



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

POTENCIAL DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA COMO INGREDIENTE BIOATIVO
PARA A FORMULAÇÃO DE NUTRICOSMÉTICOS

Gisele Medianeira Barbieri Moro

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

Prof.^a Dr.^a Telma Elita Bertolin

Co-orientadora

Rio Grande, RS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

POTENCIAL DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA COMO INGREDIENTE BIOATIVO
PARA A FORMULAÇÃO DE NUTRICOSMÉTICOS

Gisele Medianeira Barbieri Moro

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

Prof.^a Dr.^a Telma Elita Bertolin

Co-orientadora

Rio Grande, RS

2017

APROVAÇÃO


Tese defendida por Gisele Medianeira Barbieri Moro aprovada em 18 de agosto de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



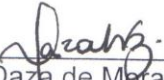
Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



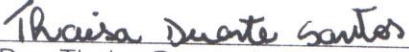
Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado – PUCRS



Profa. Dra. Ellana Badiale Furlong – FURG



Profa. Dra. Daza de Moraes Vaz B. Filgueira – FURG



Dra. Thaisa Duarte dos Santos – FURG

Aos meus pais, Afonso e Vera
Às minhas irmãs, Andressa, Flavia e Vanessa
Aos meus avós, Carlisto, Rosa, Antônio e Nilza (*in memoriam*)
Ao meu amado, Vagner

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar os meus sinceros agradecimentos... Início com uma frase que representa muito bem os 6 anos e meio como estudante da FURG: "Não é pelo valor p que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória". A realização desta tese de doutorado contou com importantes incentivos e colaborações sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais serei eternamente grata.

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida, por iluminar o meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha família: aos meus pais, Afonso e Véra, a quem devo grande parte de minhas conquistas. Muito obrigada pelo amor incondicional, carinho, educação, suporte, incentivo e compreensão desde o meu nascimento até nestes mais de 400 km nos separam neste momento. Às minhas irmãs, Andressa, Flávia e Vanessa, por suportarem a minha ausência, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Todas as minhas conquistas têm sido *por vocês e para vocês.*

Ao Vagner, meu companheiro, obrigada por todo amor, incentivo, paciência e por seu o meu porto seguro. Palavras nunca serão suficientes para agradecer o que fizestes por mim ao longo desses anos. Te amo!

Ao meu orientador, prof. Jorge, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria. Meu respeito e admiração pelo ser humano que é, pela simplicidade, pela ética e por ser um verdadeiro mestre. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, prof.^a Telma, pela confiança, paciência, incentivo e auxílio nestes anos de trabalho. Muito obrigada!

À prof.^a Emanuela, pela confiança e oportunidade de trabalho durante o doutorado sanduíche. *Grazie mille per tutto!*

À prof.^a Daza, pela colaboração, paciência, carinho, compreensão e dedicação neste um ano e meio de trabalho. Muito obrigada pela ajuda diária, seja com o desenho

experimental com as células HaCaT ou com análises e correções. Palavras jamais expressariam tamanha gratidão. Agradeço também pelas conversas (não científicas), incentivo e confiança.

À prof.^a Ana Votto, pelo carinho, incentivo e auxílio em diversos momentos no laboratório. Obrigada pelas inúmeras vezes nos receber em sua casa e pelos (deliciosos) cafés da tarde. Foi uma honra conhecer você e sua mãe!

Ao Márcio, amigo e técnico de laboratório (ICB-FURG), por sempre cuidar do material para os experimentos. Obrigada por todo o cuidado e pelas conversas jogadas fora.

À Jéssica, minha IC, pelo companheirismo e dedicação no laboratório. Foste por muito tempo o meu braço direito. Muito obrigada. Sinto saudade!

À Mara, ao Roque e aos colegas do LEB e MIBI, pela amizade, conselhos, paciência e cafés durante esta jornada. Sentirei saudade de todos vocês!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura Celular - ICB/FURG, pelo acolhimento, cafés da tarde e por nunca medirem esforços quando solicitei ajuda. Muito obrigada por me fazerem companhia também em feriados e finais de semana. Sou imensamente grata a todos vocês: Aline, Eduardo, Estela, Fabiane, Francielly, Gabriela, Marcelo, Mariana Diniz, Mariana Salgado e Michele. Vocês moram no meu coração!

Ao prof. Marcelo Vargas, por ter cedido gentilmente os reagentes para os ensaios de produção de espécies reativas de oxigênio e dano lipídico das células HaCaT.

Ao Prof. Roger Chammas, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pelo envio da linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT.

Aos amigos da *Università Degli Studi di Milano*: Angela, Elena, Natalia, Maria Serena, Valentina e Francesco. Muito obrigada pela paciência durante o meu aprendizado com cultura celular e também com a língua italiana. Sinto saudade de todos vocês! *Arrivederci amici! Grazie mille per tutto!*

À Denise Prates, por todos os momentos alegres, explicações,
incentivo e ajuda. Te amo, minha amiga!

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos, competência e dedicação à pesquisa neste País, que atualmente enfrenta diversos problemas econômicos e que coloca o "fazer ciência" em momento de incertezas.

À banca examinadora, professoras Daza, Denise, Eliana e Thaísa, pelas valiosas contribuições para este trabalho. Muito obrigada!

À FURG, por disponibilizar excelente infra-estrutura, bibliotecas e refeições (RU).

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

A todos que, indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho...

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

POTENCIAL DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA COMO INGREDIENTE BIOATIVO PARA A FORMULAÇÃO DE NUTRICOSMÉTICOS

RESUMO

As cianobactérias são micro-organismos procariotos que apresentam expressivo potencial biotecnológico, assim como inúmeras propriedades terapêuticas, funcionais e nutricionais. A *Spirulina*, possui *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e por conter compostos biologicamente ativos, como a C-ficocianina (CFC) apresenta interesse em diferentes setores de saúde e do setor alimentício. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial do extrato bruto de CFC como ingrediente bioativo para a formulação de nutricosméticos. Para tal, a parte experimental deste trabalho foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu na avaliação da atividade imunomoduladora do extrato bruto de CFC obtido da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando como modelo celular a linhagem monocítica de leucemia aguda humana THP-1 e como imunoestimulador, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que o extrato de CFC, nas concentrações 0,001 mg/mL a 1 mg/mL, apresentou atividade imunomoduladora, com efeitos imunossupressores e imunoestimuladores para as citocinas avaliadas interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Todavia, a expressão de genes que codificam estas citocinas pró-inflamatórias não foi alterada e a ativação do receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) foi observada, sugerindo que este é um dos receptores responsáveis pelo reconhecimento das respostas imunoestimulantes do extrato de CFC. A segunda etapa consistiu na avaliação do efeito fotoprotetor do extrato bruto de CFC em linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT. Os resultados demonstram que o extrato de CFC não alterou a viabilidade de células HaCaT. No entanto, a viabilidade celular foi alterada significativamente após 72 h, em comparação ao controle, quando irradiadas com doses que variaram de 0,5 J/cm² a 6 J/cm² de UVA. Quando os tratamentos foram associados, o extrato de CFC nas concentrações 0,001 mg/mL e 1 mg/mL protegeu as células tratadas pós-irradiação com dose de 0,5 J/cm² de UVA. Tal efeito pode ser atribuído, em parte, à diminuição dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à inibição de peróxidos lipídicos (LPO) gerados, através da capacidade deste extrato em sequestrar ERO, respostas também observadas neste estudo. Estes achados sugerem que o extrato bruto de CFC possui aplicabilidade promissora como agente imunomodulador para a melhora da imunidade inata do hospedeiro bem como para o tratamento de infecções causadas por diferentes patógenos. Além disso, o extrato exerceu atividade fotoprotetora, inibindo o dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA. A partir das respostas encontradas neste estudo é possível concluir que o extrato bruto de CFC, obtido da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, apresenta-se como matéria prima potencial para o desenvolvimento de nutricosméticos.

Palavras chave: Envelhecimento cutâneo. Fotoproteção. Imunomodulação. Microalga *Spirulina*. Radiação ultravioleta A.

POTENTIAL OF C-PHYCOCYANIN EXTRACT AS BIOACTIVE INGREDIENT FOR NUTRICOSMETICS FORMULATION

ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryote microorganisms that have significant biotechnological potential, as well as innumerable therapeutic, functional and nutritional properties. *Spirulina* has a *Generally Recognized As Safe* (GRAS) status issued by the *Food and Drug Administration* (FDA) and because it contains biologically active compounds such as C-phycoyanin (CPC), presents interest in different sectors health and food. In this context, the objective of this work was to investigate the potential of CPC crude extract as a bioactive ingredient for the formulation of nutricosmetics. For this purpose, the experimental part of this work was divided in two steps. The first step consisted in the evaluation of the immunomodulatory activity of crude CPC extract obtained from the microalga *Spirulina* sp. LEB 18, using as cell model human acute leukemia monocytic line THP-1 and as immunostimulator, lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli*. The results showed that CPC extract, at concentrations of 0.001 mg/mL to 1 mg/mL, presented immunomodulatory activity with immunosuppressive and immunostimulatory effects for the evaluated cytokines interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). However, expression of genes encoding these proinflammatory cytokines has not been altered and Toll-like receptor 4 (TLR4) activation has been observed, suggesting that this is one of the receptors responsible for the recognition of immunostimulatory responses of the CPC extract. The second step consisted in evaluating the photoprotective effect of CPC crude extract in human keratinocyte cell line HaCaT. The results demonstrate that CPC extract did not alter the viability of HaCaT cells. However, cell viability was significantly altered after 72 h, comparing to control when irradiated at doses ranging from 0.5 J/cm² to 6 J/cm² of UVA. When the treatments were associated, CPC extract at concentrations of 0.001 mg/mL and 1 mg/mL protected post-irradiation treated cells with a dose of 0.5 J/cm² of UVA. This effect can be attributed, in part, to decreasing levels of intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and to the inhibition of lipid peroxides (LPO) generated through the ability of this extract to sequester ROS, responses that were also observed in this study. These findings suggest that crude CPC extract has promising applicability as an immunomodulatory agent for improvement of the innate immunity of the host as well as for the treatment of infections caused by different pathogens. Additionally, the extract exerted photoprotective activity, inhibiting lipid damage and UVA-induced ROS generation. From the findings of this study, it is possible to conclude that crude CPC extract obtained from the microalga *Spirulina* sp. LEB 18, can be presented as potential raw material for the development of nutricosmetics.

Keywords: Skin aging. Fotoprotection. Immunomodulation. *Spirulina* microalga. Ultraviolet A radiation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína Ativadora-1
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CFC	C-ficocianina
CHP	Hidroperóxido de Cumeno
CIE	<i>Comission Internationale de l'Eclairage</i>
COX2	Ciclooxigenase-2
CPD	Dímeros de Ciclobutano Pirimidina
CREB	Proteína de Ligação do Elemento Responsivo a cAMP
Cxcl-1	Quimiocina (motivo C-X-C) Ligando 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazol
ECM	Matriz Extracelular
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBP	Ficobiliproteína
FBS	Ficobilissoma
FCB	Ficocianobilina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe ²⁺	Ferro no estado de oxidação +2
Fe ³⁺	Ferro no estado de oxidação +3
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
HaCaT	<i>Human Adult low Calcium Temperature keratinocytes</i> – Queratinócitos Humano Adulto com Baixo Teor de Cálcio e Temperatura
H ₂ DCF-DA	Diacetato de 2',7' diclorofluoresceína

HNO ₂	Ácido Nitroso
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
[•] HO ₂	Radical Hidroperoxil
ICESP	Laboratório de Oncologia Experimental do Instituto do Câncer de São Paulo
IL	Interleucina
IMS	<i>Intercontinental Marketing Services</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP	Iodeto de Propídio
IE	Índice de Estimulação
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
LOO ^{•-}	Ânion Peroxila
LPO	Peróxidos Lipídicos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Kinase Ativada por Mitógeno
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MITF	Fator de Transcrição Associado à Microftalmia
MMP	Metaloproteinase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
N ₂ O ₃	Óxido Nitroso
O ₂ ^{-•}	Ânion Superóxido
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
[•] OH	Ânion Hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampão Fosfato-salino
6-4PPs	Pirimidina Pirimidona (6-4)
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
RNA	Ácido Ribonucleico
RO [•]	Ânion Alcoxila

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
SAPK	Proteína Quinase Ativada por Estresse
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição-3
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
THP-1	Linhagem celular monocítica de leucemia aguda humana
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
UF	Unidade de fluorescência
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-di-hidroguanina

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Compostos bioativos presentes no gênero <i>Spirulina</i>	38
Tabela 2 - Ingredientes normalmente utilizados em formulações nutricosméticas.....	45

CAPÍTULO III

3.1 Potencial da *Spirulina* e seus metabolitos bioativos como agentes ingeridos para o cuidado da pele

Tabela 1 - Compostos presentes naturalmente na microalga <i>Spirulina</i> (exceção de vitamina D) com funções nutricosméticas	71
Tabela 2 - Compostos bioativos presentes no gênero <i>Spirulina</i>	75
Tabela 3 - Exemplos de produtos com ingredientes à base de <i>Spirulina</i> que apresentam diferentes benefícios à pele e produtos ingeríveis.	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	36
Figura 2 - Estrutura da C-ficocianina.....	39
Figura 3 - Estrutura do ficobilissoma.....	401
Figura 4 - Estrutura da pele humana	489
Figura 5 - Estrutura epidérmica e diferenciação de queratinócitos.....	50
Figura 6 - Exposição cutânea à radiação solar UV	50
Figura 7 - Espectro solar	52
Figura 8 - Comprimento de onda UV e profundidade de penetração na pele.....	523
Figura 9 - Mecanismo de defesa antioxidante	525
Figura 10 - Visão geral da sinalização de LPS/TLR4.....	578

CAPÍTULO III

3.1 Potencial da *Spirulina* e seus metabolitos bioativos como agentes ingeridos para o cuidado da pele

Figura 1 – <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 do banco de cepas do LEB/FURG. Ampliação da imagem 400 x.....	67
---	----

3.2 Atividade imunomoduladora do extrato de C-ficocianina obtido da microalga *Spirulina* cultivada no sul do Brasil

Figura 1 - Efeito dos extratos de CFC sobre a produção de IL-8 em células THP-1	977
Figura 2 - Efeito dos extratos de CFC sobre a produção de TNF- α em células THP-1.....	988
Figura 3 - Efeito dos extratos de CFC sobre a detecção de TLR4.....	999
Figura 4 - Efeito dos extratos de CFC na expressão de genes	100

3.3 Efeito fotoprotetor do extrato de C-Ficocianina em linhagem celular epidérmica

Figura 1 - Fluorescência do pigmento CFC em células HaCaT	1187
Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações do extrato de CFC na viabilidade de queratinócitos humano HaCaT	1198
Figura 3 - Efeito de diferentes doses de UVA na viabilidade de queratinócitos humano HaCaT	1209
Figura 4 - Efeito do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados pré-irradiação UVA	11210
Figura 5 - Efeito do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados e irradiados com UVA, de forma simultânea	122
Figura 6 - Efeito fotoprotetor do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados pós-irradiação UVA.....	12322
Figura 7 - Efeito do extrato de CFC nos níveis intracelulares de ERO induzido por UVA em células HaCaT	12423
Figura 8 - Efeito do extrato de CFC sobre a peroxidação lipídica em células HaCaT irradiadas com UVA.....	12625

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	30
1.1 OBJETIVOS.....	31
1.1.1 Objetivo geral.....	31
1.1.2 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO II	34
2 REVISÃO DA LITERATURA	36
2.1 CIANOBACTÉRIA <i>Spirulina</i>	36
2.1.1 C-ficocianina.....	39
2.1.2 Propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora ..	41
2.2 NUTRICOSMÉTICOS	42
2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE.....	47
2.3.1 Envelhecimento cutâneo	49
2.4 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	50
2.4.1 Efeitos da radiação UV na pele humana	51
2.5 INFLAMAÇÃO	55
CAPÍTULO III.....	58
3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	60
3.1 POTENCIAL DA <i>Spirulina</i> E SEUS METABÓLITOS BIOATIVOS COMO AGENTES INGERIDOS PARA O CUIDADO DA PELE	62
3.1.1 Introdução	65
3.1.2 Pele Humana e Envelhecimento	66
3.1.3 Nutricosméticos	68
3.1.4 Microalga <i>Spirulina</i>	72
3.1.5 Qual é a evidência do papel da <i>Spirulina</i> no envelhecimento da pele?	75
3.1.5.1 Propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora	75
3.1.5.2 Atividade da antitirozinase	77
3.1.5.3 Atividades anti-colagenase e anti-elastase	78
3.1.6 Produtos disponíveis comercialmente com ingredientes à base de <i>Spirulina</i>	79
3.1.7 Conclusões e Perspectivas Futuras	82
Referências.....	82
3.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA OBTIDO DA MICROALGA <i>Spirulina</i> CULTIVADA NO SUL DO BRASIL	90
3.2.1 Introdução	93
3.2.2 Material e Métodos	94
3.2.2.1 Biomassa microalgal e obtenção do extrato de CFC	94
3.2.2.2 Linhagem celular.....	94
3.2.2.3 Viabilidade celular	95
3.2.2.4 Imunoestimulação	95
3.2.2.5 Produção de citocinas.....	95
3.2.2.6 Detecção de TLR4.....	95
3.2.2.7 Extração de RNA e PCR quantitativo em Tempo Real.....	96
3.2.2.8 Análise estatística	96
3.2.3 Resultados	96
3.2.3.1 Efeito do extrato de CFC sobre a viabilidade celular de células THP-1.....	96
3.2.3.2 Efeito do extrato de CFC sobre a produção de IL-8 e TNF- α em células THP-1.....	97

3.2.3.3 Detecção de TLR4	98
3.2.3.4 Efeito do extrato de CFC na expressão de genes de citocinas relacionadas à inflamação	99
3.2.4 Discussão	100
Referências	102
3.3 EFEITO FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA EM LINHAGEM CELULAR EPIDÉRMICA	106
3.3.1 Introdução	109
3.3.2 Material e Métodos	110
3.3.2.1 Biomassa microalgal e obtenção do extrato bruto de CFC	110
3.3.2.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de CFC	111
Captura do radical ABTS	111
Capacidade de sequestro da radical DPPH	112
Poder redutor	112
3.3.2.3 Linhagem celular e condições de cultura	112
3.3.2.4 Fluorescência do extrato de CFC em células HaCaT	113
3.3.2.5 Exposição de células HaCaT ao extrato de CFC	113
3.3.2.6 Lâmpada UVA	113
3.3.2.7 Exposição de células HaCaT à irradiação UVA (sem interação).....	114
3.3.2.8 Efeito da exposição de células HaCaT à diferentes associações entre UVA e extrato de CFC.....	114
3.3.2.9 Viabilidade celular	115
3.3.2.10 Dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA	115
Medição da geração de ERO intracelular.....	116
Medição da peroxidação lipídica.....	116
3.3.2.11 Análise estatística.....	116
3.3.3 Resultados.....	117
3.3.3.1 Concentração de CFC e atividade antioxidante.....	117
3.3.3.2 Fluorescência do pigmento CFC	117
3.3.3.3 Efeito do extrato de CFC na viabilidade de células HaCaT	119
3.3.3.4 Efeito de diferentes doses de UVA na viabilidade de células HaCaT	119
3.3.3.5 Efeito da exposição de células HaCaT à diferentes associações entre UVA e extrato de CFC.....	120
3.3.3.6 Efeito do extrato de CFC nos níveis intracelulares de ERO induzido por UVA em células HaCaT.....	123
3.3.3.7 Efeito do extrato de CFC sobre a peroxidação lipídica em células HaCaT irradiadas com UVA	125
3.3.4 Discussão	127
Referências	130
CAPÍTULO IV.....	136
4 CONCLUSÃO GERAL	138
CAPÍTULO V	140
APÊNDICE A – Carta de aceite de manuscrito enviado à <i>Industrial Biotechnology</i>	142
CAPÍTULO VI.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CAPÍTULO VII.....	164
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	166

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A *Spirulina* é uma cianobactéria fotossintética, multicelular, filamentosa em forma de espiral que vem sendo produzida em grande escala. Essa microalga se destaca pelo conteúdo proteico e presença de ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais e pigmentos, principalmente ficocianina (CFC) e β -caroteno (GERSHWIN; BELAY, 2007; SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Inúmeras investigações demonstraram que a *Spirulina* apresenta diversas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anticancerígena, antibacteriana e antiviral (GERSHWIN; BELAY, 2007; HENRIKSON, 2009; HOSSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013).

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada à utilização de biomassa e/ou extratos microalgais para o desenvolvimento de novos alimentos e suplementos alimentares (WANG et al., 2015). A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, sendo que se relata que tribos indígenas já consumiam espécies de microalgas, como *Spirulina platensis* e tal consumo é justificado pela presença de diversos nutrientes na sua biomassa (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). Neste sentido, a investigação acerca das propriedades bioativas de diversos alimentos/compostos é de extremo interesse não somente à comunidade científica como também à homens e mulheres, que buscam através da ingestão de alimentos, melhorar não só a saúde e condição da pele como também o sistema imunológico como um todo (WANG et al., 2015).

O envelhecimento da pele humana é um processo biológico complexo influenciado pela combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos, designados envelhecimento cronológico e foto-envelhecimento, respectivamente (FARAGE et al., 2008; KAMMEYER; LUITEN, 2015). Estes fatores, juntos, levam a alterações estruturais e funcionais importantes em cada camada da pele. Entretanto, atenção especial deve ser dada ao foto-envelhecimento, uma vez que 80 a 90% do envelhecimento cutâneo é consequência dos efeitos deletérios do sol através da radiação ultravioleta (UV) (KOHL et al., 2011; NATARAJAN et al., 2014).

A radiação UV é considerada mutagênica e responsável pela maior incidência de patologias cutâneas induzidas pelo meio ambiente, incluindo eritema, inflamação, foto-envelhecimento e câncer. Os efeitos deletérios na pele causados pela radiação UV são consequência da exposição desprotegida à radiação solar. A radiação UV é capaz de causar danos diretos e indiretos no DNA e, conseqüentemente, resultar em mutagênese nas células da pele (NATARAJAN et al., 2014). Particularmente, a radiação UVA compreende 90-95% da radiação solar que chega à superfície terrestre. Comparada à UVB, a UVA pode penetrar

profundamente a pele, atingindo a camada dérmica basal. Em razão disto, esta radiação é considerada a responsável pelas mudanças observadas na pele foto-envelhecida, uma vez que age direta e indiretamente nas biomoléculas e estruturas celulares por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (D’ORAZIO et al., 2013).

Diversas estratégias podem ser utilizadas para proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação UV, sendo uma delas a ingestão de nutricosméticos (AFAQ; KATIYAR, 2011; STAHL; SIES, 2012). A suplementação oral de compostos biologicamente ativos para retardar ou prevenir o foto-envelhecimento tem ganhado atenção e popularidade à medida que a expectativa de vida da população aumenta e a ciência revela os mecanismos patológicos envolvidos neste processo (BASAVARAJ; SEEMANTHINI; RASHMI, 2010; CHO et al., 2014; KRUTMAN; HUMBERT, 2011). Os nutricosméticos podem beneficiar a pele humana através de seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, revogando danos, estresse oxidativo e inflamação cutâneos. Diversos estudos têm demonstrado que ácido ascórbico, carotenoides, compostos fenólicos, entre outros bioativos, exercem importante papel na prevenção do foto-envelhecimento (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012; CHO et al., 2014; DRAELOS, 2010).

