX, M. Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. **Frontiers in Plant Science 6**: 39, 6: 39, 2015.

LAWLESS J, ALLEN J. Aloe vera- Natural wonder care. Hammersmith: **Harper Collins Publishers**. pp. 5–12, 2000.

LEE, S.H. et al.Antimetastic effects of *Phyllanthus* on human lung(A549) and breast(MCF-7) Cancer cell lines. **Plos one,** 6(6): e20994. doi:10.1371/journal.pone.0020994, 2011.

LEBEL, C.P., ISCHIROPOULOS, H., BONDY, S.C..Evaluation of the probe 20,70 dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemistry Research Toxicology 5, 227–231,**1992.

LIEBER, M. et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells**. International Journal of Cancer.** 17: 62-70, PubMed: 175022, 1976

LIBERMAN, D.F. et al.. Mutagenicity of islandicin and chrysophanol in the *Salmonella/*microsome system. **Applied Environmental Microbiology**; **40**: 476-9, 1980.

LIOU, G.Y & STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer.**Free radical research(44)5**, 2010.

LU, Q.Y. et al. Effects of green tea extract on lung cancer A549 cells: proteomic

identification of proteins associated with cell migration. **Proteomics.** 9(3): 757-67, 2009.

LUTA, G.; MCANALLEY, B.H. Aloe vera: chemical composition and methods used to determine its presence in commercial products. **GlycoScience Nutrition**.6(4):1 12, 2005.

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl.1, p.40-4, 2004

MACHLIN, L.J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J. 1 ed**., , p. 441-445, 1987

MAENTHAISONG, R. et al. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. **Burns**; 33:713-718, 2007.

MAIPAS, S.; NICOLOPOULOU-STAMATI, P. Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. **Hormones 14(1)**: 32-46, 2015.

MAIURI, M.C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 8 (9): 741–52, 2007.

MANDRIOLI, R. et al. Determination of Aloe emodin in *Aloe vera* extracts and commercial formulations by HPLC in tandem UV absorption and fluorescence detection. **Food Chemistry 126, 387-393**, 2011.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. **International jornal of molecular sciences 16**: 68-90, 2015.

MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology.** 192 (1): 1–15, 2002.

MEADOWS, T.P. Aloe as a humectant in new skin preparation. **Cosmet Toiletries**. 95(11):51–56, 1980.

MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ. **ActaBotanica Brasilica**, v.18, n.2, p.391-9, 2003.

MELLO, G. S.; MATTOS, J. C. ; AMARAL, A. C. ; AMORIM, L. ; ARAUJO, A.C. ; ALBARELLO, N. . Assesment oh the genotoxic and antigenotoxic potential of crude extracts and fractions of Schwartzia brasiliensis (Choisy) Bedel ex Giraldo-Cañas**. Journal of Medicinal Plant Research**, v. 9, p. 223-230, 2015

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomamy Indians of Brazil. **Economic Botany**, v.50, n.1, p.10-25, 1996.

MOLENAAR, R.J.; VAN NOORDEN, C.J. Type 2 diabetes and cancer as redox diseases? **Lancet 384 (9946)**: 853, 2014.

MOORE, Z.; COWMAN, S. A systematic review of wound cleansing for pressure ulcers. **Journal Clinical Nurs**; 17:1963-1972, 2008.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento**. Anais Brasileiros de Dermatologia. Vol.84(3):**263-9, 2009.

MONTALDI, A. P. L. **Avaliação da resposta celular mediada pelo quimioterápicotemozolomida associada ao inbidor de reparo do DNA metoxiamina em linhagens de glioblastoma.** 2009. 62p. Dissertação (Mestrado em genética,Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo, 2009.

MOURET, S. et al. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism?**Organic Biomolecular Chemistry 7**;8(7):1706-11, 2010.

MULLER, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. **Journal of the American Aging Association *23*(4):**227–53, 2000.

MULLER, F.L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology & Medicine 43 (4)**: 477–503, 2007.

MURATA, M.M. **Indicadores de efeito e avaliação do risco toxicológico na exposição à sílica**. 2014, 79p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental, Faculdade de CiênciasMédicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 2014.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP toxicology and carcinogenesis studies of emodin (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice. **National Toxicology Program Technical Report Series**; **493**: 1-278, 2001.

NI,Y. et al. Isolation andcharacterizationof structural components of Aloe vera L. **International Immunopharmacology,** 4: 1745 – 1755.-55, 2004.

NI, Y. et al. Stabilization of growth factors relevant to wound healing by a plant cell wall biomaterial. **Planta Medicinal**; 73:1260-1266, 2007.

NICIFOROVIC, A. et al. Adjuvant antiproliferative and cytotoxic effect of aloin in irradiated HeLaS3 cells. **Biophysical Chemistry**; **81: 1463–1466**, 2007.

NORDBERG. J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system.**Free Radical Biology & Medical, v.31**, p.1287-1312, 2001.

NUNES, G.P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.83-92, 2003.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense.**Revista brasileira de plantas medicinais**, volume 12, n º 3, Botucatu- SP, 2010.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**96 (9): 2181–96, 2007.

OMOYENI, A.O. et al. Pleiocarpa pycnantha leaves and its triterpenes induce apoptotic cell death in Caco-2 cells in vitro.**BMC Complementary and Alternative Medicine,** 15:224, 2015.

PAN, Q. et al. Inhibition of the angiogeneses and growth of Aloin in human colorectal câncer. **Cancer cell international, 13:69,** 2013

PASCHOAL, J.J. et al. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.249-255, 2003

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R; LEMOS, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira deFarmacognosia**, v.14, supl. 1, p.37-40, 2004.

PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H.; BESARATINIA, A. Mutations induced by ultraviolet light.***Mutation Research***, 571: 19-31**,** 2005.

PERECE, T. et al.Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective Activity against Neuroectodermal Tumors. **Cancer research 60, 2800–2804, june 1**, 2000.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas Medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p.751-62, 2006.

PREMI, S. et al. Chemiexcitation of melanin dderivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science Vol. 347, Issue 6224, pp. 842-847**, 2015.

RADHA, M. H. & LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review.**Journal of Traditional and Complementary Medicine 5, 21 e 26**, 2015.

RAHMAN, S.Z.; SINGHAL, K.C. Problems in pharmocovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports 17**. January Suplement, 2002.

RAMSEY, M.R.; SHARPLESS, N.E. ROS as a tumour suppressor? **Nature Cell Biology 8 (11)**: 1213–5, 2006.

RAVANAT, J.C. et al. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **The jornal of biological chemistry 51:** vol.275, December 22 , pp. 40601-40604, 2000.

RÊGO, T.J.A.S. Levantamento de plantas medicinais na baixada maranhense. **Acta Amazônica**, v.18, n.2, p.75-88, 1998.

REYNOLDS, T.; DWECK, A.C.Aloe vera leaf gel: a review update.**Journal of Ethnopharmacology**. 68(1-3):3-37, 1999.

RENSCHLER, M.F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. **European Journal of Cancer 40 (13)**: 1934–40, 2004.

RITTER, M.R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, rio Grande do Sul**. Revista Brasileirade Farmacognosia**, v.12, p.51-62, 2002.

ROBINSON, K. S. et al. Cyclobutane pyrimidine dimers are photosensitised by carprofen plus UVA in human HaCaT cells.**Toxicology in Vitro24(4)**:1126-32, 2010.

ROCHE.**Cell Proliferation Reagent WST-1**. Manual Versão 16/ Fevereiro de 2011.Disponível em: <http://www.molecularinfo.com/MTM/J/J2/J2-2/J2-2.pdf >. Ultimo acesso em: Fevereiro de 2016

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio grande, Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v.25, n.1, p.102-23, 2001.

RÜNGER,T.M.; KAPPES, U.P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA)**. Photodermatol Photoimmunol Photomed; 24**: 2-10, 2008.

SAITO, S.T. et al. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. **Journal of Photochemistry and photobiology B: biology 11,59-63**, 2012.