Devido às suas atividades biológicas, a microalga *Spirulina* foi reconhecida como matéria-prima potencial para o desenvolvimento de alimentos para o cuidado da pele (BATTISTI; COSTA; BERTOLIN, 2014; COSTA et al., 2017, no prelo; DARVIN et al., 2015). O Laboratório de Engenharia Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, desde 2011, tem investido nesta área de conhecimento (MORO, 2013). Embora a *Spirulina*, tenha sido mencionada como potente imunomodulador do sistema imune inato (GRZANNA et al., 2006) e como agente protetor contra irradiação UVB em células da pele murina (YOGIANTI et al., 2014), torna-se necessário investigar se o extrato de CFC, especificamente, é capaz de modular células do sistema monócitos/macrófagos e proteger células epidérmicas contra os efeitos deletérios do UVA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar processos celulares de imunomodulação e de fotoproteção do extrato de C-ficocianina, visando a aplicação em formulações nutricosméticas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito imunomodulador do extrato de C-ficocianina em linhagem celular monocítica de leucemia aguda humana THP-1.

- b) Avaliar o efeito fotoprotetor do extrato de C-ficocianina em linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT expostas à radiação UVA.

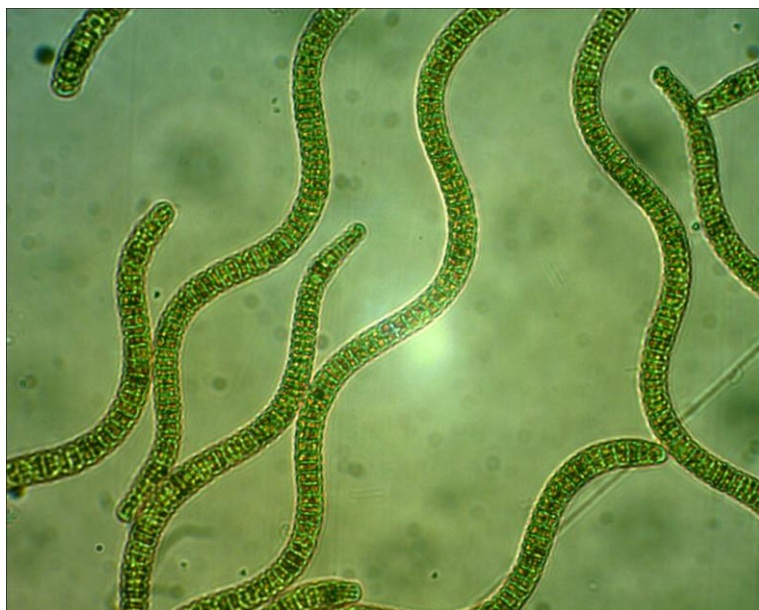
CAPÍTULO II

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CIANOBACTÉRIA *Spirulina*

A *Spirulina*, cianobactéria microscópica e filamentosa que deriva seu nome da natureza espiral ou helicoidal de seus filamentos, pertence à família *Oscillatoriaceae* (Figura 1) (SOMCHIT et al., 2014; RASOOL; SABINA, 2009). Essa microalga, que cresce naturalmente em lagos alcalinos é comercialmente produzida em larga escala sob condições controladas (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016; SOTIROUDIS; SOTIROUDIS, 2013). A diversidade e versatilidade da *Spirulina* promovem sua aplicação numa vasta gama de produtos industriais, desde biocombustíveis até suplementos alimentares e cosméticos de alto valor agregado (GERSHWIN; BELAY, 2007; SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Figura 1 - Microalga *Spirulina* sp. LEB 18



Fonte: Banco de cepas de microalgas do LEB/FURG.

A *Spirulina* tem sido utilizada como fonte de vários nutrientes desde a antiguidade. Essa microalga é conhecida como "superalimento" devido à diversidade e à concentração de nutrientes. Sua biomassa é facilmente digerida e absorvida no organismo humano, pois a sua membrana celular não contém celulose. Com base no peso seco, sua biomassa é composta por mais de 60% de proteína, sendo o restante carboidratos e lipídios. A *Spirulina* também possui conteúdo de ácidos nucleicos relativamente baixo, embora seja rica

em pigmentos, vitaminas e minerais (HENRIKSON, 2009).

O aumento das evidências científicas e clínicas em torno dos benefícios nutricionais e potenciais para a saúde vem atraindo o uso da *Spirulina* em diversos alimentos, como massas, sopas instantâneas, barras de cereais, biscoitos, salgadinhos, pipoca, lanches, sobremesas congeladas, *muffins*, rosquinhas, molhos de salada, confeitos, *smoothies* e até mesmo cerveja (GERSHWIN; BELAY, 2007). Essa microalga possui *status* GRAS emitido pela FDA (FDA, 2003). Esse certificado permite que a *Spirulina* seja legalmente comercializada como suplemento alimentar ou como ingrediente bioativo em alimentos e bebidas funcionais (FDA, 2012b). Outras aplicações da biomassa de *Spirulina* ou seus metabolitos bioativos incluem formulação de cosméticos, alimentação animal, corantes para alimentos e biomoléculas purificadas (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Diversas empresas produzem e comercializam *Spirulina* para nutrição humana. Os maiores produtores do mundo estão localizados nos EUA e na Ásia. Nos EUA, a produção em larga escala começou há cerca de 50 anos pelas empresas Earthrise[®] (Califórnia) e Cyanotech Corporation (Hawaí) (GERSHWIN; BELAY, 2007). Anos mais tarde, outros países iniciaram a produção de *Spirulina*, em particular a Índia (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016), destacando-se a Parry Nutraceuticals (<http://www.parrynutraceuticals.com>). O mercado mundial da *Spirulina* tem aumentado a taxa de crescimento anual de 15% e atualmente sua produção é de cerca de 15.000 toneladas (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). A biomassa produzida tem sido aplicada na produção de pó, comprimidos, cápsulas e bebidas (MORAIS et al., 2015).

A *Spirulina* apresenta diversos compostos bioativos interessantes (CHOJNACKA et al., 2012; GERSHWIN; BELAY, 2007; MORAIS et al., 2015), como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Compostos bioativos presentes no gênero *Spirulina*.

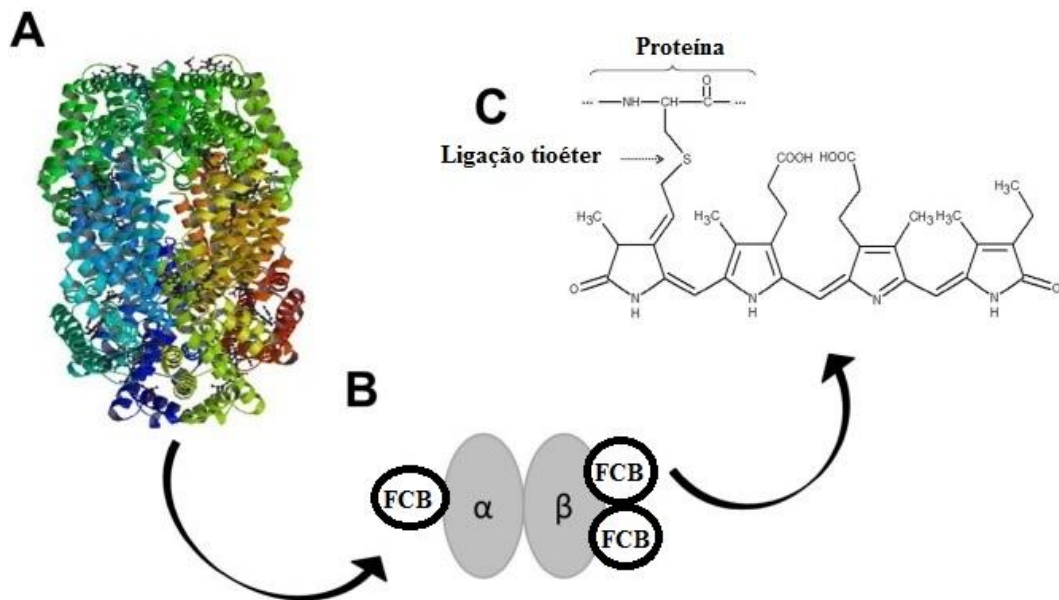
Microalgas	Compostos bioativos	Concentrações (%)	Estudos
<i>Spirulina</i> sp.	C-ficocianina	17,50	MORAIS et al., 2015
.	Aloficocianina	20,00	
<i>Spirulina fusiformis</i>	C-ficocianina	46,00	
	C-ficocianina	9,60	
	Aloficocianina	9,50	
<i>Spirulina platensis</i>	Fenólicos	0,71	
	Terpenoides	0,14	
	Alcaloides	3,02	
<i>Spirulina maxima</i>	Fenólicos	1,29	
	Flavonoides	0,46	
	Carotenoides totais	0,37	HENRIKSON, 2009
	Carotenos	0,20	
	β-caroteno	0,17	
	Outros carotenos	0,03	
	Xantofilas	0,17	
	Myxoxantofila	0,07	
	<i>Spirulina</i> sp.	Zeaxantina	0,06
Criptoxantina		0,01	
Echinenone		0,01	
Outras xantofilas		0,02	
Clorofila		1,00	
γ-linolênico		1,35	
Glicolipídios		2,00	
Sulfolipídios		0,10	
Tiamina (vitamina B1)		< 0,01	MORO, 2013
Riboflavina (vitamina B2)		< 0,01	
<i>Spirulina</i> sp. LEB	Niacina (vitamina B3)	0,01	
	Ácido pantotênico (vitamina B5)	0,26	
	Piridoxina (vitamina B6)	< 0,01	
	Folato (vitamina B9)	0,05	

Cianocobalamina (vitamina B12)	0,01
α -Tocoferol (vitamina E)	< 0,01

2.1.1 C-ficocianina

A C-ficocianina (CFC), principal pigmento de interesse que está presente em cianobactérias, particularmente na *Spirulina*, é uma proteína da família das ficobiliproteínas (FBP) (PATEL et al., 2004). Sua principal função é transferir energia para a reação central, onde o comprimento de onda máximo de absorção é próximo a 620 nm (DE MARSAC; COHEN-BAZIRE, 1977). A CFC é composta por uma parte proteica e outra apoteica, chamada ficocianobilina (FCB) (Figura 2). A parte proteica consiste em duas subunidades homólogas, cadeias do tipo α e β globinas ligadas covalentemente a FCB por ligação tioéter. A parte apoteica contém 20 aminoácidos e fornece a atividade fluorescente da CFC (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014).

Figura 2 - Estrutura da C-ficocianina



(A) Estrutura da CFC em forma de hexâmero; (B) Representação esquemática da montagem da CFC: é composta por duas subunidades de proteínas, cadeias α e β , uma FCB está ligada à subunidade α e outras duas ligadas à subunidade β ; (C) Estrutura química da FCB.

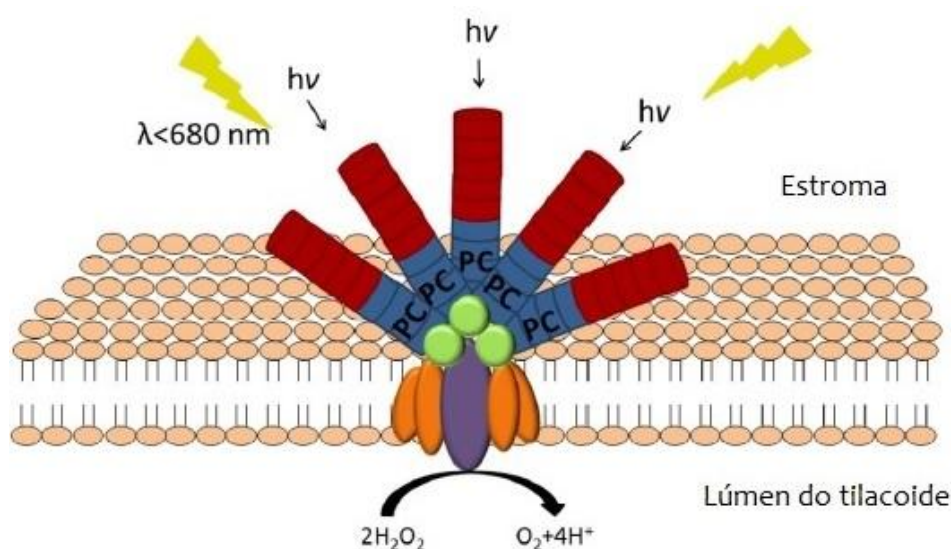
Fonte: Adaptado de Fernández-Rojas; Hernández-Juárez; Pedraza-Chaverri (2014).

Estudo realizado por Minic et al. (2016) demonstrou que a CFC é facilmente digerida pela pepsina, contendo de 2 a 13 resíduos de aminoácidos em cada fração de peptídeo. Ainda,

os peptídeos obtidos mostraram atividades antioxidantes potentes, sendo a parte cromófora a maior responsável por esses efeitos. Os resultados deste trabalho indicaram que estes peptídeos poderiam contribuir substancialmente para a promoção da saúde humana ao aumentar a capacidade antioxidante do organismo (MINIC et al., 2016).

Em cianobactérias e algas vermelhas, o principal complexo coletor de luz são os ficobilissomas (FBS), que por serem hidrofílicos, se localizam periféricamente às membranas do tilacoide (Figura 3). Os FBS são constituídos de centenas de cromóforos, que permitem a transferência de energia de forma eficiente unidirecionalmente para a clorofila a, centro das reações fotossintéticas (ZILINSKAS; GREENWALD, 1986). As FBP, envolvidas nesta cascata de transferência de energia, são a ficoeritrina ($\lambda_{\text{max}} = 540\text{-}570\text{ nm}$) ficocianina ($\lambda_{\text{max}} = 610\text{-}620\text{ nm}$) e aloficocianina ($\lambda_{\text{max}} = 650\text{-}655\text{ nm}$) (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014).

Figura 3 - Estrutura do ficobilissoma



Ficoeritrina (cilindros vermelhos), CFC (cilindros azuis) e aloficocianina (esferas verdes), centros de reação do fotossistema II (elipse roxa) e fotossistema I (elipses laranja).

Fonte: Adaptado de Fernández-Rojas; Hernández-Juárez; Pedraza-Chaverri (2014).

Como mencionado anteriormente, a aloficocianina também é uma importante ficobiliproteína, pois transfere energia para moléculas de clorofila (KILLILEA; O'CARRA, 1985). Além disso, embora o β -caroteno seja o mais conhecido, a *Spirulina* contém rico complexo antioxidante de pelo menos dez carotenoides. A ingestão diária de 2,5 g de *Spirulina* seria suficiente para fornecer 5.750 UI (3,5 mg) de β -caroteno, correspondendo a

115% da recomendação diária de vitamina A (HENRIKSON, 2009). Os carotenoides são frequentemente aplicados nas indústrias alimentar e farmacêutica devido a sua capacidade de pigmentação e propriedades antioxidantes (MORAIS et al., 2015).

Diversas investigações têm mostrado que a *Spirulina* desempenha importante papel nas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidante, imunomoduladora, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana e antiviral. Esta microalga também apresenta efeitos positivos contra obesidade, desnutrição, diabetes, hiperlipidemia, anemia e toxicidade induzida por metais pesados. Estes benefícios têm sido atribuídos à CFC (GERSHWIN; BELAY, 2007; HENRIKSON, 2009; HOSSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013).

2.1.2 Propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora

Estudos *in vitro* demonstraram que a CFC sequestra radicais peroxila, hidroxila e alcóxila, inibe a peroxidação lipídica (ROMAY et al., 2003; SHALABY; SHANAB, 2013; LIU et al., 2011), diminui o óxido nítrico (NO) e suprime a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CHERNG et al., 2007). Outras investigações relataram que a CFC exerce efeitos inibitórios no fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e nos níveis de nitrito no soro de camundongos (ROMAY et al., 2011), além de suprimir a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6) em macrófagos e esplenócitos por meio da inibição da via fator nuclear kappa B (NF- κ B) (KU et al., 2013).

Pesquisas relacionando CFC e radiação UVA não foram encontradas na literatura. No entanto, os efeitos inibitórios da *Spirulina* sobre respostas inflamatórias cutâneas induzidas por UVB e sobre a carcinogênese foram mencionados por Yogianti et al. (2014). Estes pesquisadores demonstraram que a administração oral de 10% de *Spirulina* pode inibir o desenvolvimento e indução de tumores de pele induzidos por UVB em camundongos. Estes efeitos supressores sobre a resposta aguda mediada pela exposição à UVB foram confirmados imuno-histoquimicamente, juntamente com diminuição significativa nas expressões de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL-1). A *Spirulina* também reduziu a formação epidérmica de 8-oxo-dG, indicando que ela exerceu um efeito supressor sobre a produção de ERO causada por UVB na pele. Além disso, esta microalga suprimiu a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK), proteína quinase ativada por estresse/quinase c-Jun N-terminal (SAPK/JNK) e quinase extracelular regulada por sinal (ERK), demonstrando que a *Spirulina* possui vários locais

efetivos para a inibição do desenvolvimento do tumor da pele após exposição à UVB. Em resumo, presume-se que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias combinadas da *Spirulina* exercem efeitos antitumorais contra a irradiação UVB na pele e dessa forma desempenham importante papel na prevenção do câncer da pele (YOGIANTI et al., 2014). Esses dados suportam o papel quimiopreventivo da *Spirulina* com promissor potencial para amplo uso no tratamento quimioadjuvante do câncer da pele (COSTA et al., 2017, no prelo).

A CFC também foi estudada como potencial inibidor da expressão gênica que regula os fatores envolvidos na tumorigênese da pele. Gupta e Gupta (2012) demonstraram que a CFC pode inibir a ciclooxigenase-2 (COX-2), a IL-6, o transdutor de sinal e o ativador da proteína transcricional-3 (STAT3) e as expressões de ornitina descarboxilase após a administração tópica de CFC na pele de rato. As doses de CFC variaram de 50 a 400 µg em 200 µL de DMSO 50% e foram aplicadas imediatamente após a utilização de um potente agente promotor tumoral (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)). Assim, a CFC, um composto com forte atividade anti-inflamatória também poderia atuar como agente quimiopreventivo (GUPTA; GUPTA, 2012). No entanto, deve-se notar que, os dados de expressão gênica de modelos de pele usados no desenvolvimento de fármacos podem fornecer evidências indiretas de aplicabilidade no cuidado da pele através de nutricosméticos (COSTA et al., 2017, no prelo).

O papel do β-caroteno também tem sido estudado. De acordo com Schafer et al. (2002), este composto fornece proteção contra a peroxidação lipídica mediada por oxigênio singlete e foi considerado um eficiente antioxidante de membrana. Estudos também relataram que o β-caroteno pode reduzir significativamente os marcadores pró-inflamatórios em resposta a fontes ambientais na pele murina (VALACCHI et al., 2009), inibir a produção de NO e de prostaglandina E(2) e suprimir a expressão de IL-1β, TNF-α, iNOS e COX-2 em células e em macrófagos primários (BAI et al., 2005). Acredita-se que a supressão desses mediadores inflamatórios promovidos pelo β-caroteno é devido à inibição da ativação de NF-κB ao bloquear a translocação nuclear de NF-κB p65 (BAI et al., 2005).

2.2 NUTRICOSMÉTICOS

O aumento da expectativa de vida, observado em meados do século XXI, emergiu como preocupação para os países industrializados e para as ciências da alimentação e da nutrição, sendo um dos desafios oferecer novas estratégias para melhorar a qualidade de vida da população. Observou-se também que, com o envelhecimento, tornou-se necessário parecer

"saudável e bonito" (PICCARDI; MANISSIER, 2009). Neste contexto, afim de beneficiar a aparência facial e melhorar a saúde cutânea, a ingestão de suplementos nutricionais vem ganhando atenção e notoriedade (DRAELOS, 2010). Nos últimos 15 anos, pesquisadores e empresas em todo o mundo têm investido em pesquisas científicas buscando soluções para o bem-estar e saúde da pele (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012).

Compostos biologicamente ativos têm ganhado considerável atenção devido a vasta gama de atividades biológicas. Isso propiciou o aumento de pesquisas com foco no desenvolvimento de novos suplementos nutricionais com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora, como é o caso de nutricosméticos. O consumo de tais suplementos, pode auxiliar as defesas naturais contra os efeitos danosos da radiação UV ou de outros insultos para compensar o enfraquecimento do sistema de defesa da pele (SCHAGEN et al., 2012; PANDEL et al., 2013), bem como melhorar o sistema imunológico do hospedeiro (RAJA; HEMAISWARYA, 2010).

O conceito de nutricosméticos surgiu a partir dessas pesquisas, sendo formado pela interseção dos termos "nutracêuticos" e "cosmecêuticos" (ANUNCIATO; ROCHA FILHO, 2012). Nutracêutico emergiu dos conceitos "nutrição" e "farmacêutico" por Stephen DeFelice, em 1989. De acordo com DeFelice (1995), nutracêutico é definido como "alimento ou parte de alimento que fornece benefícios médicos para a saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças". Enquanto isso, cosmecêutico, resultado da convergência entre as indústrias "cosmética" e "farmacêutica", é caracterizado como produto cosmético formulado com ingredientes bioativos que promovem benefícios à pele além do creme cosmético tradicional (CHULASIRI, 2016). Embora o termo nutricosmético seja amplamente utilizado no segmento de cuidados pessoais, esse termo, juntamente com "nutracêutico" e "cosmecêutico", não é reconhecido em nenhuma categoria de alimentos, drogas e cosméticos pela FDA (FDA, 2016; 2012a).

Apesar de ser relativamente novo, os nutricosméticos são uma tendência de mercado (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2015). Isso reflete que as pessoas estão se tornando conscientes de que produtos nutricionais não só contribuem para a saúde geral e prevenção de doenças, como também para a saúde cutânea (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). Sabe-se que as funções da pele e a aparência saudável dependem de um suprimento suficiente de nutrientes essenciais e estratégias através da dieta são mais eficazes quando utilizadas contra o envelhecimento da pele causado por fatores extrínsecos (MARINI, 2011; PARK, 2015; SZYSZKOWSKA et al., 2014). O entendimento dos efeitos de moléculas bioativas nas funções da pele tem estimulado o desenvolvendo de suplementos nutricionais

com o objetivo de beneficiar a pele humana. Os nutricosméticos podem atuar sobre a pele (pigmentação, clareamento, prevenção e reparo), unhas (fortalecimento) e cabelo (restauração, crescimento e nutrição). Os ingredientes utilizados em nutricosméticos devem ser seguros e, em geral, eles têm principalmente funções antioxidantes e anti-inflamatórias (CARRIE, 2008).

Alguns dos ingredientes mais populares utilizados em formulações nutricosméticas (Tabela 2) envolvem combinações de micronutrientes, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados (incluindo linoleico e γ -linolênico), aminoácidos, carotenoides e polifenóis (TAEYMANS; CLARYS; BAREL, 2014). Formas efetivas para entrega oral de compostos bioativos, biomassa ou extratos de microalgas são aquelas comuns para outros nutricosméticos, incluindo produtos de mercado como sopas, iogurtes, geleias, chocolate, barras de cereais, bebidas, cápsulas ou comprimidos (CARRIE, 2008; MORO, 2013).