SANTOS, M.A. et al. Estimating the selectivity of ozone in the removal of polyphenols from vinasse. **Journal of chemical technology and biotechnology80**, (4)**:** 433–438, 2005.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In:Farmacognosia da planta ao medicamento [SIMÕES, C. M. O. et al.org]. Florianópolis/Porto Alegre: **Editora da UFSC/Editora da UFRGS**, 2004.

SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology.**17 (9): 422–7, 2007.

SCHUCH, A.P. et al. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochemical & photobiological sciences 8**: 111-120, 2009.

SCHUCH, A.P.; MENCK, C.F.M. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight, **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology**, 99: 111-116**,** 2010.

SCHUMACKER, P.T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. **Cancer Cell 10 (3)***: 175–6, 2006.*

SHALABI, M. et al.Anticancer activity of *Aloe vera* and *Calligonum comosum* extracts separetely on hepatocellular carcinoma cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**; **5(5): 375-381**, 2015

SHARRIF, M.M.; SANDEEP, K.V. Aloe vera their chemicals composition and applications: A review, **International Journal of Biological & Medical Research**; 2(1): 466-471, 2011.

SHELTON, M.. Aloe vera, its chemical and therapeutic properties. **International Journal Dermatology**.30:679–683. doi: 10.1111/j.1365-4362.1991.tb02607, 1991.

SHEN, X. et al. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation.**Journal of PlantPhysiology, 167**, 1248–1252, 2010.

SHORROCKS, J.; PAUL, N.D. & MCMILLAN, T.J. The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**. Mar;128(3):685-93, 2008.

SHRIVASTAVA, A. et al. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. **Molecular Cancer Therapeutics 10 (7)**: 1161–72, 2011.

SILVA, H. et al. Effect of water availability on growth and water use efficiency for biomass and gel production in Aloe vera (Aloe barbadensis M.). **Industrial Crops and Poducts 31**: 20-27, 2010.

SILVA, M.I.G. **Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) no Município de Maracanaú-CE. Fortaleza**, 144p. Dissertação deMestrado - Faculdade de Farmácia, Odontologia eEnfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2003.

SILVA, M.I.G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia 16**: 455-462, 2006.

SILVA M.V.; RITTER, M.R. Plantas Medicinais e tóxicas da Reserva Biológica do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, **Revista de Botânica 57**: 61-73, 2002.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.;ARRAIS, P.S.D.Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.**Revista Brasileira de Farmacognosia 18(4)**: 618-626, 2008.

SIMS, P.; RUTH, M. & ZINMERMAN, E.R. Effect of aloe vera on Herpes simplex and Herpes virus (strains Zoster). **Aloe vera of American Archive**. ;1:239–240, 1971.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grandedo Sul**. 5ª Edição, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 174 p., 1998

SINGH, B.; SOOD, N. Significance of explant preparation and sizing in Aloe vera L.A highly efficient method for in vitro multiple shoot induction. **ScientiaHorticulturae**. 122:146-151, 2009.

SINGH, N.P.; MC COY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research,** v. 175, p. 184–191, 1988.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage.**Mutation Research**. 531: 231-51, 2003.

SOARES, A.K.A. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikaniaglomerata, Grindelia robusta, Copaifera offi cinalis,Myroxylon toluifera, Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognia16**: 447-454, 2006.

SOLOWEY, E. et al. Evaluating of medicinal plants for anticancer activity.**The Scientific World journal**. Article ID 721402,12 p, 2014.

SOSA TORRES, M.E., SAUCEDO-VÁZQUEZ, J.P., KRONECK, P.M**.** Chapter 1, Section 3 The dark side of dioxygen. In Kroneck PM, Torres ME. Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases. **Metal Ions in Life Sciences 15.** Springer**.** pp. 1–12, 2015

SPERANZA, G. et al. Aloeresin I an anti-inflammatory 5-methylchromone from cape aloe. **Planta Medicinal**; 71:79-81, 2005.

SOUSA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta BotanicaBrasilica**, v.20, n.1, p.135-42, 2006.

STARY, A.; SARASIN, A. Ultraviolet A- and singlet oxygen-induced mutation spectra, **Methods Enzymology**, 319: 153–165, 2000.