Tabela 2- Ingredientes normalmente utilizados em formulações nutricosméticas.

Ingredientes	Funções na pele	Estudos
Vitamina A	▪ Ajuda na proliferação de queratinócitos e fibroblastos	KAFI et al., 2007
	▪ Induz a biossíntese de colágeno e reduz a expressão de MMP-1	VARANI et al., 2000
	▪ Previne danos induzidos pela radiação UV	
Vitamina C	▪ Protege a pele doando sequencialmente elétrons para neutralizar os radicais livres	BURKE, 2007
	▪ Serve como co-fator para as enzimas lisil e prolil hidroxilases, que são responsáveis pela estabilização e reticulação das moléculas de colágeno	McARDLE et al., 2002 TELANG, 2013
	▪ Interage com íons de cobre no sítio ativo da tirosinase e inibe a ação desta enzima, diminuindo a formação de melanina	
	▪ Promove a cicatrização de feridas e previne a hiperpigmentação pós-inflamatória em casos como acne vulgar e rosácea	
Vitamina D	▪ Melhora a hidratação da pele	
	▪ As vitaminas C e E trabalham sinergicamente contra os danos induzidos por UV, reduzindo tanto a apoptose celular quanto a formação de dímeros de timina	
	▪ Melhora a imunidade inata	GOMBART et al., 2005
Vitamina E	▪ Demonstra atividade anti-inflamatória	BURKE et al., 2000
	▪ Protege os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares da oxidação	ZINGG, 2007
	▪ Modula a transdução de sinal e a expressão gênica	WU et al., 2008
	▪ Protege a fotocarcinogênese	
Cobre	▪ Possui atividade antioxidante	PICKART et al., 2012

continuação

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induz a maturação de colágeno 	
Selênio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protege a pele do estresse oxidativo gerado pela radiação UV 	RAFFERTY et al., 1998
Zinco	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protege a pele do fotodano ▪ Exibe função antimicrobiana 	MITCHNICK et al., 1999
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Previne o dano ao DNA induzido por UV 	CHO et al., 2010
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modula a expressão gênica do procolágeno 	HEINRICH et al., 2003
Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melhora o sistema imune ▪ Previne a peroxidação lipídica ▪ Previne a sensibilidade da pele causada por eritema 	SCHAFFER et al., 2002
Ácidos graxos poli-insaturados	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contribui para a homeostase de barreira de permeabilidade normal ▪ Regula a imunidade e a inflamação cutânea 	KENDALL et al., 2017 KENDALL; NICOLAOU, 2013

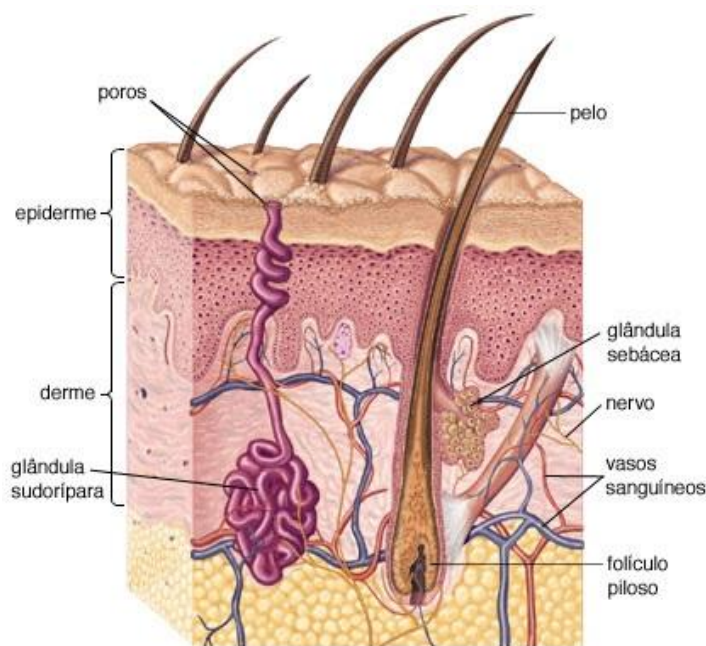
O mercado mundial de nutricosméticos tem se caracterizado pelo crescimento anual exponencial. De acordo com pesquisa realizada pelo Instituto Intercontinental Marketing Services Health (IMS) o mercado de nutricosméticos movimentou em 2010 cerca de US\$ 2,4 bilhões (GOMES; TARANTINO, 2012). A previsão da Global Industry Analysts, outra empresa de dados de mercado, é que este número triplique, chegando a US\$ 7,4 bilhões em 2020 (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2015). O Japão, a Europa e os Estados Unidos estão entre os maiores consumidores de nutricosméticos (CARRIE, 2008). No Brasil, este mercado ainda está em expansão; em 2010, rendeu apenas US\$ 13 milhões no volume total de vendas (GOMES; TARANTINO, 2012).

O termo nutricosmético, como mencionado anteriormente, não é reconhecido pela FDA (FDA, 2016; 2012a). No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), este termo também não está normatizado (BRASIL, 2013). Os nutricosméticos não podem ser classificados como cosméticos, uma vez que estes são de uso tópico e devem ser usados externamente (NEVES, 2009). Os produtos ingeridos devem apresentar outro tipo de registro, bem como, serem submetidos a normas mais criteriosas para que sejam aprovados para consumo. Neste sentido, no Brasil, eles são enquadrados na categoria de alimentos funcionais, pois proporcionam benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar papel potencialmente benéfico na diminuição do risco de doenças crônicas degenerativas (BRASIL, 2013; NEVES, 2009). Na Europa, a Diretiva Europeia 2002/46/EC classifica esses produtos na categoria de gêneros alimentícios, estabelecendo os nutrientes autorizados para fabricação (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 16% da massa corporal de um adulto. A pele está organizada em duas camadas principais, epiderme e derme, que juntas são constituídas por componentes epiteliais, mesenquimais, neurovasculares e glandulares (Figura 4). A epiderme, de origem ectodérmica, é a camada mais externa e serve como ponto de contato do corpo com o ambiente (SLOMINSKI et al., 2012). Devido as suas características físicas e biológicas, a epiderme exerce inúmeras funções vitais, incluindo a termorregulação, a prevenção de perda de água em excesso pelo organismo e a resistência aos estressores ambientais, tais como agentes químicos, agentes infecciosos e radiação ultravioleta (UV) (BARONI et al., 2012).

Figura 4 - Estrutura da pele humana



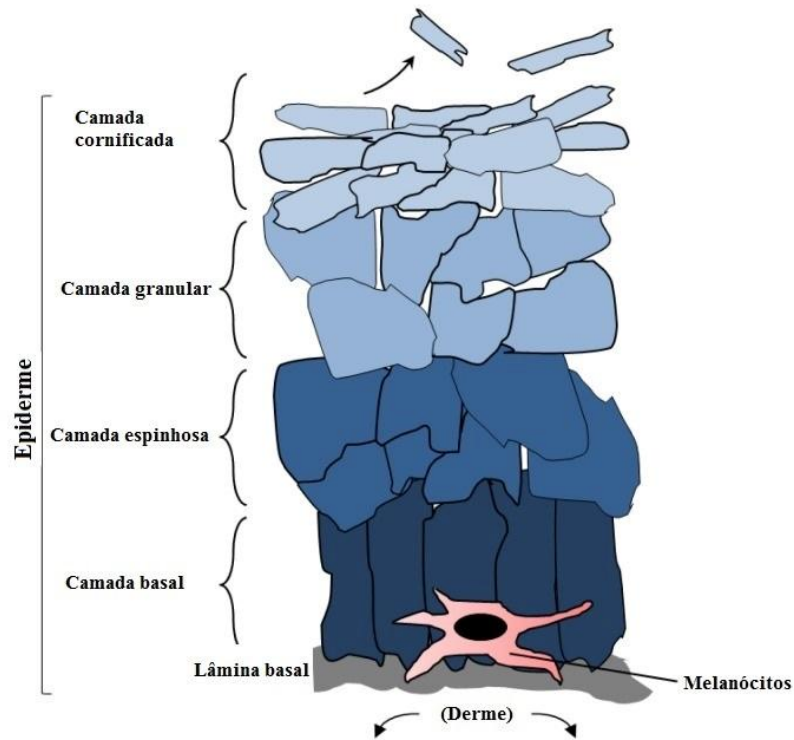
Fonte: Adaptado de Britannica Escola (2017).

A epiderme, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, é composta por quatro tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Estas últimas são responsáveis pela síntese de cotecolaminas e pela sensibilidade tátil (KIERSZENBAUM; TRES, 2016; RABE et al., 2006). As células de Langerhans possuem função imunológica, que envolve apresentação do antígeno e estimulação da resposta imunitária mediada por linfócitos timo-dependentes (linfócitos T) (WOLLENBERG et al., 1996). Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina e proteção da pele contra a radiação ultravioleta (BRENNER; HEARING, 2007; NATARAJAN et al., 2014). E, por fim, os queratinócitos, que formam a maior população de células na epiderme (pelo menos 80%) (ULMANN et al., 2007), são caracterizados pela expressão de citoqueratinas e pela formação de desmossomas para formar uma barreira físico-química eficaz (FUCHS; RAGHAVAN, 2002). Além da função de barreira, os queratinócitos acumulam pigmentos de melanina à medida que estas amadurecem nos melanossomas (DELEVOYE, 2014; SEIBERG, 2001).

A epiderme, demarcada a partir da derme por uma membrana basal, está organizada em camadas funcionais definidas em grande parte pelas características dos queratinócitos, tais como forma, tamanho, nucleação e expressão da queratina (FUCHS; RAGHAVAN, 2002) (Figura 5). Os queratinócitos, formados como resultado da divisão

celular no estrato basal, sofrem diferenciação programada à medida que migram em direção à superfície da pele para formarem finalmente corneócitos, que são células mortas, porém intactas, estreitamente ligadas, que formam o princípio de barreira da camada epidérmica mais externa (MADISON, 2003; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Figura 5 - Estrutura epidérmica e diferenciação de queratinócitos



Fonte: Adaptado de D'Orazio et al. (2013).

A derme, derivada da mesoderme, está subjacente à epiderme. Nela se encontram fibras elásticas e colágeno. A derme abriga folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que fornecem suporte mecânico e nutritivo à pele. Além disso, a derme possui uma rede de vasos linfáticos altamente vascularizados. A derme contém várias células, como macrófagos e fibroblastos. Os macrófagos são responsáveis pela eliminação de material estranho e porções de tecido danificadas por insultos, enquanto os fibroblastos têm a função de sintetizar e renovar a matriz extracelular (ECM) (BARONI et al., 2012; FUCHS; RAGHAVAN, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MASUDA et al., 2012).

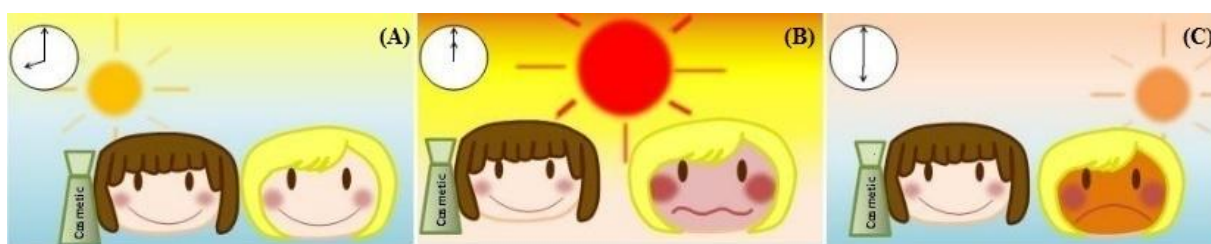
2.3.1 Envelhecimento cutâneo

Os tecidos mudam gradualmente ao longo do tempo e essas alterações são

visivelmente reconhecidas na pele humana (FRIEDMAN, 2005; SILVA et al., 2013). O processo de envelhecimento da pele ocorre através de dois mecanismos biologicamente divergentes: envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento (FARAGE et al., 2008; KAMMEYER; LUITEN, 2015; RIZVI; RAZA; MAHDI, 2014; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011). O envelhecimento cronológico é considerado um fenômeno irreversível, no qual fatores genéticos e processos hormonais e metabólicos estão envolvidos, e ocorre quando a maquinaria de reparo se torna insatisfatória. O processo de reparo desempenha papel importante na prevenção do envelhecimento. Quando as células da pele danificadas não são reparadas, podem ocorrer mutações, que resultam em envelhecimento prematuro (QUAN et al., 2015).

Ao contrário do envelhecimento cronológico, o foto-envelhecimento é um fenômeno que pode ser evitado (KLIIGMAN; KLIIGMAN, 1986). Ele é causado pela exposição ambiental, principalmente àquela a longo prazo e inadequada à radiação UV (Figura 6) ou radiação UV partir de fontes de bronzeamento artificial (KAMMEYER; LUITEN, 2015; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2014). Os efeitos cutâneos promovidos pela radiação UV são cumulativos e dependem da duração, frequência e intensidade da exposição, juntamente com a proteção natural da pele (PANDEL et al., 2013). O foto-envelhecimento é responsável por 80 a 90% do envelhecimento da pele, como consequência dos efeitos deletérios do sol (KOHL et al., 2011; NATARAJAN et al., 2014).

Figura 6 – Exposição cutânea à radiação solar UV



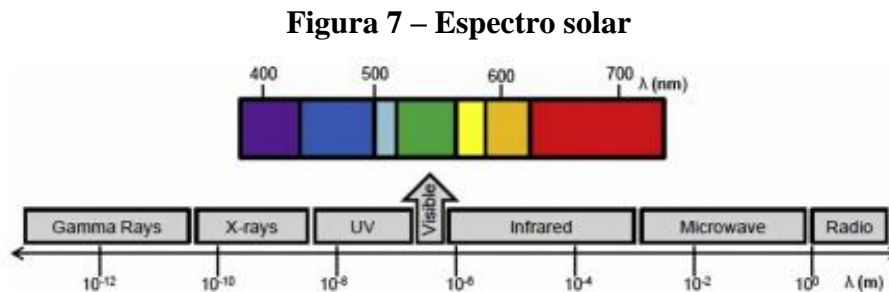
(A) Exposição à radiação UV com proteção (uso de protetor solar, esquerda) e sem proteção (direita); (B) Pele protegida (esquerda) e pele com início de eritema (direita); (C) Pele protegida (esquerda) e pele com eritema (direita).

Fonte: Adaptado de Wang et al. (2015).

2.4 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética que apresenta divisão e denominação de acordo com o conteúdo energético e o intervalo do

comprimento de onda (λ). Os raios do sol atingem a superfície terrestre, principalmente, sob a forma de UV (280 - 400 nm), visível (400 - 700 nm) e infravermelha (> 700 nm) (Figura 7) (DIFFEY; KOCHEVAR, 2007).



Fonte: Baron e Suggs (2014).

A radiação solar apresenta-se distribuída na superfície terrestre como 50% de luz visível, 45% de infravermelha e 5% de UV (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006). De acordo com as designações oficiais da *Comission Internationale de l'Eclairage* (CIE), a radiação UV é classificada em UVA (315 - 400 nm), UVB (280 - 315 nm) e UVC (100 - 280 nm) (CIE, 1999; 1987). No entanto, existem diferenças sutis nas subdivisões descritas na literatura. Na fotobiologia, esta radiação é comumente dividida em 320 - 400 nm para UVA, 290 - 320 nm para UVB e 200 - 290 nm para UVC (DIFFEY, 2002). Segundo Baron e Suggs (2014), a radiação UV é considerada a mais biologicamente ativa e, portanto, a de maior impacto sobre a saúde e a doença.

2.4.1 Efeitos da radiação UV na pele humana

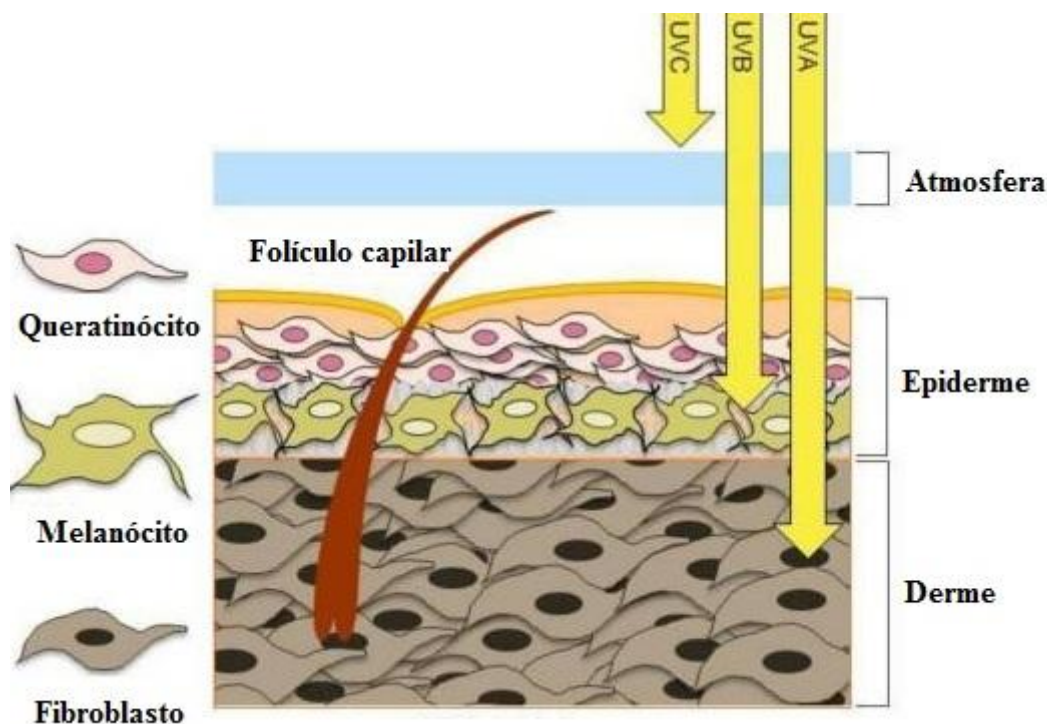
Diversos fatores ambientais influenciam a intensidade da radiação UV que atinge a terra. A altura e a cobertura das nuvens, os poluentes ambientais, a estação do ano e os níveis de ozônio estratosférico são alguns exemplos (ANWAR et al., 2016; DE GRUIJL; VAN DER LEUN, 2000). A camada de ozônio absorve eficientemente a radiação UV até cerca de 310 nm, impedindo desta forma a passagem dos raios UVC e a maior parte dos raios UVB (90-95%). No entanto, os raios UVA são pouco absorvidos (D'ORAZIO et al., 2013). Devido a danos substanciais na camada protetora de ozônio, quantidade maior de radiação UVB tem atingindo o solo (SIVASAKTHIVEL; REDDY, 2011).

A radiação UVB, normalmente mais intensa no horário do meio dia, é responsável

por causar o eritema. A UVB é altamente genotóxica e, por apresentar menor comprimento de onda, ela atua principalmente na epiderme (Figura 8). A UVB induz, particularmente, danos diretos ao DNA, sendo os principais a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e fotoprodutos de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4PPs). Além disso, a UVB pode causar danos indiretos às biomoléculas, através da produção de espécies reativas e da diminuição significativa dos antioxidantes presentes na pele (HALLIDAY; LYONS, 2008; ISHIDA; SAKAGUCHI, 2007; KOZMA; EIDE, 2014; PATTISON; DAVIES, 2006; SWALWELL et al., 2012).

Por outro lado, a UVA compreende 90 - 95% da radiação solar que chega à superfície terrestre. Comparada à UVB, a UVA pode penetrar profundamente a pele, atingindo a camada dérmica basal. A UVA tem sido considerada a responsável pelas mudanças observadas na pele foto-envelhecida, uma vez que age diretamente ou indiretamente nas moléculas e estruturas celulares através de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas (D'ORAZIO et al., 2013), além de ser considerada o principal fator etiológico para o câncer do tipo melanoma (EDING et al., 2015).

Figura 8 - Comprimento de onda UV e profundidade de penetração na pele



Fonte: Adaptado de Amaro-Ortiz; Yan; D'orazio (2014).

A exposição crônica e excessiva à radiação UV resulta em efeitos deletérios à pele

humana, podendo gerar quadros clínicos agudos como queimaduras e imunossupressão (MURPHY, 2009), e crônicos como câncer e envelhecimento prematuro da pele (AMARO-ORTIZ; YAN; D’ORAZIO, 2014). Clinicamente, os sinais do foto-envelhecimento da pele incluem a presença de rugas profundas, flacidez, pigmentação atípica, manchas, perda da elasticidade, textura áspera e laxismo (NAYLOR et al., 2011) em contraste àquela cronicamente envelhecida e protegida da radiação UV, que se apresenta com rugas finas e elasticidade diminuída (SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 2000). As áreas da pele expostas ao sol, incluindo antebraços, mãos, pescoço, parte superior do tórax e face, são os locais onde essas mudanças ocorrem com mais frequência (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008).

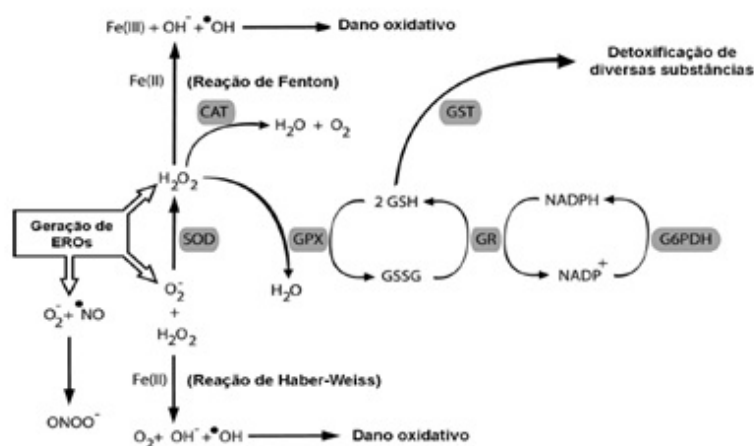
A radiação UV desencadeia reações fotoquímicas na pele a partir da excitação de elétrons em cromóforos ou fotossensibilizadores, que são componentes celulares com um espectro de absorção que interagem com determinado comprimento de onda (BARON; SUGGS, 2014). Esta interação pode causar danos, de forma direta, com substratos moleculares, como o DNA (reações de foto-sensibilização tipo I) ou indiretamente, gerando oxigênio molecular (reações de foto-sensibilização tipo II) e, conseqüentemente, ERO (CADET et al., 2009; PATTISON; DAVIES, 2006).

O estresse oxidativo promovido pela radiação UV na pele (foto-oxidação) ocorre devido à formação de ERO por cromóforos endógenos, atuando como fotossensibilizadores (CADET et al., 2009). Apesar de ERO serem rapidamente removidas por antioxidantes enzimáticos (por exemplo, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-px)) e não enzimáticos (por exemplo, ácido ascórbico, tocoferol e glutathione), o excesso de UV na pele pode danificar estruturalmente e funcionalmente as células, levando ao dano oxidativo de biomoléculas (KAMMEYER; LUITEN, 2015; MEADOWS et al., 2014; PANDEL et al., 2013). ERO, incluem os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), peroxila (LOO^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}), bem como os não radicalares peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (FLOYD et al., 2011; MASAKI; ATSUMI; SAKURAI, 2010). Além de ERO, espécies reativas de nitrogênio (ERN) podem ser geradas e incluem óxido nítrico (NO^{\cdot}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO^{2-}), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A formação de ERO (Figura 9) se dá, primeiramente, pela redução de um elétron da molécula de O_2 , resultando na formação de $O_2^{\cdot-}$, que pode ser dismutado em H_2O_2 ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da SOD (TURRENS, 2003). Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o NO^{\cdot} gerando $ONOO^-$, que é capaz de oxidar biomoléculas como proteínas,

lipídios, DNA e RNA (PAMPLONA; CONSTANTINI, 2011). Em sistemas biológicos, o $\cdot\text{OH}$ também pode ser formado por ciclos redox pelas reações de Fenton (Haber-Weiss), onde o ferro livre (Fe^{2+}) e outros metais de transição podem ser responsáveis pela formação deste radical. Outra via importante é do radical hidroperoxil ($\cdot\text{HO}_2$), que representa a forma protonada dos superóxidos e pode formar H_2O_2 , podendo reagir com metais, como o Fe e o cobre (Cu), gerando ainda mais $\cdot\text{OH}$ (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Figura 9 - Mecanismo de defesa antioxidante



As defesas antioxidantes enzimáticas trabalham em conjunto para proteger as células contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). São mostradas na via: Superoxido Dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona S-transferase (GST), glutaciona redutase (GR), glutaciona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

Fonte: Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de ERO, entretanto, a membrana celular é um dos componentes mais atingidos. A peroxidação lipídica induzida por radiação UV pode conduzir a desorganização da membrana celular com liberação de fosfolipídios. Estes, associados ao aumento das atividades da fosfolipase A_2 e da ciclooxigenase-2 (COX2) induzidas, também, pela radiação UV, resultam em níveis maiores de produção de prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E2, que causa inflamação na pele (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). De maneira geral, na lipoperoxidação, ERO atacam moléculas de lipídios contendo duplas ligações, especialmente ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Além de fosfolipídios, glicolipídios e colesterol são alvos de modificação peroxidativa prejudicial e potencialmente letal. Sob condições fisiológicas ou baixos níveis de peroxidação lipídica, as células estimulam a sua manutenção e sobrevivência através dos

sistemas de defesa antioxidante em resposta ao estresse adaptativo. Porém, quando a extensão do dano oxidativo supera a capacidade de reparação, as células são induzidas aos processos de apoptose ou necrose, podendo culminar no desenvolvimento de vários estados patológicos e no envelhecimento acelerado. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, no qual o $\cdot\text{OH}$ é geralmente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante deste processo (VOLINSKY; KINNUNEN, 2013).

O estresse foto-oxidativo cutâneo possui papel central na iniciação e condução da resposta celular, com ativação de diversas vias de sinalização celular, indução de metaloproteinases (MMPs), degradação e inibição da síntese do colágeno da matriz extracelular (MEC) (LEEM, 2015; MAJEED et al., 2011; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Neste sentido, ERO têm sido consideradas a principal causa do envelhecimento cutâneo, bem como estão envolvidas na resposta inflamatória dérmica e nos cânceres da pele (HARMAN, 1956; KAMMEYER; LUITEN, 2015; LEPHART, 2016; NARENHIRAKANNAN; HANNAH, 2013; NATARAJAN et al., 2014; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; RINNERTHALER et al., 2015; ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

A primeira defesa de proteção da pele é a síntese da melanina, pigmento que desempenha papel fundamental como agente fotoprotetor contra os efeitos prejudiciais da radiação UV (ROUZAUD et al., 2005). Em certas circunstâncias, a quantidade de melanina produzida não é suficiente para proteger o tecido cutâneo (GONZÁLEZ et al., 2008). Nesse sentido, diversas estratégias podem ser utilizadas para proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação UV, sendo a ingestão de compostos bioativos uma delas (AFAQ; KATIYAR, 2011; STAHL; SIES, 2012).

2.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico que tem como finalidades o reparo dos tecidos danificados e a neutralização da ação de agentes agressores (PEREIRA, 2009). A resposta imune à infecções ou lesões nos tecidos pode ser dividida em resposta inata ou adaptativa. O sistema imune inato é responsável pela resposta inicial à invasão de tecido. As fases de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular fazem parte desta resposta. Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e natural killer (NK) são componentes celulares primários do sistema imune inato (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

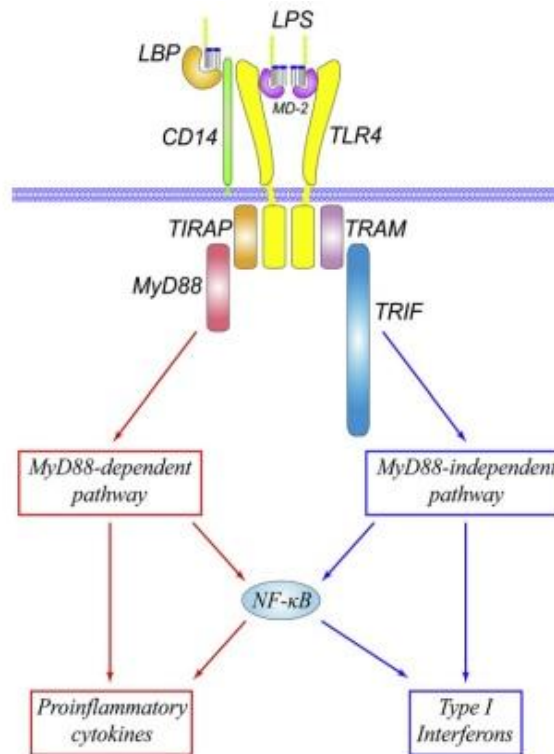
O sistema imunológico inato depende de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), como receptores *Toll-like* (TLRs) para reconhecer estruturas moleculares de patógenos invasores, chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS), desempenham importante papel na ativação de respostas causadas por infecção de bactérias gram-negativas (SELVATICI et al., 2006). O LPS é um glicolípido composto por região lipídica A unida a uma cadeia de carboidratos de cadeia longa e ramificada. A porção de lipídio A é considerada a responsável pela maior parte da atividade imunológica de LPS (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O papel do LPS está associado ao reconhecimento através do receptor *Toll-like* 4 (TLR4), que pode ativar vias de sinalização promovendo a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). A translocação do NF- κ B ativo para o núcleo, ativa a transcrição de genes que culminam na expressão de citocinas pró-inflamatórias (KAWASAKI; KAWAI, 2014; LU; YEH; OHASHI, 2008) (Figura 10).

A atividade de citocinas e outros mediadores de inflamação determinam, em grande parte, a magnitude da resposta inata. As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. Elas são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imune através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, bem como uma única citocina pode agir em diversos tipos de células. Frequentemente, são formadas em cascata; uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas. Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Nesse sentido, as citocinas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A produção de citocinas é normalmente auto-limitada, embora algumas citocinas possam persistir na circulação por longos períodos. Quando citocinas pró-inflamatórias são produzidas em excesso, instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos podem ser manifestados (ZHANG; AN, 2007). Dentre elas, a TNF- α é liberada primeiramente pelos macrófagos quando detectado lesões, modulando eventos metabólicos e imunológicos. Em sítios de infecção ou inflamação locais, a TNF- α inicia uma resposta imunológica que ativa mecanismos de defesa antimicrobianos e, uma vez que a infecção é erradicada, inicia-se o reparo tecidual (DINARELLO, 2000). A liberação sistêmica de TNF- α pode, no entanto, ativar uma cascata destrutiva de eventos que podem resultar em lesões teciduais, disfunção

orgânica e, potencialmente, em morte (MACEWAN, 2002). A IL-8, também é um dos principais mediadores da inflamação, o que contribui para o sequestro de neutrófilos em locais de lesão tecidual (WAGNER; ROTH, 2000).

Figura 10 - Visão geral da sinalização de LPS/TLR4



Fonte: Lu; Yeh; Ohashi (2008).

Células THP-1, têm sido amplamente utilizadas como modelo para o estudo da resposta imune, uma vez que apresenta semelhança em suas respostas quando comparada à monócitos entre células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano. Esta linhagem, designada como semelhante a um monócito imortalizado espontaneamente, é derivada do sangue periférico de um caso infantil de leucemia monocítica aguda (subtipo M5) (HEWARD; ROUX; LINDSAY, 2015).

CAPÍTULO III

3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Com o propósito de investigar o potencial do extrato de C-ficocianina como ingrediente bioativo para a formulação de nutricosméticos, parte desta tese foi realizada na *Università degli Studi di Milano* (Milão, Itália) e outra na Universidade Federal do Rio Grande - FURG. A tese resultou em três manuscritos, sendo um de revisão e outros dois de trabalho experimental:

1. Artigo de revisão: Potencial da *Spirulina* e seus metabólitos bioativos como agentes ingeridos para o cuidado da pele (manuscrito aceito para publicação na *Industrial Biotechnology*; consultar Apêndice).
2. Atividade imunomoduladora do extrato de C-ficocianina obtido da microalga *Spirulina* cultivada no sul do Brasil. Este trabalho foi realizado na *Università degli Studi di Milano*.
3. Efeito fotoprotetor do extrato de C-ficocianina contra o dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA em linhagem celular epidérmica. Este trabalho foi realizado na FURG.

3.1 POTENCIAL DA *Spirulina* E SEUS METABÓLITOS BIOATIVOS COMO AGENTES INGERIDOS PARA O CUIDADO DA PELE

Resumo

A nutrição é um dos parâmetros mais importantes envolvidos na modulação da condição e saúde da pele. A este respeito, a demanda por compostos naturais capazes de promover a saúde e a beleza da pele tem atraído a atenção de pesquisadores e empresas de todo o mundo. Uma opção interessante para atender essa demanda é o uso da microalga *Spirulina*, uma vez que está determinado que esta microalga possui potencial biotecnológico inquestionável, incluindo várias aplicações funcionais e nutricionais. Embora esta microalga tenha sido usada na nutrição humana desde tempos antigos, ela agora tem novas aplicações e está sendo estudada como ingrediente promissor para nutricosméticos. O presente artigo de revisão resume as atividades mais relevantes da *Spirulina*, principalmente de seus metabólitos biologicamente ativos, que são ingredientes interessantes para formulações nutricosméticas e um avanço importante para o cuidado da pele.

Palavras-chave: Ingredientes ativos. Microalgas. Nutricosméticos. Ficocianina. Saúde da pele. Proteção da pele.

THE POTENTIAL OF *Spirulina* AND ITS BIOACTIVE METABOLITES AS INGESTED AGENTS FOR SKIN CARE

Abstract

Nutrition is one of the most important parameters involved in modulating skin health and condition. In this regard, the demand for natural compounds capable of promoting skin health and beauty has been attracting the attention of researchers and companies around the world. An interesting option to meet this demand is the use of *Spirulina* microalga once it is determined that it has unquestionable biotechnological potential, including several functional and nutritional applications. Although this microalga has been used in human nutrition since ancient times, it now has new applications and is being studied as a promising ingredient for nutricosmetics. The present review article summarizes *Spirulina*'s most relevant activities, mainly its biologically active metabolites, which are interesting ingredients for nutricosmetic formulations and an important advance for skin care.

Key words: Active ingredients. Microalgae. Nutricosmetics. Phycocyanin. Skin health. Skin protection.

3.1.1 Introdução

O aumento da expectativa de vida, que vem sendo observado desde o início do século XXI, emergiu como uma nova preocupação para os países industrializados e para a ciência nutricional porque este é um dos desafios para oferecer novas estratégias para melhorar a qualidade da vida humana. Além disso tem sido observado que com o envelhecimento, há a necessidade na sociedade de parecer saudável e bonito (ROBERFROID, 2008). Neste contexto, e para beneficiar a aparência facial e melhorar a saúde da pele, a ingestão de suplementos nutricionais tem ganhando atenção e notoriedade (DRAELOS, 2010). Nos últimos 15 anos, pesquisadores e empresas em todo o mundo têm investido em pesquisas científicas buscando soluções para o bem-estar e a saúde da pele (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). Avanços realizados em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos identificaram as microalgas como meio para melhorar a saúde e a proteção da pele (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

As microalgas são um grupo diversificado de micro-organismos fotossintéticos, procarióticos e eucarióticos. As microalgas procarióticas são chamadas de cianobactérias. A *Spirulina* é uma cianobactéria fotossintética, multicelular, filamentosa e espiralada (Figura 1) produzida em grande escala. Esta microalga se destaca pelo alto teor de proteína e pela presença de ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. A diversidade e versatilidade da *Spirulina* promovem a sua aplicação numa vasta gama de produtos industriais, desde biocombustíveis de baixo valor agregado até suplementos alimentares e cosméticos de alto valor agregado (GERSHWIN; BELAY, 2007; SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). O presente artigo de revisão resume as atividades mais relevantes da *Spirulina*, principalmente de seus metabolitos biologicamente ativos, que são ingredientes interessantes para formulações nutricosméticas e um avanço importante para o cuidado da pele.

Figura 1 – *Spirulina* sp. LEB 18 do banco de cepas do LEB/FURG.
Ampliação da imagem 400 x



3.1.2 Pele Humana e Envelhecimento

A pele humana é composta por duas camadas, a epiderme e a derme, e cada uma apresenta funções estruturais e fisiológicas distintas (NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011). A epiderme é a parte mais exposta da pele ao ambiente externo. Sua principal função é proteger a pele de ameaças ambientais potencialmente perigosas e proporcionar barreiras bioquímicas, químicas, físicas e imunológicas. Abaixo da epiderme está a derme, que é uma camada de tecido conjuntivo, que exerce função de suporte mecânico, compacto e flexível para a pele (BARONI et al., 2012).

Os tecidos mudam gradualmente ao longo do tempo. Essas alterações são facilmente reconhecidas na pele humana (FRIEDMAN, 2005). O processo de envelhecimento da pele ocorre através de dois mecanismos biologicamente divergentes: envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento (FARAGE et al., 2008). O envelhecimento cronológico é um fenômeno irreversível que inclui vários fatores como genética e processos hormonais e metabólicos, quando a maquinaria de reparo torna-se insatisfatória. O processo de reparo desempenha papel importante na prevenção do envelhecimento. Quando as células danificadas da pele não são reparadas, podem ocorrer mutações, o que resulta em envelhecimento prematuro (QUAN et al., 2015).

Ao contrário do envelhecimento cronológico, o fotoenvelhecimento é um

fenômeno evitável (KLIEMAN; KLIEMAN, 1986). Ele é causado pela exposição ambiental e principalmente pela exposição prolongada e inadequada à radiação solar ou à luz ultravioleta (UV) de fontes de bronzeamento artificial (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011). Os efeitos promovidos pela radiação UV na pele são cumulativos e dependem da duração, frequência e intensidade da exposição juntamente com a proteção natural da pele (PANDEL et al., 2013). O fotoenvelhecimento é responsável por 80 a 90% do envelhecimento da pele e é uma consequência dos efeitos deletérios do sol (NATARAJAN et al., 2014).

A radiação UV induz as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são responsáveis pela degradação de colágeno na matriz extracelular (ECM). Em nível molecular, a radiação UV ataca os queratinócitos e os fibroblastos, o que resulta na ativação dos receptores da superfície celular que iniciam as cascatas de sinais de transdução. Isso, por sua vez, leva a uma variedade de mudanças moleculares e causa a quebra do colágeno e uma diminuição de sua síntese (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011). Supõe-se que o colapso dérmico do colágeno é seguido por reparos imperfeitos e resulta em um déficit na integridade estrutural da pele, na formação de uma cicatriz solar e, finalmente, na atrofia da pele clinicamente visível com formação de sulcos profundos e rugas (PANDEL et al., 2013). Outros sinais clínicos de fotoenvelhecimento incluem pigmentação atípica, perda de elasticidade, aparência coriácea, frouxidão, secura, perda da tonalidade da pele e aparência de textura áspera (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011). As áreas da pele expostas ao sol, incluindo os antebraços, as mãos, o pescoço, a parte superior do tórax e o rosto são os locais onde essas mudanças ocorrem com maior frequência (HELFRICH; SACHS; VOORHEES, 2008). Outro processo do dano cutâneo induzido por UV é a fotocarcinogênese (MARROT; MEUNIER, 2008). A radiação UV induz (direta ou indiretamente) uma variedade de danos ao DNA, incluindo dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4PPs) (FREIDBERG, 2016; OSAKABE et al., 2015). Outros danos, tais como ligações cruzadas de DNA-proteína, quebras das cadeia do DNA, 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-dG), bases de pirimidina oxidadas, timidinas, dano de purinas e dano de citosinas também podem ser gerados (CADET et al., 2009; DOUKI, 2013; PATRICK; RAHN, 1976; PEAK; PEAK; CARNES, 1987).

Estes danos ocorrem, em grande parte, pela geração de radicais livres, especialmente espécies reativas de oxigênio (ERO). A produção de ERO devido ao estresse oxidativo intracelular e extracelular é considerada a principal causa do envelhecimento (KOHL et al., 2011). Na pele, de 1,5 a 5% do oxigênio consumido é convertido em ERO por processos intrínsecos (POLJSAK; DAHMANE; GODIC, 2012). As ERO são constantemente

gerados em queratinócitos e fibroblastos e são rapidamente removidos por substâncias antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas para evitar o sistema vivo dos efeitos nocivos dos radicais livres (KAMMEYER; LUITEN, 2015). No entanto, quando produzidos em excesso, eles podem danificar todos os componentes celulares (MEADOWS et al., 2014). ERO também podem induzir a ativação de vias de sinalização relacionadas às alterações de crescimento, diferenciação, senescência e do tecido conjuntivo de células ou tecidos (LEEM, 2015).

3.1.3 Nutricosméticos

Nutricosméticos podem ser definidos como suplementos nutricionais. Eles são fontes concentradas de nutrientes ou outras substâncias utilizadas para melhorar a saúde da pele e a aparência facial (PICCARDI; MANISSIER, 2009). Este conceito foi formado pela interseção dos termos "nutracêuticos" e "cosmecêuticos" (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). De acordo com DeFelice, nutracêutico é "qualquer substância que seja um alimento ou parte de um alimento que ofereça benefícios médicos ou à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças", enquanto que cosmecêutico é um produto cosmético formulado com ingredientes bioativos que promovem benefícios além do creme cosmético tradicional (CHULASIRI, 2012). Embora o termo nutricosmético seja usado extensivamente no segmento de cuidados pessoais, este termo juntamente com os termos "nutracêutico" e "cosmecêutico" não são reconhecidos em nenhuma categoria de alimentos, drogas e cosméticos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2012a; FDA, 2016).

Apesar de ser relativamente novo, os nutricosméticos são uma tendência de mercado caracterizada por um crescimento exponencial anual (GLOBAL INDUSTRY ANALYST, 2015). Isso reflete que as pessoas estão se tornando conscientes de que produtos nutricionais não só contribuem para a saúde em geral e prevenção de doenças, como também para a saúde da pele (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012). Sabe-se que as funções da pele e a aparência saudável dependem de um suprimento suficiente de nutrientes essenciais, e as estratégias através da dieta são mais eficazes quando usadas contra o envelhecimento da pele causados por fatores ambientais (PARK, 2015; SZYSZKOWSKA et al., 2014). A compreensão dos efeitos das moléculas bioativas nas funções da pele tem estimulado o interesse em desenvolver suplementos nutricionais e alimentos funcionais com o objetivo de beneficiar a pele humana. Nutricosméticos podem atuar sobre a pele (pigmentação, clareamento, prevenção e reparação), unhas (fortalecimento) e cabelo (restauração,

crescimento e nutrição). Os ingredientes utilizados em nutricosméticos devem ser seguros e, em geral, eles têm principalmente funções antioxidantes e anti-inflamatórias (CARRIE, 2008).

Alguns dos ingredientes mais populares aplicados em formulações nutricosméticas (Tabela 1) envolvem combinações de micronutrientes, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados (incluindo linoléico e γ -linolênico), aminoácidos, carotenoides e polifenóis (TAEYMANS; CLAYS; BAREL, 2014), todos os quais podem ser encontrados em quantidades variadas na *Spirulina*, com exceção da vitamina D. Formas eficazes para a administração oral de biomassa ou extratos de *Spirulina* são aquelas comuns para outros nutricosméticos, incluindo produtos de mercado ou receitas de bricolage, como sopas, iogurtes, geleias, chocolate, barras de cereais e bebidas, cápsulas ou comprimidos (CARRIE, 2008; MORO, 2013).

Tabela 1 – Compostos presentes naturalmente na microalga *Spirulina* (exceção de vitamina D) com funções nutricosméticas.

Ingredientes	Funções na pele	Estudos
Vitamina A	▪ Ajuda na proliferação de queratinócitos e fibroblastos	KAFI et al., 2007
	▪ Induz a biossíntese de colágeno e reduz a expressão de MMP-1	VARANI et al., 2000
	▪ Previne danos induzidos pela radiação UV	
Vitamina C	▪ Protege a pele doando sequencialmente elétrons para neutralizar os radicais livres	BURKE, 2007
	▪ Serve como co-fator para as enzimas lisil e prolil hidroxilases, que são responsáveis pela estabilização e reticulação das moléculas de colágeno	McARDLE et al., 2002 TELANG, 2013
	▪ Interage com íons de cobre no sítio ativo da tirosinase e inibe a ação desta enzima, diminuindo a formação de melanina	
	▪ Promove a cicatrização de feridas e previne a hiperpigmentação pós-inflamatória em casos como acne vulgar e rosácea	
Vitamina E	▪ Melhora a hidratação da pele	
	▪ As vitaminas C e E trabalham sinergicamente contra os danos induzidos por UV, reduzindo tanto a apoptose celular quanto a formação de dímeros de timina	
	▪ Melhora a imunidade inata	GOMBART et al., 2005
Vitamina E	▪ Demonstra atividade anti-inflamatória	BURKE et al., 2000
	▪ Protege os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares da oxidação	ZINGG, 2007
	▪ Modula a transdução de sinal e a expressão gênica	WU et al., 2008
	▪ Protege a fotocarcinogênese	
Cobre	▪ Possui atividade antioxidante	PICKART et al., 2012

Continuação

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Induz a maturação de colágeno 	
Selênio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protege a pele do estresse oxidativo gerado pela radiação UV 	RAFFERTY et al., 1998
Zinco	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protege a pele do fotodano ▪ Exibe função antimicrobiana 	MITCHNICK et al., 1999
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Previne o dano ao DNA induzido por UV 	CHO et al., 2010
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Modula a expressão gênica do procolágeno 	HEINRICH et al., 2003
Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Melhora o sistema imune ▪ Previne a peroxidação lipídica ▪ Previne a sensibilidade da pele causada por eritema 	SCHAFFER et al., 2002
Ácidos graxos poli-insaturados	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contribui para a homeostase de barreira de permeabilidade normal ▪ Regula a imunidade e a inflamação cutânea 	KENDALL et al., 2017 KENDALL; NICOLAOU, 2013

3.1.4 Microalga *Spirulina*

A *Spirulina* tem sido utilizada como fonte de vários nutrientes desde a antiguidade. Essa microalga é conhecida como "superalimento" devido à diversidade e à concentração de nutrientes. Sua biomassa é facilmente digerida e absorvida no organismo humano, pois a sua membrana celular não contém celulose. Com base no peso seco, sua biomassa é composta por mais de 60% de proteína, sendo o restante carboidratos e lipídios. A *Spirulina* também possui conteúdo de ácidos nucleicos relativamente baixo, embora seja rica em pigmentos, vitaminas e minerais (HENRIKSON, 2009).