STRICKLAND, F. M. et al. Induction of primary cutaneous melanoma in C3H mice by combined treatment with ultraviolet radiation, ethanol, and aloe emodin. **Photochem. Photobiol**. 72:407–414; 2000

SU, Y.T. et al. Emodin induces apoptoses in human lung adenocarcinoma cells throught a reactive oxygen species –dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochemical Pharmacology, 70;229-241**,2005.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability**. Current Protocols in Immunology.**;111:A3.B.1-3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111, 2015.

TANAKA, M. et al. Identification of Five Phytosterols from Aloe vera Gel as Anti-diabetic Compounds. **Biological andPharmaceutical Bulletin** 29(7) 1418-1422, 2006.

TANAKA, S. et al. Preventions of UVB induced photoinflammation and photoaging by polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro.**Biochemical Pharmacology, 68**, 433–439, 2004.

TAKAHASHI, A. et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. **Nature Cell Biology 8 (11)**: 1291–7, 2006.

TENNANT, J.R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for determination of cell viability. **Transplantation articles**. Vol.2, Nº 6, 1964.

TIAN, B.; HUA, Y. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. **Food Chemistry.**91: 413–418, 2005

TICE, R.R et al. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental andMolecular Mutagenesis,** 35: 206-221**,** 2000.

TIZARD I.R. & RAMAMOORTHY L. Aloes and the immune system, Vol. 38. In: Reynolds T, editor. Aloes: the genus Aloe. **Boca Raton: Medicinal Aromatic Plants – Industrial Profiles; 311–332**, 2004

TOCHHAWNG, L. et al. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. **Mitochondrion.**13 (3): 246–53, 2013.

TOLER, S.M.; NOE, D.; SHARMA, A. Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme. **Neurosurgical Focus.** 21 (6): E10, 2006.

TRACHOOTHAM D.; ALEXANDRE J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nature Reviews. **Drug Discovery 8** (7): 579–91, 2009.

TRAVACIO, M.; LESUY, S. Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. **Ciência e Cultura, São Paulo.** v. 48, p.9-13, 1996.

TURRENS, J.F.Mitochondrial formation of reactive oxygen species**. Journal Physiology.** (Lond.) 552 (Pt 2), 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Natural Resources conservation Service. Plants Database**. Disponível em: «http://plants.usda.gov/java/profile ?symbol=ALVE2» Acesso em: Fevereiro 2016.

UNKEL, S.; BELKA, C. & LAUBER, K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to linear-quadratic model. **Radiation oncology**.11:11, 2016**.**

VAN MEERLOO J.; KASPERS, G.J. & CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay**. Methods in molecular biology.;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20, 2011**

VAN RAAMSDONK, J.M.; HEKIMI, S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in Caenorhabditis elegans. **PLoS Genetics.** 5 (2), 2009.

VASCONCELOS, S.M.L. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova, vol 30,5,1323-1338**, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognósia18**: 308-313, 2008.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M..Medicinalplants:safe cure?**Química Nova**,28: 519-528,2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.S. Aspectos Químicos, Biológicos e Etnofarmacológicos do gênero Cassia. **Química Nova, v. 29, n.6, p. 1279-286**, 2006.

VILE, G.F.; TYRRELL, R.M. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. **Free Radical Biology & Medicine, Vol. 18**, Nº 4, pp. 721-730, 1995.

VIOLANTE, I.M.P. et al. Avaliação in vitroda atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 19(2A), p. 452-457**, 2009.

WAMER, W.G.; VATH, P.; FALVEY, D.E. In vitro studies on the photobiological properties of Aloe Emodin and Aloina A. **Free Radical Biology and Medicine,** 34: 233-242, 2003.

WANG, H.; KOCHEVAR, I.E. Involvement of UVB-induced Reactive oxygen species in TGF-h biosynthesis and activation in keratinocytes.**Free Radical Biology &Medicine, 38**, 890– 897, 2005.

WANG, Y. et al. Experimentaland theoretical studies on the photoinduced acute toxicity of a series of anthraquinone derivatives towards the water flea (Daphnia magna). **Dyes andPigments**, 83; 276–280, 2009.