O aumento das evidências científicas e clínicas em torno dos benefícios nutricionais e potenciais para a saúde vem atraindo o seu uso em diversas aplicações de alimentos, como massas, sopas instantâneas, barras de cereais, biscoitos, salgadinhos, pipoca, lanches, sobremesas congeladas, *muffins*, rosquinhas, molhos de salada, confeitos, *smoothies* e até mesmo cerveja (GERSHWIN; BELAY, 2007). Essa microalga possui *status* GRAS emitido pelo FDA (FDA, 2003). Esse certificado permite que a *Spirulina* seja legalmente comercializada como suplemento alimentar ou como ingrediente bioativo em alimentos e bebidas funcionais (FDA, 2012b). Outras aplicações da biomassa de *Spirulina* ou seus metabolitos bioativos incluem alimentação animal, corantes para alimentos e cosméticos e biomoléculas purificadas (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Diversas empresas produzem e comercializam *Spirulina* para nutrição humana. Os maiores produtores do mundo estão localizados nos EUA e na Ásia. Nos EUA, a produção em larga escala começou há cerca de 40 anos pelas empresas Earthrise[®] (Califórnia) e Cyanotech Corporation (Hawaí) (GERSHWIN; BELAY, 2007). Anos mais tarde, outros países iniciaram a produção de *Spirulina*, em particular a Índia (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016), destacando-se a Parry Nutraceuticals (<http://www.parrynutraceuticals.com>). No início dos anos 2000, a China tornou-se o principal produtor mundial de microalgas, representando mais de 60% da produção total. O mercado mundial da *Spirulina* tem aumentado a uma taxa de crescimento anual de 15% e atualmente sua produção é de cerca de 15.000 toneladas (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). A biomassa produzida tem sido aplicada na produção de pó, comprimidos, cápsulas e bebidas (MORAIS et al., 2015).

A *Spirulina* apresenta uma ampla gama de compostos bioativos interessantes (Tabela 2) (CHOJNACKA et al., 2012; GERSHWIN; BELAY, 2007; MORAIS et al., 2015). A C-ficocianina (CFC) é o pigmento proteico acessório mais abundante em cianobactérias. Ela contém um cromóforo tetrapirrole aberto e a ficocianobilina, que está ligada

covalentemente à apoproteína. A aloficocianina também é uma importante ficobiliproteína, pois ela transfere energia para moléculas de clorofila (KILLILEA; O'CARRA, 1985). As propriedades benéficas promissoras da *Spirulina* podem ser devidas ao seu conteúdo de CFC (CHEN et al., 2012). Além disso, embora o β -caroteno seja o mais conhecido, a *Spirulina* contém um complexo antioxidante rico de pelo menos dez carotenoides. A ingestão diária de 2,5 g de *Spirulina* seria suficiente para fornecer uma notável 5.750 UI (3,5 mg) de β -caroteno, correspondendo a 115% da recomendação diária de vitamina A (HENRIKSON, 2009). Os carotenoides são frequentemente aplicados nas indústrias alimentar e farmacêutica devido a sua capacidade de pigmentação e propriedades antioxidantes (MORAIS et al., 2015).

Tabela 2 - Compostos bioativos presentes no gênero *Spirulina*.

Microalgas	Compostos bioativos	Concentrações (%) (m/m)	Estudos
<i>Spirulina</i> sp.	C-ficocianina	17,50	MORAIS et al., 2015
.	Aloficocianina	20,00	
<i>Spirulina fusiformis</i>	C-ficocianina	46,00	
	C-ficocianina	9,60	
	Aloficocianina	9,50	
<i>Spirulina platensis</i>	Fenólicos	0,71	
	Terpenoides	0,14	
	Alcaloides	3,02	
<i>Spirulina maxima</i>	Fenólicos	1,29	
	Flavonoides	0,46	
	Carotenoides totais	0,37	HENRIKSON, 2009
	Carotenos	0,20	
	β -caroteno	0,17	
	Outros carotenos	0,03	
	Xantofilas	0,17	
	Myxoxantofila	0,07	
	Zeaxantina	0,06	
	<i>Spirulina</i> sp.	Criptoxantina	0,01
Echinenone		0,01	
Outras xantofilas		0,02	
Clorofila		1,00	
γ -linolênico		1,35	
Glicolipídios		2,00	
Sulfolipídios		0,10	
Tiamina (vitamina B1)		< 0,01	MORO, 2013
Riboflavina (vitamina B2)	< 0,01		
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	Niacina (vitamina B3)	0,01	
	Ácido pantotênico (vitamina B5)	0,26	
	Piridoxina (vitamina B6)	< 0,01	
	Folato (vitamina B9)	0,05	

Cianocobalamina (vitamina B12)	0,01
α -Tocoferol (vitamina E)	< 0,01

Diversas investigações têm mostrado que a *Spirulina* desempenha importante papel nas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidante, imunomoduladora, anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana e antiviral. Esta microalga também apresenta efeitos positivos contra obesidade, desnutrição, diabetes, hiperlipidemia, anemia e toxicidade induzida por produtos químicos de metais pesados (GERSHWIN; BELAY, 2007; HENRIKSON, 2009; HOSSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013).

3.1.5 Qual é a evidência do papel da *Spirulina* no envelhecimento da pele?

3.1.5.1 Propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora

Uma dieta equilibrada fornece todos os nutrientes necessários para o bom funcionamento de órgãos ou tecidos. Para a manutenção de uma pele saudável, isso não é diferente (KRUTMANN; HUMBERT, 2011). Isso pode ser observado pelo desenvolvimento de distúrbios da pele como resposta a deficiências nutricionais. A suplementação oral de antioxidantes pode ser uma estratégia para melhorar as condições da pele nesses casos (BASAVARAJ; SEEMANTHINI; RASHMI, 2010).

Devido à sua bioatividade, a *Spirulina* foi reconhecida como matéria-prima potencial para a fabricação de produtos alimentares para cuidados com a pele, como observado em estudos clínicos (BATTISTI; COSTA; BERTOLIN, 2014; DARVIN et al., 2015). Nos trabalhos anteriores de nossa equipe de pesquisa, foi realizado um estudo controlado randomizado duplo-cego com 45 mulheres com idades entre 40 e 60 anos que ingeriram 2,8g/dia de *Spirulina*. Melhora significativa na pele, cabelo e unhas foi observada após 90 dias de tratamento (BATTISTI; COSTA; BERTOLIN, 2014).

Os compostos bioativos da *Spirulina*, como CFC e β -caroteno, apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e fotoprotetora promissoras. Estudos *in vitro* demonstraram que a CFC sequestra radicais peroxil, hidroxil e alcoxil, inibe a peroxidação lipídica (ROMAY et al., 2003; SHALABY; SHANAB, 2013; LIU et al., 2011), diminui o óxido nítrico (NO) e suprime a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CHERNG et al., 2007). Outras investigações relataram que a CPC exerce efeitos inibitórios no fator de necrose tumoral α (TNF- α) e nos níveis de nitrito no soro de camundongos (ROMAY et al.,

2011), e reprime a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6) em macrófagos e esplenócitos por meio da inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (KU et al., 2013).

A CFC também foi estudada como potencial inibidor da expressão de genes que regulam os fatores envolvidos na tumorigênese da pele. Gupta e Gupta (2012) demonstraram que a CFC pode inibir a ciclooxigenase-2 (COX-2), a IL-6, o transdutor de sinal e o ativador da proteína transcricional-3 (STAT3) e as expressões de ornitina descarboxilase após a administração tópica de CPC na pele de rato. As doses de CFC variaram de 50 a 400 μ g em 200 μ L de DMSO 50% e foram aplicadas imediatamente após a utilização de potente agente promotor tumoral (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)). Assim, CPC, um composto com forte atividade anti-inflamatória também pode atuar como agente quimiopreventivo (GUPTA; GUPTA, 2012). No entanto, deve-se notar que, os dados de expressão de genes de modelos de pele usados no desenvolvimento de fármacos podem fornecer evidências indiretas de aplicabilidade no cuidado da pele através de nutricosméticos.

O câncer da pele é considerado um processo complexo e de múltiplos passos (BIBBY, 1981; MARKS; FÜRSTENBERGER, 1986). O estudo das alterações precoces na pele e dos mecanismos envolvidos, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas são de interesse tanto para a pesquisa científica quanto para a prática clínica (NEAGU et al., 2016). Desta forma, a ingestão de compostos bioativos como estratégia nutricional para prevenir o câncer da pele foi evidenciada (KÖPCKE E KRUTMANN, 2008; SAEWAN E JIMTAISONG, 2013). No entanto, observa-se que a *Spirulina* tem sido pouco estudada em relação aos seus efeitos inibitórios sobre as respostas inflamatórias cutâneas induzidas por UVB e sobre a carcinogênese (YOGIANTI et al., 2014).

Estudo conduzido por Yogianti et al. (2014) demonstrou que a administração oral de 10% de *Spirulina* pode inibir o desenvolvimento e indução de tumores da pele induzidos por UVB em camundongos. Estes efeitos supressivos sobre a resposta aguda mediada pela exposição a UVB foram confirmados imuno-histoquimicamente, juntamente com uma diminuição significativa nas expressões de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL-1). A *Spirulina* também reduziu a formação epidérmica de 8-oxo-dG, indicando que ela exerceu efeito supressivo sobre a produção de ERO causada por UVB na pele. Além disso, esta microalga pode suprimir a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK), proteína quinase ativada por estresse /quinase c-Jun N-terminal (SAPK/JNK) e quinase extracelular regulada por sinal (ERK), demonstrando que a *Spirulina* possui vários locais efetivos para a inibição do

desenvolvimento do tumor da pele após a exposição aos UVB. Em resumo, presume-se que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias combinadas da *Spirulina* exercem efeitos antitumorais contra a radiação UVB na pele e dessa forma desempenham um papel importante na prevenção do câncer da pele (YOGIANTI et al., 2014). Esses dados suportam o papel quimiopreventivo da *Spirulina* com potencial promissor para uso amplo no tratamento quimioadjuvante do câncer da pele.

Além disso, o β -caroteno fornece proteção contra a peroxidação lipídica mediada por oxigênio singlete e foi considerado antioxidante *in vitro* eficiente de membrana (SCHAFER et al., 2002). Estudos também relataram que o β -caroteno pode reduzir negativamente os marcadores pró-inflamatórios em resposta a fontes ambientais na pele murina (VALACCHI et al., 2009), inibir a produção de NO e de prostaglandina E(2) e suprimir a expressão de IL-1 β , TNF- α , iNOS e COX-2 em células e em macrófagos primários (BAI et al., 2005). Acredita-se que a supressão desses mediadores inflamatórios promovidos pelo β -caroteno é devido à inibição da ativação de NF- κ B ao bloquear a translocação nuclear de NF- κ B p65 (BAI et al., 2005).

3.1.5.2 Atividade da antitirozinase

A melanina, que é um dos principais constituintes da cor da pele, é sintetizada por um processo que envolve várias reações químicas e enzimáticas chamadas melanogênese (BONAVENTURE; DOMINGUES; LARUE, 2013). Neste processo, a tirosinase é considerada a etapa enzimática chave e de limitação de velocidade da melanogênese (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995).

O acúmulo de uma quantidade anormal de melanina em várias partes da pele resulta no desenvolvimento de manchas pigmentadas que podem ser vistas como um problema estético. A superprodução de melanina e a hiperpigmentação anormal a partir da exposição à radiação UV pode causar aumento da produção de ERO, o que pode levar a várias lesões, incluindo inflamação, sardas, melasma e manchas da idade (TAIEB et al., 2011). Isso impulsiona a pesquisa com o objetivo de identificar ingredientes eficazes e seguros de clareamento da pele.

A CFC foi relatada como potencial inibidor da biossíntese de melanina. Wu et al. (2011) sugeriram que a CFC inibe a melanogênese por dois mecanismos: (1) ativação suprimida da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) através da *downregulation* da via p38 MAPK e (2) promoção da degradação do fator de transcrição

associado à microftalmia (MITF) via *upregulation* da via de sinalização MAPK/ERK. De acordo com Wu et al. (2000), a CPC pode fornecer uma abundância celular de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), que ativa a via MAPK/ERK a jusante; como resultado, há uma diminuição do MITF. A ativação da ERK1/2 resulta na fosforilação do MITF em S73, que induz a subsequente degradação proteasomal dependente da ubiquitina do MITF. No entanto, a CFC também pode exercer impacto negativo na fosforilação de p38 para restringir a ativação do CREB, o que resulta na expressão restrita do gene MITF (WU et al., 2000).

3.1.5.3 Atividades anti-colagenase e anti-elastase

Os fibroblastos são responsáveis pela produção de elastina e colágeno, que são indispensáveis para vários papéis protetores na pele humana. Elastina fornece elasticidade aos tecidos conjuntivos. No entanto, ela pode ser degradada pela elastase, uma enzima metaloproteinase (MECHAM et al., 1997). Apesar de sua forte resistência à degradação proteolítica, a exposição contínua à elastases causa danos às fibras elásticas e contribui para a formação de rugas. Aumento significativo da atividade da elastase tem sido descrito com a idade e, portanto, tem havido um interesse maior em compostos naturais para reduzir o envelhecimento da pele e as rugas (ONAR et al., 2012). O colágeno é o componente ECM mais importante e é responsável pela flexibilidade, elasticidade e resistência da pele. A sua degradação pode ser induzida por radiação UV. No processo de envelhecimento, os níveis de colágeno e elastina diminuem, resultando em perda de força e flexibilidade e, posteriormente, na formação de rugas (NDLOVU et al., 2013).

MMPs são membros da família das endopeptidases de zinco. Em células normais, a expressão de MMPs é baixa, e esses baixos níveis permitem a remodelação e manutenção do tecido conjuntivo saudável. No entanto, em condições patológicas, o nível de expressão de MMP aumenta consideravelmente. O resultado é a degradação de todos os componentes do ECM e da membrana basal (LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011; NDLOVU et al., 2013).

MMP-1 é a principal metaloprotease que degrada o colágeno. Os inibidores de tecidos das metaloproteinases (TIMPs) são inibidores naturais cuja função é controlar a expressão indesejada de MMPs e proteger ainda mais o ECM. O ERO gerado devido à exposição excessiva a radiação UV estimula as proteínas quinases ativadas por mitógenos que também estimulam o fator de proteína ativação 1 (AP-1) e conduzem à expressão descontrolada de MMPs. Neste contexto, estudos foram realizados para encontrar inibidores

naturais de AP-1 para inibir a expressão de MMPs. Apesar do fato de que não há relatórios disponíveis sobre as atividades anti-elastase e anti-colagenase da *Spirulina* e seus metabólitos, evidências dessas atividades foram encontradas em algas marinhas (THOMAS; MANIVASAGAN; KIM, 2014) e em extrato de plantas (THRING; HILI; NAUGHTON, 2009). Esses estudos oferecem uma visão e exigem uma investigação mais aprofundada sobre a microalga *Spirulina* para confirmar suas potenciais atividades anti-elastase e anti-colagenase.

3.1.6 Produtos disponíveis comercialmente com ingredientes à base de *Spirulina*

Pesquisas têm sido motivadas para o desenvolvimento de alimentos e cosméticos inovadores, que podem fornecer proteção e melhoria às condições de saúde da pele (Tabela 3). A adição de *Spirulina* em formulações cosméticas topicamente aplicadas mostrou-se eficaz em cuidados com a pele jovem e madura (DELSIN et al., 2015; SOUZA; MAIA, 2017). Além disso, os ingredientes à base de *Spirulina* têm potencialidade para aplicações em nutricosméticos, uma vez que essa microalga já está legalmente autorizada como suplemento alimentar (FDA, 2003; FDA, 2012b). Este mercado, que está em expansão, provavelmente atrairá milhares de consumidores nos próximos anos, uma vez que os compostos bioativos utilizados em formulações nutricosméticas podem modular múltiplas funções biológicas no organismo.

Tabela 3 - Exemplos de produtos com ingredientes à base de *Spirulina* que apresentam diferentes benefícios à pele e produtos ingeríveis.

Objeto de estudo	Objetivo do estudo	Estudos	
Formulações dermatocósméticas contendo extrato de <i>Spirulina</i>	Benefícios cutâneos a longo prazo, tais como proteção da função de barreira cutânea, hidratação e controle da oleosidade	DELSIN et al., 2015	
Protetor solar com adição de antioxidantes	Melhora significativa da pigmentação e elasticidade da pele, bem como da diminuição da degradação do colágeno dérmico	SOUZA; MAIA CAMPOS, 2017	
Produto cosmético	Função na pele (de acordo com o fabricante)	Empresa/País	Website
<i>Sensitive Skin Organic Cream with Spirulina</i>	Previne a desidratação e o envelhecimento prematuro	MicrOlife Itália	https://microlife.bio
<i>Skin Whitening Formula Spirulina & Yogurt</i>	Ajuda no clareamento da pele	Natural Bestskin Co. Tailândia	https://3618-th.all.biz
<i>Face Mask Spirulina</i>	Ajuda na hidratação da pele	Maria Åkerberg Noruega	http://www.mariaakerberg.no
<i>Face Algae Mask With Spirulina</i>	Ajuda na desintoxicação da pele, reduz o rubor e acalma irritação da pele	Bielenda Professional Polônia	http://bielendaprofessional.pl
Alimento	Empresa	País	Website
Cápsulas, comprimidos, pó	Earthrise®	EUA	http://earthrise.com
Comprimidos	Cyanotech Corporation	EUA	https://www.cyanotech.com
Comprimidos, pó	Parry Nutraceuticals	Índia	http://www.parrynutraceuticals.com

Continuação

Cápsulas, comprimidos, pó	Hainan DIC Microalgae Co., Ltd	China	http://www.dlt-spl.co.jp/business/en/spirulina/
Pó	Jiangsu Cibainian Nutrition Food Co. Ltd.	China	http://jcnfcl.en.china.cn
Comprimidos, pó	FEBICO (Far East Bio-Tec Co.)	Taiwan	http://www.febico.com
Bebidas de beleza bioativas	Beauty & Go	Reino Unido	https://www.mybeautyandgo.co.uk
Cápsulas, pó	Olson Microalgas Macronutrição	Brasil	http://www.olson.com.br
Macarrão, barras de cereal, biscoitos, pedaços de pão, cápsulas	MicrOlife	Itália	https://microlife.bio

3.1.7 Conclusões e Perspectivas Futuras

Em conclusão, os ingredientes com funcionalidades bioativas desempenham papel fundamental na saúde e proteção da pele com o objetivo de minimizar os múltiplos danos que ocorrem durante o processo de envelhecimento humano. A ingestão de nutricosméticos contendo *Spirulina* ou seus constituintes, especialmente C-ficocianina e carotenoides, pode configurar uma terapia de atenuação desses danos. Várias atividades da *Spirulina*, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora foram bem investigadas nos últimos anos. No entanto, ainda há falta de pesquisa sobre a inibição de elastase, colagenase e tirosinase. Os efeitos benéficos observados atualmente tornam a *Spirulina* e seus metabólitos ingredientes promissores para formulações de nutricosméticos e podem fornecer proteção e benefícios para a saúde da pele.

Referências

- ANUNCIATO, T. P.; DA ROCHA FILHO, P. A. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 51-54, 2012.
- BAI, S. K.; LEE, S. J.; NA, H. J.; HA, K. S.; HAN, J. A.; LEE, H.; KWON, Y. G.; CHUNG, C. K.; KIM, Y. M. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 37, n. 4, p. 323-334, 2005.
- BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 257-262, 2012.
- BASAVARAJ, K. H; SEEMANTHINI, C.; RASHMI R. Diet in dermatology: present perspectives. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. 205-210, 2010.
- BATTISTI, B. Z.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Nutricosmetics aging process in women. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 29, p. 51-62, 2014.
- BIBBY, M. C. The specificity of early changes in the skin during carcinogenesis. **British Journal of Dermatology**, v. 104, p. 485-488, 1981.
- BONAVENTURE, J.; DOMINGUES, M. J.; LARUE, L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, p. 316-325, 2013.
- BURKE, K. E. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. **Dermatology and Therapy**, v. 20, n. 5, p. 314-21, 2007.

BURKE, K. E.; CLIVE, J.; COMBS, G. F. JR.; COMMISSO, J.; KEEN, C. L.; NAKAMURA, R. M. Effects of topical and oral vitamin E on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation in Skh:2 hairless mice. **Nutrition and Cancer**, v. 38, p. 87-97, 2000.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; DI MASCIO, P. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p. 903-911, 2009.

CARRIE, M. Nutricosmetics: Decoding the convergence of beauty and healthcare. In: **“In-Cosmetics” Conference**, Amsterdam, 2008.

CHEN, J. C.; LIU, K. S.; YANG, T. J.; HWANG, J. H.; CHAN, Y. C.; LEE, I. T. *Spirulina* and C-phycoerythrin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v.15, n. 6, p. 252-256, 2012.

CHERNG, S. C.; CHENG, S. N.; TARN, A.; CHOU, T. C. Anti-inflammatory activity of c-phycoerythrin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Life Sciences**, v. 81, n. 19-20, p. 1431-5, 2007.

CHO, S.; LEE, D. H.; WON, C. H.; KIM, S. M.; LEE, S.; LEE, M. J.; CHUNG, J. H. Differential effects of lowdose and high-dose beta-carotene supplementation on the signs of photoaging and type I procollagen gene expression in human skin in vivo. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 221, n. 2, p. 160–171, 2010.

CHOJNACKA, K.; SAEID, A.; WITKOWSKA, Z.; TUHY, L. Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. **Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, p. 20-28, 2012.

CHULASIRI, M. Antiaging cosmeceuticals from pigmented rice. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 1-30, 2016.

DARVIN, M. E.; JUNG, S.; SCHANZER, S.; RITCHER, H.; KURTH, E.; THEIDE, G.; MEINKE, M. C.; LADEMANN, J. Influence of the systemic application of blue–green *Spirulina platensis* algae on the cutaneous carotenoids and elastic fibers in vivo. **Cosmetics**, v. 2, p. 302-312, 2015.

DEFELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 59-61, 1995.

DELSIN, S. D.; MERCURIO, D. G.; FOSSA, M. M.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing *Spirulina* extract on young and mature skin: effects on the skin hydrolipidic barrier and structural properties. **Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics**, v. 4, n. 4, p. 1-5, 2015.

DOUKI, T. The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1286-1302, 2013.

DRAELOS, Z. D. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. **Clinics in Dermatology**,

v. 28, p. 400-408, 2010.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSENER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 2, p. 87-95, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127**. CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2003. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm267267.pdf>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)**. 2012a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cosmetics/guidanceregulation/lawsregulations/ucm074201.htm>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000424**. 2012b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm335743.htm>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Labeling & Nutrition**. 2016. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm2006860.htm>>. Acesso em mai. 2017.