WANG, P.G. et al. Simultaneous determination of aloin A and aloe emodin in products containing Aloe vera by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **AnalyticalMethods**, 4, 3612, 2012.

WANG, Y.T. Bases of aloe certification. **Aloe Today** 27–29, 1993.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis 5**: 14, 2006.

WATSON, J.D. Type 2 diabetes as a redox disease. **Lancet 383 (9919)**: 841–3, 2014.

WEST, A.P.; SHADEL, GS; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses.**Nature Reviews Immunology 11**: 389-402, 2011.

WHITE, R.M.; ZON, L.I. Melanocytes in Development, Regeneration, and Cancer. **Cell Stem Cell 3, Elsevier Inc**, 2008.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, 64, p. 3–19, 2003.

WIJNSMA,R. **Anthraquinonesandalkaloids incellandtissueculturesof*Cinchona* species**. 131 p.Tesis (Doctor in Farmacognosy)–LeidenUniversity, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO). **Monographs on selected medicinal plants**. Volume 1. Disponível em: < http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>. *Acesso em:* Fevereiro 2016, 2009.

XIA, Q. et al. Photo-irradiation of *Aloe vera* by UVA - Formation of free radicals singlet oxygen, superoxide, and induction of lipid peroxidation. ***Toxicology Letters***. 168: 165-175, 2007.

XIE, Z.; KLIONSKY, D.J. "Autophagosome formation: core machinery and adaptations". **Nature Cell Biology.**9 (10): 1102–9, 2007.

YI, J. et al. Emodin Enhances Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis via Generation of Reactive Oxygen Species and Inhibition of Survival Signaling**. Cancer Research**, 64, 108–116, 2004.

.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; CHUANG, D.Y. Antioxidant activity of anthraquinonesand anthrone. **Food Chemistry**. v. 70, p. 437-441, 2000.

ZHANG, X. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review.***Bulletin* of the *World Health Organization(WHO)***,Geneva, 1998.

ZHUO, J.;SUN, G. Light-induced surface graft polymerizations initiated by ananthraquinone dye on cotton fibers. **Carbohydrate Polymers**. Volume 112, p.158, 2014.

ZONTA, F. et al. High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. **Journal of Chromatography A.** 718: 99-106. 55, 1995.

ANEXO- Extrato glicólico de Aloe Vera (HG)

EXTRATO GLICÓLICO DE ALOE VERA (HG)

Nome Científico: *Aloe barbadensis*
INCI: Aloe (Aloe Vera) Leaf Extract
Nº CAS: 85507-69-3; 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 26172-55-4/2682-20-4; 99-76-3
Parte Utilizada: Suco condensado seco das folhas
Fórmula Molecular: N.A
Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Compostos antracênicos (aloína, aloe-emodina, aloinase); mucilagem; carbohidratos; polissacarídeos; ácido crisofânico; enzimas (celulose, carboxipeptideos, catalase, amilase, oxidose), aminoácidos; vitaminas B, C e E; e sais minerais.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Aloe Vera tem ação emoliente, cicatrizante, tonificante, antiinflamatória, suavizante, lenitiva, refrescante, hidratante, protetora e restauradora de tecidos. Usado em preparações lenitivas para peles delicadas, sensíveis, irritadiças e/ou secas. Também é indicado para tratamento da acne, psoríase, coceiras, eczemas, erisipela, picadas de insetos e de pequenos ferimentos (como cicatrizante). Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho, loção de limpeza, filtros solares e outros produtos cosméticos.

DOSAGEM

Em cremes, géis, leites e loções de tratamento - 1,0 a 5,0%. Em cremes dentais - 1,0 a 3,0%.
Em shampoos, condicionadores e sabonetes - 2,0 e 10,0%. Em desodorantes cremosos ou líquidos - 1,0 e 5,0%.
Atenção: O Extrato Glicólico de Aloe Vera deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45o C. Uso Externo.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo do calor e da luz solar direta.
Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.
Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina – Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL,1998.
Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.
Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.
Encyclopédie des Plantes Médicinales. Ed. Larousse-Bordas, 1997.

Av. Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55 (11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br