FRIEDBERG, E. C. A history of the DNA repair and mutagenesis field: the discovery of base excision repair. **DNA Repair**, v. 37, p. 35-39, 2016

FRIEDMAN, O. Changes associated with the aging face. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 13, p. 371-380, 2005.

GERSHWIN, A.; BELAY, A. **Spirulina in Human Nutrition and Health**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. **The Global Nutricosmetics Market: Trends, Drivers & Projections**. 2015. Disponível em :<http://www.strategyr.com/MarketResearch/Nutricosmetics_Market_Trends.asp>. Acesso em Maio 2017.

GOMBART, A. F. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. **Future Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1151-1165, 2009.

GUPTA, N. K.; GUPTA, K. P. Effects of C-phycoyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 941-948, 2012.

HEINRICH, U.; GARTNER, C.; WIEBUSCH, M.; EICHLER, O.; SIES, H.; TRONNIER, H.; STAHL, W. Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 98-101, 2003.

HELFRICH, Y. R.; SACHS, D. L.; VOORHEES, J. J. Overview of skin aging and photoaging. **Dermatology Nursing**, v. 20, n. 3, p. 177–184, 2008.

HENRIKSON, R. **Earth Food *Spirulina***. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

HOSSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231-1237, 2013.

KAFI, R.; KWAK, H. S.; SCHUMACHER, W. E.; CHO, S.; HANFT, V. N.; HAMILTON, T. A.; KING, A. L.; NEAL, J. D.; VARANI, J.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J.; KANG, S. Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). **Archives of Dermatology**, v. 143, n. 5, p. 606-12, 2007.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidative events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KENDALL, A. C.; KIEZEL-TSUGUNOVA, M.; BROWNBRIDGE, L. C.; HARWOOD, J. L.; NICOLAOU, A. Lipid functions in skin: differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2017.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 141-164, 2013.

KILLILEA, S. D.; O'CARRA, P. Structure and apoprotein linkages of phycourobilin S. **Biochemical Journal**, v. 226, p. 723-731, 1985.

KLIGMAN, L. H.; KLIGMAN, A. M. The nature of photoaging: its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, p. 215-227, 1986.

KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 873-84, 2011.

KÖPCKE, W.; KRUTMANN, J. Protection from sunburn with beta-carotene—a meta-analysis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 284–288, 2008.

KRUTMANN, J.; HUMBERT, P. **Nutrition for Healthy Skin: Strategies for Clinical and Cosmetic Practice**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

KU, C. S.; PHAM, T. X.; PARK, Y.; KIM, B.; SHIN, M. S.; KANG, I.; LEE, J. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 4, p. 2981–2988, 2013.

LEEM, K. H. Effects of *Olibanum* extracts on the collagenase activity and procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts and tyrosinase activity. **Advanced Science and Technology Letters**, v. 88, p. 172–175, 2015.

LIU, J. G.; HOU, C. W.; LEE, S. Y.; CHUANG, Y.; LIN, CHIH, C. Antioxidant effects and

UVB protective activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v.46, n. 7, p. 1405–1410, 2011.

LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **European Respiratory Journal**, v. 38, p. 191-208, 2011.

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. Experimental evidence that skin carcinogenesis is a multistep phenomenon. **British Journal of Dermatology**, v. 115, p. 1-8, 1986.

MARROT, L.; MEUNIER, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, p. 139-148, 2008.

McARDLE, F.; RHODES, L. E.; PARSLEW, R.; JACK, C. I.; FRIEDMANN, P. S.; JACKSON, M. J. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 1355-1362, 2002.

MEADOWS, C.; MOORE, D. J.; MOORE, D. M.; DRAELOS, Z. D.; KERN, D. Age-related NADH oxidase (arNOX)-catalyzed oxidative damage to skin protein. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, p. 645-652, 2014.

MECHAM, R. P.; BROEKELMANN, T. J.; FLISZAR, C. J.; SHAPIRO, S. D.; WELGUS, H. G.; SENIOR, R. M.. Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18071–18076, 1997.

MITCHNICK, M. A.; FAIRHURST, D.; PINNELL, S. R. Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, p. 85-90, 1999.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

MORO, G. M. B. **Potencial nutricosmético da microalga *Spirulina* em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo***. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Rio Grande, 2013.

NATARAJAN, V. T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 7, p. 542-551, 2014.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, p. 249–256, 2011.

NDLOVU, G.; FOUCHE, G.; TSELANYANE, M.; CORDIER, W.; STEENKAMP, V. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 304–310, 2013.

NEAGU, M.; CARUNTU, C.; CONSTANTIN C.; BODA, D.; ZURAC, S.; SPANDIDOS, D.

A.; TSATSAKIS, A. M. Chemically induced skin carcinogenesis: updates in experimental models (review). **Oncology Reports**, v.35, n. 5, p. 2516–2528, 2016.

ONAR, H. C.; YUSUFOGLU, A.; TURKER, G.; YANARDAG, R. Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. **Journal of Medical Plants Research**, v. 6, n. 5, p. 716-726, 2012.

OSAKABE A, TACHIWANA H, KAGAWA W.; HORIKOSHI, N.; MATSUMOTO, S.; HASEGAWA, M.; MATSUMOTO, N.; TOGA, T.; YAMAMOTO, J.; HANAOKA, F.; THOMÄ, N. H.; SUGASAWA, K.; IWAI, S.; KURUMIZAKA, H. Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6–4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

PANDEL, R.; POLJŠAK, B.; GODIC, A.; DAHMANE, R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Notices: Dermatology**, v. 2013, 2013.

PARK, K. Role of micronutrients in skin health and function. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 207-217, 2015.

PATRICK H.; RAHN R. O. Photochemistry of DNA and polynucleotides: photoproducts. In: Wang S. Y. **Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids**. New York, NY: Academic Press, p. 35-91, 1976.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G.; CARNES, B. A. Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 3, p. 381-387, 1987.

PICCARDI, N.; MANISSIER, P. Nutrition and nutritional supplementation: impact on skin health and beauty. **Dermato-endocrinology**, v. 1, n. 5, p. 271–274, 2009.

PICKART, L.; VASQUEZ-SOLTERO, J. M.; MARGOLINA, A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIC, A. Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 21, n. 2, p. 33-36, 2012.

QUAN, C.; CHO, M. K.; PERRY, D.; QUAN, T. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 62, 2015.

RAFFERTY, T. S.; MCKENZIE, R. C.; HUNTER, J. A.; HOWIE, A. F.; ARTHUR, JR.; NICOL, F.; BECKETT, G. J. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochemical Journal**, v. 332, p. 231-236, 1998.

ROBERFROID, M. B. **Aliments Fonctionnels: Définitions, Concepts et Strategies**. In:

ROBERFROID, M.; COXAM V.; DELZENNE, N. *Aliments Fonctionnels*. Paris: Lavoisier, p. 53-72, 2008.

ROMAY, C. H.; GONZALÉZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.

ROMAY, C.; DELGADO R.; REMIREZ D.; GONZÁLES, R.; ROJAS, A. Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 9, p. 733-736, 2001.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 129-141, 2013.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1247, p. 1-11, 1995.

SCHAFER, F. Q.; WANG, H. P.; KELLEY, E. E.; CUENO, K. L.; MARTIN, S. M.; BUETTNER, G. R. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 383, n. 3-4, p. 671-681, 2002.

SCHAFER, F. Q.; WANG, H. P.; KELLEY, E. E.; CUENO, K. L.; MARTIN, S. M.; BUETTER, G. R. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 3-4, p. 671-681, 2002.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Antiradical and antioxidant activities of different *Spirulina platensis* extracts against DPPH and ABTS radical assays. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 2, n. 1, 2013.

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

SOUZA, C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants *Spirulina* and *dimethylmethoxy chromanol* on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, p. 52-64, 2017.

SZYSZKOWSKA, B.; ŁEPECKA-KLUSEK, C.; KOZŁOWICZ, K.; JAZIENICKA, I.; KRASOWSKA, D. The influence of selected ingredients of dietary supplements on skin condition. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 31, n. 3, p. 174-181, 2014.

TAEYMANS, J.; CLARYS, P.; BAREL, A. O. **Use of Food Supplements as Nutricosmetics in Health and Fitness**. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. (Eds). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 583-596. 2014.

TAIEB, A.; CARIO-ANDRE, M.; BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Inhibitors and enhancers of melanogenesis. In: BOROVANSKY J.; RILEY P. A. **Melanins and Melanosomes**. Wiley-Blackwell: Weinheim, Germany, p. 117-166, 2011.

TELANG, P. S. Vitamin C in dermatology. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 2, p. 143–146, 2013.

THOMAS, N. V.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Potential matrix metalloproteinase inhibitors from edible marine algae: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1090–1100, 2014.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 27, p. 1-11, 2009.

VALACCHI, G.; PECORELLI, A.; MENCARELLI, M.; MAIOLI, E.; DAVIS, P. A. Beta-carotene prevents ozone-induced proinflammatory markers in murine skin. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 4-5, p. 241-247, 2009.

VARANI, J.; WARNER, R. L.; GHARAEI-KERMANI, M.; PHAN, S. H, KANG, S.; CHUNG, J. H.; WANG, Z. Q.; DATTA, S. C.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 480-6, 2000.

WU, L. C.; LIN, Y. Y.; YANG, S. Y.; WENG, Y. T.; TSAI, Y. T. Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2011.

WU, M.; HEMESATH, T.J.; TAKEMOTO, C.M.; HORSTMANN, M. A.; WELLS, A. G.; PRICE, E. R.; FISHER, D. Z.; FISHER, D. E. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. **Genes & Development**, v. 14, n. 3, p. 301-312, 2000.

WU, S.; GAO, J.; DINH, Q. T.; CHEN, C.; FIMMEL, S. IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2288- 2296, 2008.

YOGIANTI, F.; KUNISADA, M.; NAKANO, E.; ONO, R.; SAKUMI, K.; OKA, S.; NAKABEPPU, Y.; NISHIGORI, C. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 10, p. 2610-9, 2014.

ZINGG, J. M. Modulation of signal transduction by vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 481-506, 2007

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

3.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA OBTIDO DA MICROALGA *Spirulina* CULTIVADA NO SUL DO BRASIL

Resumo

A C-ficocianina (CFC) é uma ficobiliproteína presente na microalga *Spirulina*. Nos últimos anos, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que este composto possui inúmeras propriedades terapêuticas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora. Particularmente, efeitos imunossupressores quanto imunoestimuladores foram observados quando células do sistema imune inato foram estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Contudo, em caso de imunoestimulação, nota-se ainda que há uma lacuna quanto ao reconhecimento do receptor envolvido no processo de inflamação, bem como na expressão de genes pró-inflamatórios. Nesse sentido, nós investigamos a atividade imunomoduladora do extrato de CFC obtido da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada no sul do Brasil. Para atingir este objetivo, nós utilizamos a linhagem celular monocítica de leucemia aguda humana THP-1 e lipopolissacarídeo (LPS) como modelo celular alvo e estimulante, respectivamente. Nós observamos que o extrato de CFC possui atividade imunomoduladora, com efeitos imunossupressores e imunoestimuladores para as citocinas avaliadas IL-8 e TNF- α nesta linhagem celular. Contudo, a expressão de genes que codificam estas citocinas não foi alterada significativamente. Ademais, a ativação do TLR4 foi observada, sendo então um dos receptores de reconhecimento envolvido nas respostas imunoestimuladoras do extrato de CFC. A partir destes resultados, sugere-se que o extrato bruto de CFC possa ser utilizado como agente imunomodulador para a melhora da imunidade inata do hospedeiro bem como para o tratamento de infecções causadas por diferentes patógenos.

Palavras-chave: Células THP-1. Lipopolissacarídeo. Imunidade inata. Infecções. Inflamação. Receptor *Toll-like*.

IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF C-PHYCOCYANIN EXTRACT OBTAINED FROM MICROALGA *Spirulina* CULTIVATED IN THE SOUTH OF BRAZIL

Abstract

C-phycoerythrin (CPC) is a phycobiliprotein present in *Spirulina* microalgae. In recent years, several in vitro and in vivo studies have demonstrated that this compound has numerous therapeutic properties, including antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory. Particularly, immunosuppressive and immunostimulatory effects were observed when cells of the innate immune system were stimulated by lipopolysaccharide (LPS). However, in the case of immunostimulation, it is noted that there is a gap in the recognition of the receptor involved in the inflammation process, as well as in the expression of pro-inflammatory genes. In this sense, we investigated the immunomodulatory activity of the CPC extract obtained from the microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivated in southern Brazil. In order to achieve this goal, we used the human acute leukemia cell line THP-1 and lipopolysaccharide (LPS) as target and stimulant cellular models, respectively. We observed that CPC extract has immunomodulatory activity, with immunosuppressive and immunostimulatory effects for the evaluated cytokines IL-8 and TNF- α in this cell line. Nevertheless, the expression of genes encoding these cytokines was not significantly altered. Additionally, activation of TLR4 was observed, being then a possible receptor of recognition for immunostimulatory responses of CPC extract. From these results, it is suggested that crude CPC extract can be used as an immunomodulatory agent for the improvement of the innate immunity of the host as well as for the treatment of infections caused by different pathogens.

Keywords: THP-1 cells. Lipopolysaccharide. Innate immunity. Infection. Inflammation. Toll-like receptor.

3.2.1 Introdução

A *Spirulina* é uma cianobactéria fotossintética, multicelular, filamentosa e espiralada (WUANG et al., 2016) com elevado valor nutricional e que tem sido produzida em ampla escala em condições autotróficas de crescimento. Essa microalga apresenta vasta aplicabilidade, com utilizações que variam desde alimentação humana à produção de ração animal (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). A *Spirulina* contém inúmeros compostos bioativos, incluindo fenólicos, carotenoides e ficobiliproteínas, especialmente C-ficocianina (CFC), com atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora previamente demonstradas (FINAMORE et al., 2017). Devido às suas propriedades bioativas, esta microalga tem sido cada vez mais reconhecida como matéria prima potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais ou para cosméticos/alimentos voltados ao cuidado da pele (COSTA et al., 2017, no prelo).

A imunomodulação por produtos naturais tem sido alvo de pesquisas que buscam alternativas para o controle de infecções causadas por diferentes patógenos, bem como para cuidados de saúde. Células do sistema imune, como monócitos/macrófagos, desempenham importante papel como primeira linha de defesa imunológica através da secreção de várias citocinas (ADAMS; HAMILTON, 1984; TAYLOR et al., 2005). Nas últimas décadas, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram que a *Spirulina* pode modular o sistema imunológico inato do hospedeiro. Um dos primeiros estudos nesse sentido foi realizado por Agache et al. (1994), que observaram resposta imune aprimorada em ovelhas, sendo a produção de interleucina-1 (IL-1) um dos biomarcadores analisados em macrófagos peritoneais. Outros estudos reportaram que esta microalga melhorou as funções imunológicas em galinhas, pelo aumento da atividade fagocítica de macrófagos e anticorpos produzidos (AL-BATSHAN et al., 1994; QURESHI; GARLICH; KIDD, 1996). Abdel-Daim et al. (2016) observaram diminuição da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no soro de camundongos tratados com biomassa em pó (500 a 1000 mg/kg) 1 h antes de tratamento com o inseticida deltametrina (15 mg/kg). Também foi observado efeito imunostimulador quando frações de imulina, polissacarídeo presente na *Spirulina*, foram testadas em linhagem celular de monócitos/macrófagos em concentrações que variaram de 1 ng/mL a 100 μ g/mL. Nesse estudo, a imulina aumentou a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-8, sem alterar a viabilidade e o crescimento de células THP-1 (GRZANNA et al., 2006).

Tendo em vista que os estudos mencionados fornecem bases científicas para suportar empiricamente que a *Spirulina* fornece resistência à infecções contra diversos patógenos (GRZANNA et al., 2006), neste estudo nós investigamos a atividade imunomoduladora do extrato de C-ficocianina obtido da microalga *Spirulina* cultivada no sul do Brasil.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Biomassa microalgal e obtenção do extrato de CFC

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18, previamente isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008), foi cultivada na Planta Piloto de Produção de *Spirulina* da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (33°30'13" S e 53°08'59" W). Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 10.000 L (MORAIS et al., 2009), utilizando meio Zarrouk 20% (v/v) (COSTA et al., 2004). Ao atingir a concentração de 0,50 g/L, a biomassa microalgal foi separada por meio de filtração e seca em secador de bandejas a 50 °C durante 3-5 h (MORAIS et al., 2009). Posteriormente, a biomassa foi moída em moinho de bolas e peneirada (tamanho da partícula foi 48 mesh). A obtenção do extrato bruto de CFC foi realizada de acordo com Moraes; Burkert; Kalil (2010), com modificação, utilizando como solvente água deionizada (Merck Millipore, EUA). A proporção biomassa-solvente foi 0,08:1. A extração foi realizada em *shaker* (Innova® 44, EUA) com velocidade rotacional de 100 rpm a 20 °C por 1 h. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 6.000 rpm a 20 °C por 10 min, liofilizada (Labconco, EUA) e mantida sob refrigeração (4-5°C) até utilização. Para comparação, extrato de CFC comercial foi utilizado (Parry Nutraceuticals, Índia).

3.2.2.2 Linhagem celular

THP-1, linhagem celular monocítica de leucemia aguda humana, foi obtida do *Istituto Zooprofilattico di Brescia* (Itália). As células foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) termicamente inativado, 2mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol e 1% de antibiótico (estreptomicina [100 µg/mL] e penicilina [100 U/mL]). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% (v/v) de CO₂ e umidade saturada.

3.2.2.3 Viabilidade celular

A viabilidade de células THP-1 foi avaliada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (IP) como solução de coloração. Células (10^6 células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços (1 mL/poço) e tratadas com extrato de CFC (comercial e LEB 18) ou PBS (controle; mesmo veículo utilizado na solubilização dos extratos). As células foram mantidas durante 24 h em estufa a 37 °C. Após incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min e suspensas em 500 µL de PBS contendo 1 µg/mL de PI. A porcentagem de células viáveis foi analisada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur, EUA) e os dados foram quantificados com o software CellQuest (Becton Dickinson, EUA).

3.2.2.4 Imunoestimulação

Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O127:B8 (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como imunoestimulador em células THP-1. Solução estoque foi dissolvida em PBS e a concentração 10 ng/mL foi utilizada em todos os experimentos.

3.2.2.5 Produção de citocinas

A produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- α , foi investigada em células THP-1. Para este ensaio, células (10^6 células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas com extrato de CFC (comercial e LEB 18), LPS ou associações entre extratos/LPS. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação a 1500 rpm durante 5 min e armazenados a -80 °C até a medição. A produção de citocinas foi determinada pela técnica ELISA "sanduíche", utilizando anticorpos monoclonais específicos para as citocinas testadas (BD, Becton Dickinson). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A produção de citocinas foi medida em pg/mL, com limite de detecção de 15,6 pg/mL. Os resultados estão expressos em índice de estimulação (IE).

3.2.2.6 Detecção de TLR4

Para a detecção de TLR4, células THP-1 na concentração de 10^6 células/mL foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com anticorpos contra TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou IgG de camundongo (Sigma-Aldrich, EUA) durante 30 min (todos 1

$\mu\text{g/mL}$) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ antes da adição de extrato de CFC (ambos 1 mg/mL), LPS (10 g/mL) ou associações. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos por centrifugação a 1500 rpm durante 5 min para mensurar a produção de IL-8 e TNF- α por ELISA. A produção de citocinas foi medida em pg/mL , com limite de detecção de $15,6\text{ pg/mL}$. Os resultados estão expressos em índice de estimulação (IE).

3.2.2.7 Extração de RNA e PCR quantitativo em Tempo Real

Os RNAs totais foram extraídos de células THP-1 após 3 h de tratamento com extrato de CFC (ambos 1 mg/mL), LPS (10 ng/mL) ou associações, utilizando o kit comercial TriReagent (Sigma-Aldrich, EUA), conforme descrito pelo fabricante. Os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro (BioDrop, Reino Unido) e transcritos de forma reversa para cDNA usando $2\text{ }\mu\text{g}$ do RNA total, através de kit de Transcrição de Alta Capacidade (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fornecedor. A expressão dos genes IL-8 e TNF- α foi avaliada através de reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). Para a análise foram utilizados *primers* e sondas TaqMan® (Applied Biosystems, EUA). Para cada reação foi utilizado 10 ng de RNA total. A transcrição do RNA ribossomal 18S foi utilizada como controle endógeno e a quantificação dos transcritos foi realizada pelo método $\Delta\Delta\text{CT}$.

3.2.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes, com resultados representativos mostrados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Diferenças estatísticas foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey para comparação múltipla. Diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Efeito do extrato de CFC sobre a viabilidade celular de células THP-1

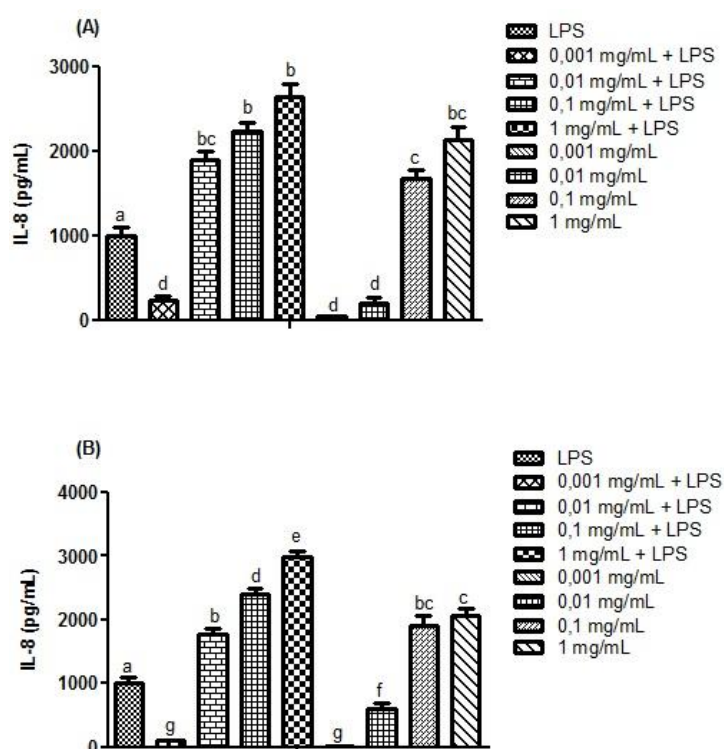
Células THP-1 foram tratadas com concentrações crescentes de extratos de CFC e a viabilidade celular foi então avaliada por citometria de fluxo usando coloração IP. De acordo com os resultados, os experimentos foram realizados com concentrações que resultaram em

viabilidade superior a 75%, o que correspondeu a 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL para ambos extratos.

3.2.3.2 Efeito do extrato de CFC sobre a produção de IL-8 e TNF- α em células THP-1

As células THP-1 foram tratadas com extrato de CFC LEB 18 ou comercial, LPS ou associações entre extratos/LPS. Conforme demonstrado na Figura 1, ambos extratos estimularam fortemente a produção da citocina pró-inflamatória IL-8 por células THP-1. O extrato LEB 18 induziu significativamente a liberação de IL-8, nas concentrações 0,1 mg/mL e 1 mg/mL, quando comparado à células tratadas com LPS (10 ng/mL) após 24 h de estimulação (Figura 1(A)). Respostas semelhantes foram obtidas quando houve associação entre extrato/LPS (Figura 1(A)) e em células tratadas com extrato comercial (Figura 1(B)). Curiosamente, efeito supressor foi notado quando a produção de IL-8 foi significativamente diminuída em células tratadas em associação com LPS (0,001 mg/mL de extrato) (Figuras 1(A) e 1(B)).

Figura 1 - Efeito do extrato de CFC sobre a produção de IL-8 em células THP-1

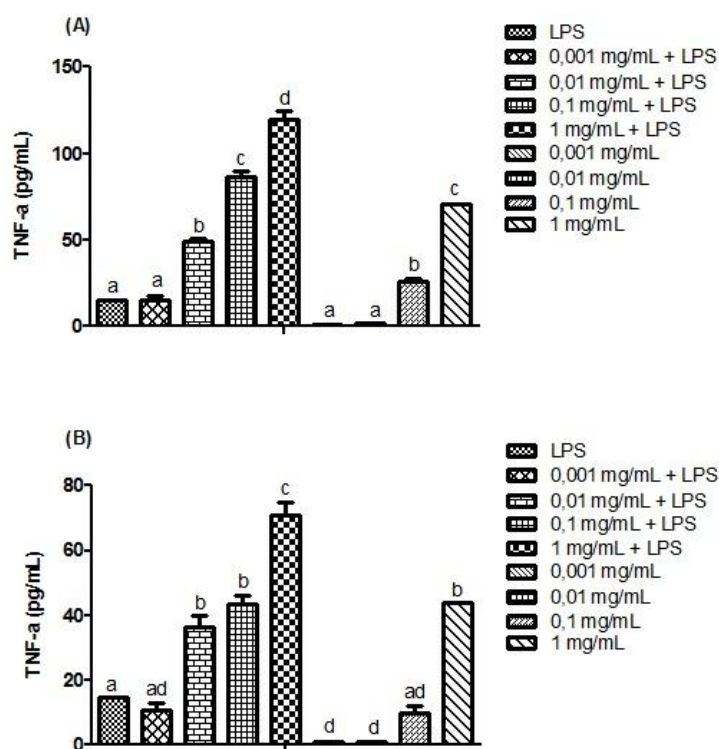


Produção de IL-8. As células THP-1 foram tratadas por 24 h com concentrações crescentes de extrato de CFC LEB 18 (A), comercial (B), LPS (10 ng/mL) ou associações entre extratos/LPS. A produção de IL-8 foi medida por ELISA utilizando os sobrenadantes da cultura. Os valores representam a média \pm erro padrão de três

experimentos independentes. Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE). Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A produção de TNF- α por células THP-1 também foi investigada neste estudo. Nós observamos aumento significativo na produção de TNF- α em células tratadas com 0,1 mg/mL e 1 mg/mL de extrato LEB 18 (Figura 2(A)). Efeito similar também foi observado em células tratadas com extrato+LPS e em células tratadas com extrato comercial (Figura 2(B)). A contrário do observado acima, ambos extratos, na menor concentração não suprimiram a produção de TNF- α em células imunoestimuladas com LPS.

Figura 2 - Efeito dos extratos de CFC sobre a produção de TNF- α em células THP-1

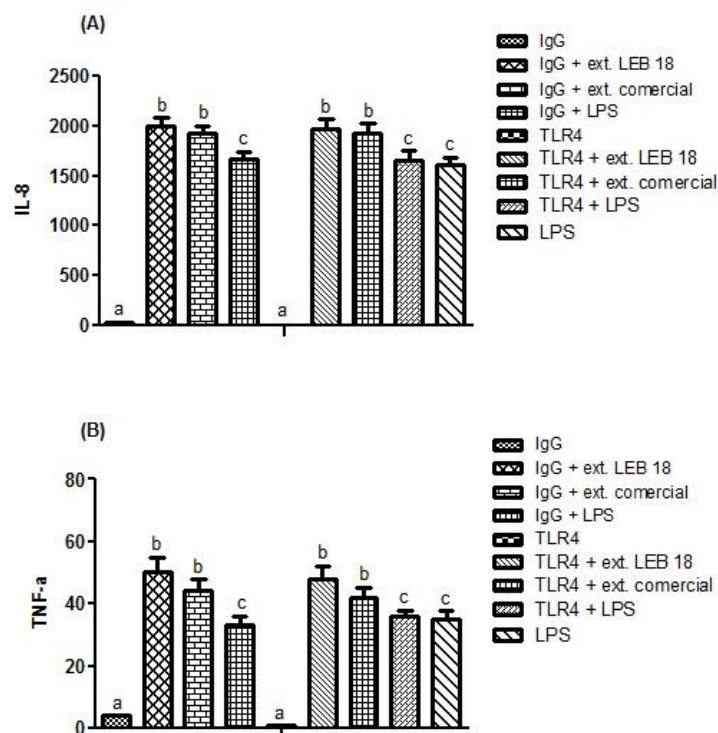


Produção de TNF- α . As células THP-1 foram tratadas durante 24 h com concentrações crescentes de extrato de CFC LEB 18 (A), comercial (B), LPS (10 ng/mL) ou associações entre extratos/LPS. A produção de TNF- α foi medida por ELISA utilizando os sobrenadantes da cultura. Os valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE). Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

3.2.3.3 Detecção de TLR4

Conforme demonstrado na Figura 3, o TLR4 foi ativado pelo LPS, bem como pelo extrato de CFC e esta ativação conduziu à síntese de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, é possível observar o reconhecimento pela imunoglobulina G, também com aumento na produção de citocinas.

Figura 3 - Efeito dos extratos de CFC sobre a detecção de TLR4

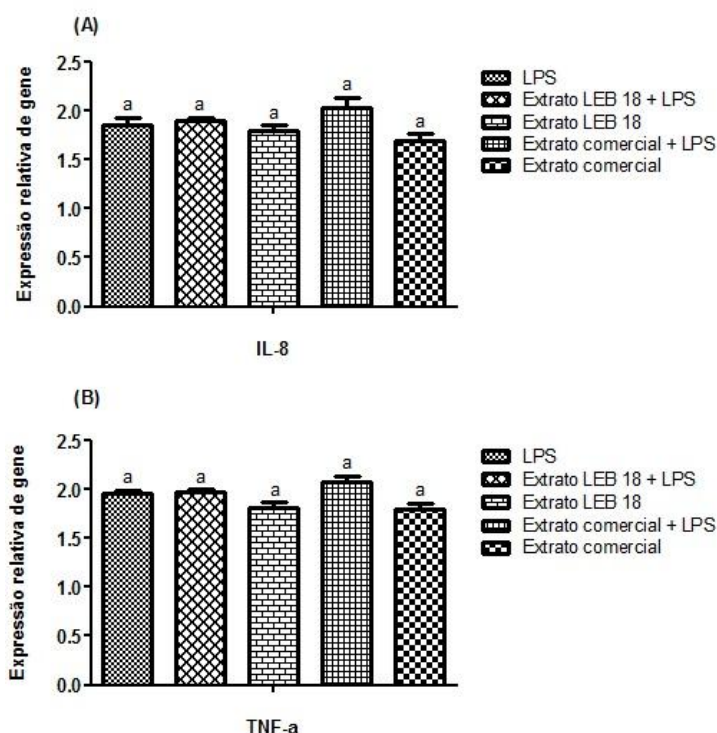


Detecção de TLR4. As células THP-1 foram tratadas com anticorpos contra TLR4 ou IgG de camundongo durante 30 min (todos 1 µg/mL) a 37 °C antes da adição de extrato de CFC (ambos 1 mg/mL), LPS (10 g/mL) ou associações. Após 24 h de tratamento, a produção de IL-8 e TNF-α foi medida por ELISA utilizando os sobrenadantes da cultura. Os valores representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE). Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

3.2.3.4 Efeito do extrato de CFC na expressão de genes de citocinas relacionadas à inflamação

Tendo em vista os resultados anteriores, a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias foi analisada em células THP-1. Neste ensaio, concentração de 1 mg/mL de ambos extratos de CFC foi utilizada para análise por PCR em Tempo Real. Embora tenha sido observado aumento significativo na produção de IL-8 e TNF-α, em nível de proteína, ambos extratos não alteraram significativamente a expressão de genes que codificam estas citocinas pró-inflamatórias após 3 h de tratamento (Figura 4).

Figura 4 - Efeito dos extratos de CFC na expressão de genes pró-inflamatórios em células THP-1



Expressão de genes pró-inflamatórios. As células THP-1 foram tratadas por 3 h com extrato de CFC LEB 18 ou comercial (ambos 1 mg/mL), LPS (10 ng/mL) ou associações entre extratos/LPS. A expressão de genes que codificam as citocinas IL-8 e TNF- α foi avaliada por PCR em Tempo Real como descrito na seção Material e Métodos. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Cada valor representa a média \pm erro padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

3.2.4 Discussão

A CFC é um pigmento azul natural que pertence à classe das ficobiliproteínas e também é considerada como um dos principais pigmentos da *Spirulina*, microalga utilizada em muitos países como alimento ou suplemento dietético (KUDDUS et al., 2013). Os potenciais efeitos terapêuticos da CFC foram atribuídos às suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (COSTA et al., 2017, no prelo). Por isso, no presente estudo, nós investigamos a atividade imunomoduladora do extrato de CFC obtido da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada no sul do Brasil. Para abordar esta questão, nós utilizamos a linhagem celular THP-1, que é derivada do sangue periférico de criança de 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda. Esta linhagem tem sido amplamente utilizada para estudar funções de monócitos/macrófagos, mecanismos e vias de sinalização (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

Embora a origem dos extratos utilizados sejam diferentes, os padrões de resposta foram muito semelhantes. Os resultados deste estudo demonstraram que ambos extratos estudados apresentaram atividade imunomoduladora, tanto com resposta imunossupressora (anti-inflamatória) quanto imunoestimuladora (pró-inflamatória), dependendo da dose-resposta para as citocinas avaliadas. Desta forma, os extratos de CFC na menor concentração (0,001 mg/mL) suprimiram a produção de IL-8 quando células THP-1 foram imunoestimuladas por LPS, enquanto que as maiores concentrações (0,1 mg/mL e 1 mg/mL) induziram a produção desta citocina pró-inflamatória (Figura 1). Resultados similares foram observados quando a produção de TNF- α foi avaliada nesta linhagem celular, entretanto, sem efeito de supressão em células estimuladas por LPS (0,001 mg/mL de ambos extratos) (Figura 2). Os resultados obtidos utilizando extrato bruto, assemelham-se, em parte, ao de Chen et al. (2014), que investigaram a atividade imunomoduladora da CFC isolada a partir de *Spirulina platensis* cultivada com gás de combustão da usina de energia. Eles mencionaram que a CFC, na sua forma purificada, possui atividade imunomoduladora, induzindo a produção de TNF- α , como também de IL-1 β e IL-6 em macrófagos murinos J774A.1 (CHEN et al., 2014).-

O padrão de indução de IL-8 e TNF- α por extrato de CFC em células THP-1 é semelhante ao LPS, um dos imunoestimulantes mais estudados, uma vez que é componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas (LU; YEH; OHASHI, 2008; PARK; LEE, 2013). Dado que a produção de citocinas é estimulada por sinais que interagem com vários receptores de reconhecimento de patógenos, como membros da família *Toll* (ADEREM; ULEVITCH, 2000; JANEWAY JR; MEDZHITOV, 2002), seria interessante determinar se o extrato de CFC e LPS produzem seus efeitos imunoestimuladores por mecanismos similares de receptores. Por esta razão, nós investigamos se o TLR4 estaria envolvido neste reconhecimento, já que é um dos TLRs mais fisiologicamente importantes inicialmente identificados no reconhecimento de LPS (LU; YEH; OHASHI, 2008). Neste estudo, os resultados demonstraram que o extrato de CFC pode ativar o TLR4, uma vez que a produção das citocinas IL-8 e TNF- α foram expressivas (Figura 3).

Sabe-se há muito tempo que TLR4 pode induzir a ativação de diversas vias de sinalização, incluindo MAPK, AP-1, STAT e IRF3. Uma das principais vias ativadas é a via do fator de transcrição NF κ B, que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (RAETZ; WHITFIELD, 2002). No entanto, esse é um ponto essencial de regulação da expressão de genes, pois se não ocorrer a fosforilação do I κ B- α e se não houver a degradação proteossômica, o fator de transcrição NF κ B não será translocado ao núcleo (GOSH et al.,

1998). Há ainda uma alça de retroalimentação negativa que retira a ligação do NFkB ao DNA, e que ocorre num momento mais tardio. Algumas características desse mecanismo ainda precisam ser investigadas, porém o que se sabe é que a ligação do NFkB ao elemento responsivo no DNA promove a transcrição do RNAm do I κ B- α . Após sua tradução no citoplasma, a proteína I κ B- α migra do citoplasma ao núcleo para sequestrar o fator de transcrição e inibir a cascata de ativação. Isto ocorre, pois a afinidade entre esta proteína ao NFkB é muito maior que a ligação do NFkB ao DNA (GOSH; HAYDEN, 2008).

Como conclusão, os resultados deste estudo fornecem evidências de que o extrato de CFC, extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, possui atividade imunomoduladora, com efeitos imunossupressores e imunoestimuladores para as citocinas IL-8 e TNF- α , induzidas por LPS em células THP-1. Além disso, o extrato de CFC não alterou a expressão de genes que codificam essas citocinas pró-inflamatórias e o TLR4 foi identificado como possível receptor de reconhecimento envolvido nas respostas de imunoestimulação pelo extrato de CFC. Por fim, estudos adicionais são necessários para examinar os potenciais efeitos benéficos do extrato bruto de CFC no manejo de doenças inflamatórias agudas e crônicas em seres humanos.

Referências

- ABDEL-DAIM, M.; EL-BIALY, B. E.; RAHMAN, H. G. A.; RADI, A. M.; HEFNY, H. A.; HASSAN, A. M. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: Biochemical and histopathological studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 77, p. 79-85, 2016.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v.2, p. 283–318, 1984.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782–7, 2000.
- AL-BATSHAN, H. A.; AL-MUARREJ, S. I.; AL-HOMAIDAN, A. A.; QURESHI, M. A. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23 p. 281–289, 2001.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 37–45, 2014.
- CHEN, H-W.; YANG, T-S.; CHEN, M-J.; CHANG, Y-C.; WANG, EI-C.; HO, C-L.; LAI, Y-J.; YU, C-C.; CHOU, J-C.; CHAO, LK-P.; LIAO, P-C. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas.

Process Biochemistry, v. 49, n. 8, p. 1337-1344, 2014.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 237–241, 2004.

COSTA, J. A. V.; MORO, G. M. B.; FILGUEIRA, D. M. V.; CORSINI, E.; BERTOLIN, T. E. The potential of *Spirulina* and its bioactive metabolites as ingested agents for skin care. **Industrial Biotechnology**, 2017. In press.

FINAMORE, A.; PALMERY, M.; BENSEHAILA, S.; PELUSO, I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NFkappaB in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 837-848, 2008.

GHOSH, S.; MARY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998

GRZANNA, R.; POLOTSKY, A.; PHAN, P. V.; PUGH, N.; PASCO, D.; FRANDOZA, C. G. Immolina, a high-molecular-weight polysaccharide fraction of *Spirulina*, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 12, n. 5, p. 429–435, 2006.

HAYASHI O, KATO T, OKUWAKI Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 40, p. 431–441, 1994.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-51, 2008.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. R.; ANDRADE, M. R. TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

PARK, B. S.; LEE, J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, 2013.

QURESHI, M. A.; GARLICH, J.; KIDD, M. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune function in chickens. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 18, p. 465–476, 1996.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 901-944, 2005.

WUANG, S. C.; KHIN, M. C.; CHUA, P. Q. D.; LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59-64, 2016.

3.3 EFEITO FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE C-FICOCIANINA EM LINHAGEM CELULAR EPIDÉRMICA

Resumo

A radiação ultravioleta (UV), particularmente a ultravioleta A (UVA, 320-400 nm), é conhecida pelo potencial em induzir o foto-envelhecimento da pele humana. Diversos estudos demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas quando as células são expostas à UVA e o aumento descontrolado na produção dessas espécies pode causar danos oxidativos em moléculas e estruturas celulares. Nos últimos anos, considerável atenção tem sido dada a extratos microalgais visando a proteção da pele. Neste sentido, a C-ficocianina (CFC), biliproteína que pode ser extraída da microalga *Spirulina*, possui propriedades antioxidante e anti-inflamatória bem estabelecidas. Com o objetivo de ampliar as investigações mencionadas, neste estudo foi utilizada a linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT para investigar o efeito protetor do extrato bruto de CFC contra o dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA. Nós observamos que o extrato de CFC não alterou a viabilidade de células HaCaT. No entanto, em células irradiadas com doses que variaram de 0,5 J/cm² a 6 J/cm² de UVA, a viabilidade celular decresceu significativamente após 72 h. Quando os tratamentos foram associados, o extrato de CFC administrado após irradiação nas concentrações 0,001 mg/mL e 1 mg/mL protegeu células HaCaT com dose de 0,5 J/cm² de UVA. Tal efeito pode ser atribuído, em parte, à diminuição dos níveis intracelulares de ERO e à inibição de peróxidos lipídicos gerados, através da capacidade deste extrato em sequestrar ERO, respostas também observadas neste estudo. Estes resultados mostraram que o extrato bruto de CFC exerceu atividade fotoprotetora, inibindo o dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA, e desta forma, pode ser utilizado em futuras pesquisas e como agente nutricosmético preventivo do fotoenvelhecimento da pele humana.

Palavras-chave: Fotoproteção. Espécies reativas de oxigênio. Microalga *Spirulina*. Peroxidação lipídica. Queratinócitos HaCaT. Radiação ultravioleta A.

PHOTOPROTECTIVE EFFECT OF C-PHYCOCYANIN EXTRACT IN EPIDERMIS CELL LINE

Abstract

Ultraviolet (UV) radiation, particularly ultraviolet A (UVA, 320-400 nm), is known for its potential to induce photo-aging of human skin. Several studies have shown that reactive oxygen species (ROS) are generated when cells are exposed to UVA, and uncontrolled increase in the production of these species can cause oxidative damage in molecules and cell structures. In recent years, considerable attention has been given to microalgal extracts aiming to protect the skin. In this sense, C-phycoerythrin (CPC), biliprotein that can be extracted from *Spirulina* microalgae, has well established antioxidant and anti-inflammatory properties. In order to expand these investigations, in this study human keratinocyte cell line HaCaT was used to investigate the protective effect of CPC crude extract against lipid damage and UVA-induced ROS generation. We observed that the CPC extract did not alter the viability of HaCaT cells. However, cells irradiated at doses ranging from 0,5 J/cm² to 6 J/cm² of UVA had significant decrease in cell viability after 72 h. When the treatments were associated, CPC extract administered after irradiation at concentrations of 0.001 mg/mL and 1 mg/mL protected HaCaT cells at a dose of 0.5 J/cm² of UVA. This effect can be attributed, in part, to decreasing levels of intracellular ROS and to the inhibition of lipid peroxides generated through the ability of this extract to sequester ROS, responses that were also observed in this study. These findings suggest showed that crude CPC extract exerted photoprotective activity, inhibiting lipid damage and UVA-induced ROS generation, and thus, it can be used in future researches and as a preventive nutricosmetic agent of human skin photoaging.

Keywords: Photoprotection. Oxigen-reactive species. *Spirulina* microalga. Lipid peroxidation. HaCaT keratinocytes. Ultraviolet A radiation.

3.3.1 Introdução

A pele humana, estruturalmente, é composta por duas camadas, epiderme e derme (NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011). A epiderme é a parte da pele mais exposta ao ambiente externo. Sua principal função é atuar como barreira física, química, imunológica e bioquímica, protegendo o organismo de ameaças ambientais potencialmente nocivas (BARONI et al., 2012). Esta camada é composta por vários tipos celulares, sendo os queratinócitos os que predominam, constituindo aproximadamente 90% das células epidérmicas (FREINKEL; WOODLEY, 2001). Abaixo da epiderme está a derme, camada de tecido conjuntivo que fornece suporte estrutural e nutritivo à pele (MICHELS; DRAELOS, 2011).

A alteração na pele é, normalmente, a primeira manifestação visível do processo de envelhecimento (BAUMANN, 2007). O processo de envelhecimento cutâneo ocorre através de mecanismos intrínsecos e extrínsecos, dos quais pode-se considerar o envelhecimento cronológico e o foto-envelhecimento, respectivamente (FARAGE et al., 2008). O primeiro é um fenômeno irreversível, no qual estão envolvidos fatores genéticos, hormonais e metabólicos (QUAN et al., 2015). Ao contrário, o segundo é induzido por fatores ambientais. Também chamado de envelhecimento prematuro, o foto-envelhecimento é um fenômeno que pode ser evitado (KLIGMAN; KLIGMAN, 1986). O mesmo é causado pela exposição prolongada e inadequada à radiação solar ultravioleta (UV) ou radiação UV de fontes de bronzeamento artificial (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011). Os efeitos na pele causados pela radiação UV são cumulativos e dependem da duração, frequência e intensidade da exposição, juntamente com a proteção natural da pele (PANDEL et al., 2013). Estima-se que o foto-envelhecimento seja responsável por 80 a 90% do envelhecimento cutâneo (NATARAJAN et al., 2014).

A radiação solar na superfície terrestre inclui comprimentos de onda médio (UVB, 280-320 nm) e longo (UVA, 320-400 nm). Embora ambos sejam prejudiciais, a radiação UVA foi considerada menos carcinogênica e mutagênica devido a sua capacidade limitada de causar danos diretos ao DNA (DE GRUIJL, 2002), mas ainda assim tem sido considerada o principal fator etiológico para o câncer do tipo melanoma (EDING et al., 2015). Entretanto, a UVA pouco é barrada pela camada de ozônio e cerca de 95% da radiação UV atinge a terra (PARISI; WONG, 2002) e pode penetrar a epiderme e atingir a camada dérmica basal (AGAR et al., 2004; BACHELOR; BOWDEN, 2004). A radiação UVA causa alterações nos tecidos conjuntivos através da geração de ERO (KULMS; SCHWARZ, 2000; PILLAI; ORESAJO;

HAYWARD, 2005). Uma vez sugerido que a alteração dos tecidos da pele induz o envelhecimento cutâneo, é possível inferir que a exposição da pele à radiação UVA desempenha papel importante no processo do foto-envelhecimento (KAWANO et al., 2015).

A exposição à radiação UV afeta o sistema antioxidante da pele. O dano induzido por UV envolve a depleção de antioxidantes endógenos através da superprodução de ERO (FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2014; HO et al., 2009; SHINDO et al., 1994; SHINDO; WITT; PACKER, 1993). Nesse sentido, a suplementação de antioxidantes, por meio de nutricosméticos, tem sido amplamente investigada afim de retardar o envelhecimento cutâneo e melhorar as condições da pele (ANUNCIATO; DA ROCHA FILHO, 2012; LORENCINI et al., 2014; ROYER et al., 2013; SCHAGEN et al., 2012). A C-ficocianina (CFC), biliproteína que pode ser extraída da microalga *Spirulina*, possui funções farmacobiológicas bem conhecidas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (CHERNG et al., 2007; COSTA et al., 2017; KU et al., 2013; LIU et al., 2011; ROMAY et al., 2003; SHALABY; SHANAB, 2013). Estudo conduzido por Yogianti et al. (2014) demonstrou que a administração oral de 10% de *Spirulina* inibiu o desenvolvimento e indução de tumores da pele induzidos por UVB em camundongos. No entanto, ainda não há evidências se a CFC, especificamente, é capaz de proteger células epidérmicas do dano causado por UVA. Portanto, nós investigamos o efeito fotoprotetor do extrato bruto de CFC contra o dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA em linhagem celular de queratinócitos humano, HaCaT.

3.3.2 Material e Métodos

3.3.2.1 Biomassa microalgal e obtenção do extrato bruto de CFC

A biomassa utilizada neste estudo foi proveniente do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em meio Zarrouk 20% (v/v) (COSTA et al., 2004). Esta microalga, previamente isolada da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008), foi cultivada na Planta Piloto de Produção de *Spirulina* da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (33°30'13" S e 53°08'59" W). Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 10.000 L, cobertos por túnel de filme transparente protegidos dos raios UV e expostos às condições ambientais naturais. Ao atingir a concentração de 0,50 g/L, a biomassa microalgal foi separada por meio de filtração e seca em secador de bandejas a 50°C durante 3-5 h (MORAIS et al., 2009). A biomassa foi, então, moída em moinho de bolas e peneirada (tamanho da partícula foi 48 mesh).

A obtenção do extrato bruto de CFC foi realizada de acordo com Moraes; Burkert; Kalil (2010), com modificação, utilizando como solvente água deionizada (Merck Millipore, EUA). A proporção biomassa-solvente foi 0,08:1. A extração foi realizada em *shaker* (Innova® 44, EUA) com velocidade rotacional de 100 rpm a 20°C por 1 h. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 6.000 rpm a 20°C por 10 min. A densidade óptica (DO) do sobrenadante foi mensurada em 620 nm e 652 nm e a concentração de CFC foi calculada através da Equação 1, conforme Bennet e Bogorad (1973). Posteriormente, o extrato foi liofilizado (Labconco, EUA) e mantido sob refrigeração (4-5°C) até utilização.

$$CFC = \frac{DO_{620} - 0,474(DO_{652})}{5,34} \quad (1)$$

Onde,

CFC = concentração de C-ficocianina (mg/mL)

DO₆₂₀, representa a absorbância da amostra em 620 nm

DO₆₅₂, representa a absorbância da amostra em 652 nm

3.3.2.2 Atividade antioxidante *in vitro* do extrato de CFC

Captura do radical ABTS

A captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi determinada de acordo com Rufino et al. (2007a), com modificações. Resumidamente, solução de ABTS (7 mM) foi preparada como solução estoque. O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM). Esta mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Após esse período, 1 mL desta mistura foi diluído em etanol até a obtenção da absorbância 0,70±0,05 nm em 734 nm. Em ambiente escuro, alíquota de 30 µL de extrato (2,5 mg/mL) foi transferida para tubo de ensaio contendo 3 mL do radical ABTS^{•+} e homogeneizada. Leitura em espectrofotômetro (734 nm) (Q7980RM, Quimis, Brasil) foi realizada após 6 min. O antioxidante sintético trolox foi utilizado como solução padrão. O resultado foi expresso como µmol trolox/g de amostra.

Capacidade de sequestro da radical DPPH

O efeito sequestrador do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido de acordo com Rufino et al. (2007b), com modificações. Resumidamente, em ambiente escuro, alíquota de 0,1 mL de extrato foi transferida para tubo de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH em metanol (0,06 mM). A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 60 min. Leituras em espectrofotômetro (515 nm) (Q7980RM, Quimis, Brasil) foram monitoradas a cada minuto, no qual foi observada a diminuição da absorbância até sua estabilização. Menor absorbância representa maior capacidade de sequestro do radical DPPH, que foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{Inibição (\%)} = \left[\frac{(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}})}{Abs_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde,

Abs_{controle} , representa a absorbância do controle

Abs_{amostra} , representa a absorbância da amostra em estudo

Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com Oyaizu (1986). Resumidamente, alíquota de 0,25 mL de extrato (2,5 mg/mL) foi misturada com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1%. Essa mistura foi incubada a 50°C em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado à mistura 2 mL de ácido tricloroacético 10%. Alíquotas de 2 mL da solução incubada foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 min a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro (700 nm) (Q7980RM, Quimis, Brasil). O aumento da absorbância da mistura da reação indica aumento do poder redutor.

3.3.2.3 Linhagem celular e condições de cultura

HaCaT, linhagem não tumorigênica de queratinócitos humano espontaneamente imortalizados, foi obtida do Laboratório de Oncologia Experimental do Instituto do Câncer de

São Paulo - ICESP (Brasil). As células foram cultivadas em garrafas plásticas (TPP, Suíça) em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com alta concentração de glicose (Sigma-Aldrich, EUA). O meio foi suplementado com bicarbonato de sódio (2 g/L) (Vetec, Brasil), 10% de soro fetal bovino (SFB) termicamente inativado e 1% de antibiótico e antimicótico (estreptomicina [100 µg/mL], penicilina [100 U/mL] e anfotericina B [0,25 µg/mL]) (Gibco, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% (v/v) de CO₂ e umidade saturada. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e as células foram subcultivadas após tripsinização (solução de tripsina-EDTA, concentração final 0,25%) (Gibco, Canadá).

3.3.2.4 Fluorescência do extrato de CFC em células HaCaT

Células (5×10^4 células/mL) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h para aderência celular. As células foram tratadas com 1 mg/mL de extrato de CFC por 30 min, 1 h e 24 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Após o período de incubação com extrato de CFC, o meio foi removido dos poços e as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) sem Ca²⁺ e Mg²⁺. A análise de fluorescência do extrato de CFC foi realizada a partir de capturas de área usando microscópio de epifluorescência (Olympus IX81, Japão), nos campos claro e fluorescência (emissão: 595 nm; excitação: 546 nm) (200X).

3.3.2.5 Exposição de células HaCaT ao extrato de CFC

Células, na concentração 5×10^4 células/mL, foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes de extrato de CFC (0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL). Células controle receberam o mesmo veículo utilizado para solubilizar o extrato (PBS). As células foram mantidas em estufa a 37 °C por até 72 h.

3.3.2.6 Lâmpada UVA

As células foram irradiadas com UVA ou com interação UVA e extrato de CFC. A lâmpada UVA (VL-115 L, 30 W, Vilber Lourmat, França) apresentou faixa de espectro de 320 a 380 nm com o pico de intensidade a 365 nm e a irradiância medida foi 550 µW/cm² de

UVA. A lâmpada apresentou contaminação com $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de UVB, $0,75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de luz visível, e não apresentou contaminação com UVC. A intensidade da irradiação foi medida imediatamente antes da irradiação das células com o auxílio de um radiômetro/fotômetro (modelo IL 1400A, International Light, MA). A temperatura da lâmpada foi monitorada e nenhuma alteração foi observada ao longo dos experimentos.

3.3.2.7 Exposição de células HaCaT à irradiação UVA (sem interação)

Células (5×10^4 células/mL) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 h. O meio de cultura foi removido dos poços e as células foram lavadas duas vezes com PBS e suspendidas novamente em meio de cultura suplementado para exposição à UVA (volume final $200 \mu\text{L}$). Com base em análises prévias, as células foram expostas às seguintes doses de irradiação: controle (células não irradiadas); $0,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ (15 min); $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ (30 min); $2 \text{ J}/\text{cm}^2$ (60 min); $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ (120 min) e $6 \text{ J}/\text{cm}^2$ (180 min). As doses foram calculadas de acordo com a Equação 3, proposta por Diffey (2002). Após exposição, as células receberam meio de cultura suplementado fresco e foram mantidas em estufa a 37°C por até 72 h.

$$\text{Tempo de exposição (min)} = \frac{1000 \times \text{dose (J/cm}^2\text{)}}{60 \times \text{irradiância mensurada (mW/cm}^2\text{)}} \quad (3)$$

3.3.2.8 Efeito da exposição de células HaCaT à diferentes associações entre UVA e extrato de CFC

Células (5×10^4 células/mL) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e as células foram lavadas duas vezes com PBS. O efeito fotoprotetor do extrato de CFC em células irradiadas com UVA foi analisado de três diferentes formas, como descrito a seguir:

(a) Tratamento com CFC pré-irradiação UVA: após as células serem lavadas com PBS, as mesmas foram tratadas com extrato ($0,001 \text{ mg}/\text{mL}$ e $1 \text{ mg}/\text{mL}$) e incubadas em estufa por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS (2x) e irradiadas com meio de cultura suplementado nas doses $0,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ e $2 \text{ J}/\text{cm}^2$. Após exposição, as células receberam

meio de cultura suplementado fresco e foram mantidas em estufa a 37 °C por até 72 h.

(b) Tratamento com CFC simultâneo à irradiação UVA: após as células serem lavadas com PBS, as mesmas foram tratadas (0,001 mg/mL e 1 mg/mL de extrato) e irradiadas (simultaneamente) nas doses 0,5 J/cm² e 2 J/cm². Após exposição, as células receberam meio de cultura suplementado fresco e foram mantidas em estufa a 37 °C por até 72 h.

(c) Tratamento com CFC pós-irradiação UVA: após as células serem lavadas com PBS, as mesmas foram suspensas novamente em meio de cultura suplementado e irradiadas nas doses 0,5 J/cm² e 2 J/cm². Após exposição, as células foram tratadas (0,001 mg/mL e 1 mg/mL de extrato) e mantidas em estufa a 37 °C por até 72 h.

3.3.2.9 Viabilidade celular

A viabilidade das células expostas ao extrato de CFC, à irradiação UVA ou à interação de ambos foi medida pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, EUA) 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após incubação a 37°C, conforme descrito por Trindade et al. (1999), com modificação. Resumidamente, após incubação, as células foram lavadas com PBS e 200 µL de meio de cultura e 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 3 h. O meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA) sob agitação leve. Os valores de absorbância foram medidos a 550 nm em leitora de microplacas (ELx800 Universal Microplate Reader, BioTek, EUA). A viabilidade celular foi proporcional à absorbância medida.

3.3.2.10 Dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA

Células, na concentração 2x10⁵ células/mL, foram semeadas em placas de cultura de 24 poços e incubadas a 37 °C para análise de dano e produção de ERO induzido por UVA. As análises foram realizadas 24 h, 48 h e 72 h após exposição com UVA (0,5 J/cm²), extrato (0,001 mg/mL e 1 mg/mL) e UVA+extrato (0,5 J/cm² + 0,001 mg/mL e 0,5 J/cm² + 1 mg/mL). Células não irradiadas e não tratadas com extrato serviram como controle.

Medição da geração de ERO intracelular

Para a medição da geração de ERO intracelular, após incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 30 min a 37 °C com o composto fluorogênico diacetato de 2',7'diclorofluoresceína (H₂DCF-DA, Sigma-Aldrich, Alemanha) (concentração final 40 µM). Em seguida, as células foram lavadas novamente e suspensas em PBS fresco. Alíquotas de 160 µL de cada amostra foram colocadas em placa Elisa e a fluorescência foi analisada durante 90 min a 37 °C usando leitora de microplacas (FilterMax F5, Molecular Devices, EUA), em comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 520 nm, respectivamente. Os níveis de ERO, expressos em termos de área de fluorescência, foram obtidos integrando as unidades de fluorescência (UF) ao longo do tempo de medição (90 min) e expressas como UF/min.

Medição da peroxidação lipídica

A medição de peroxidação lipídica (LPO) foi determinada de acordo com Hermes-Lima et al. (1995) com modificações de Monserrat et al. (2003). Este método baseia-se na oxidação de Fe (II) por substâncias reativas FOX a pH ácido na presença do corante de mistura de Fe (III) xilenol laranja (Sigma-Aldrich, EUA). Resumidamente, após incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas a -80 °C até utilização. Na análise, as amostras foram homogeneizadas (10% m/v) em metanol 100% (4 °C) e o homogeneizado foi centrifugado a 1000 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi então usado para a determinação de LPO, usando leitora de microplacas (FilterMax F5, Molecular Devices, EUA), em comprimento de 550 nm. O hidroperóxido de cumeno (CHP, Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como padrão. Os dados foram expressos pelo teor de peróxidos lipídicos (nM CHP/massa do pellet).

3.3.2.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Em todas as análises, cada experimento independente foi repetido pelo menos três vezes, com no mínimo, quadruplicata de amostras. A Análise de Variância (ANOVA) foi sistematicamente realizada para determinar diferença estatística entre os tratamentos, seguidos pelo teste de Tukey. O nível de significância (α) foi fixado em 0,05.

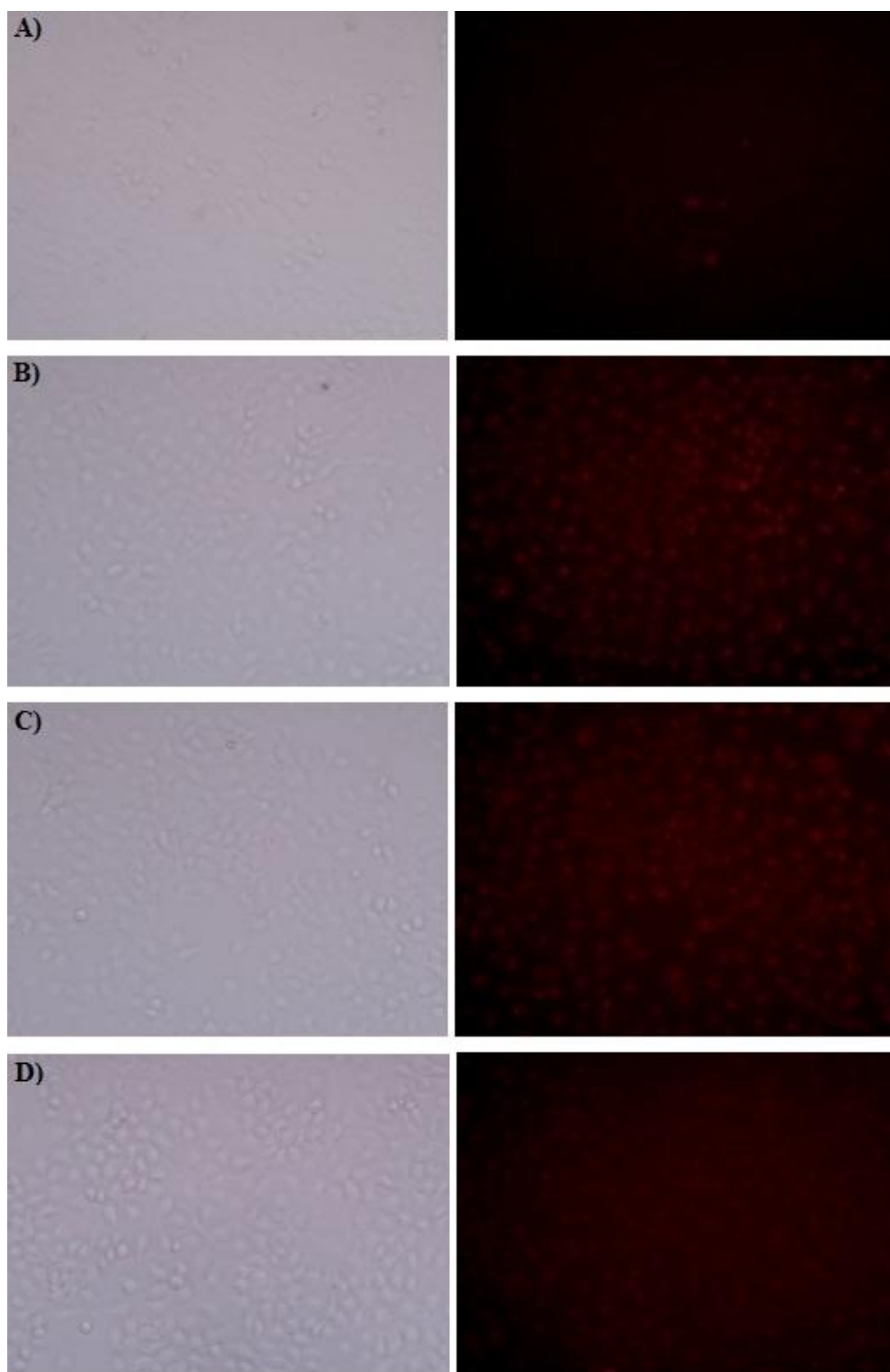
3.3.3 Resultados

3.3.3.1 Concentração de CFC e atividade antioxidante

O conteúdo de CFC mensurado no extrato foi 5,5 mg/mL. Quanto a atividade antioxidante, o extrato bruto de CFC (2,5 mg/mL) apresentou $81,10 \pm 3,92$ μmol de trolox/g de amostra para o radical ABTS^{•+}, $12,10 \pm 0,30\%$ de inibição para o radical DPPH e $0,300 \pm 0,001$ (Abs 700 nm) para poder redutor. Estes métodos, com diferentes mecanismos de ação, demonstraram que o extrato de CFC foi capaz de doar átomos de hidrogênio para os radicais livres e reduzir Fe⁺³ em Fe⁺².

3.3.3.2 Fluorescência do pigmento CFC

Comparada a outros fluoróforos, a CFC possui campo quântico de alta fluorescência (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). Capturas de área demonstraram a propriedade fluorescente da CFC em células tratadas por 30 min, 1 h e 24 h (Figura 1). Observa-se que, com o passar do tempo de exposição, a fluorescência do pigmento tornou-se mais intensa. Tais resultados indicam que este composto não foi desnaturado durante o processo de extração bem como em 24 h de exposição às células. Ademais, é possível notar que células HaCaT possuem baixa autofluorescência no comprimento analisado (Figura 1(A)).

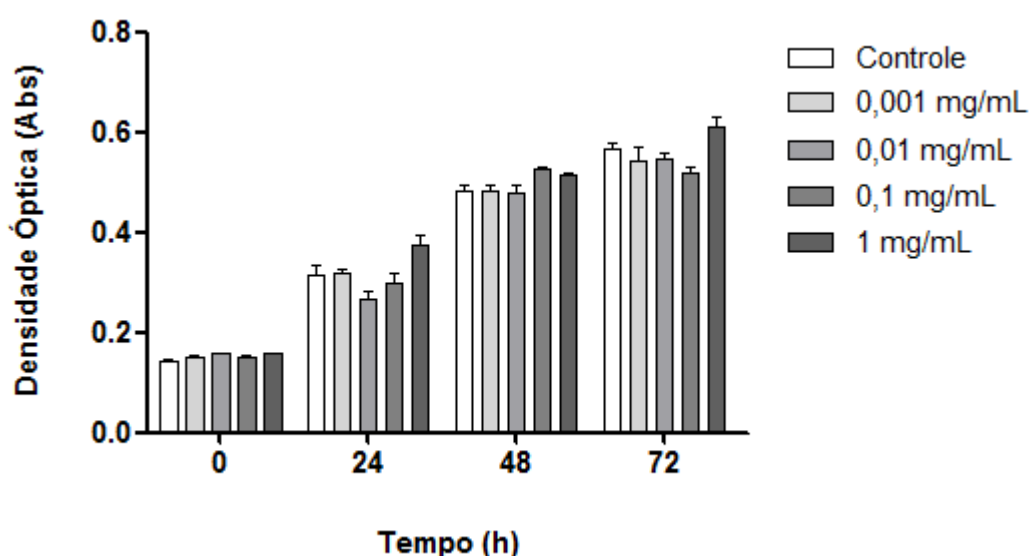
Figura 1 - Fluorescência do pigmento CFC em células HaCaT

A análise de fluorescência em queratinócitos humano HaCaT não tratados (controle) (A), tratados por 30 min (B), 1 h (C) e 24 h (D) foi realizada a partir de capturas de área usando microscópio de epifluorescência, nos campos claro (esquerda) e fluorescência (emissão: 595 nm; excitação: 546 nm) (direita) (200X).

3.3.3.3 Efeito do extrato de CFC na viabilidade de células HaCaT

O extrato de CFC nas concentrações 0,001 mg/mL a 1 mg/mL, não diminuiu a viabilidade celular em células HaCaT, após 72 h de exposição (Figura 2). Baseado nestes resultados, a menor e a maior concentração de extrato foram selecionadas para os ensaios posteriores.

Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações do extrato de CFC na viabilidade de queratinócitos humano HaCaT

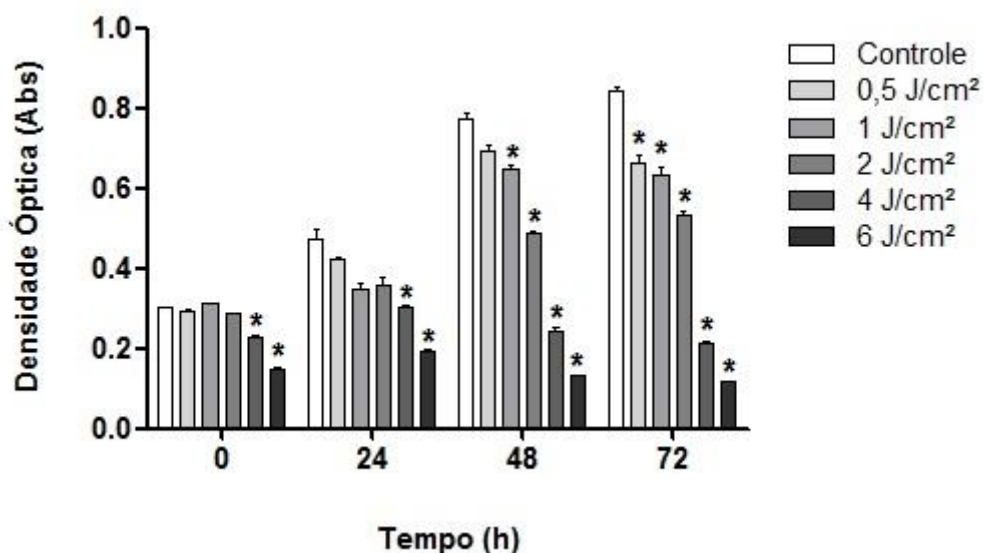


Viabilidade celular. Queratinócitos humano HaCaT foram tratados com 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL e 1 mg/mL de extrato e incubados a 37 °C durante 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. As diferenças estatísticas em relação ao respectivo controle, em cada tempo, estão indicadas por asterisco (*) quando $p < 0,05$.

3.3.3.4 Efeito de diferentes doses de UVA na viabilidade de células HaCaT

O aumento da dose de UVA resultou na diminuição da viabilidade celular quando comparado ao controle (Figura 3). As células irradiadas com 4 J/cm² e 6 J/cm² tiveram diminuição da viabilidade celular imediatamente após a exposição (0 h) e este efeito foi observado até 72 h. Já para as doses de 1 J/cm² e 2 J/cm² a diminuição da viabilidade foi observada a partir de 48 h. A dose de 0,5 J/cm² induziu redução da viabilidade apenas em 72 h. As doses 2 e 0,5 J/cm² de UVA foram escolhidas para os ensaios de interação, já que apresentaram efeitos fototóxicos após 48 h e 72 h de exposição, respectivamente.

Figura 3 - Efeito de diferentes doses de UVA na viabilidade de queratinócitos humano HaCaT

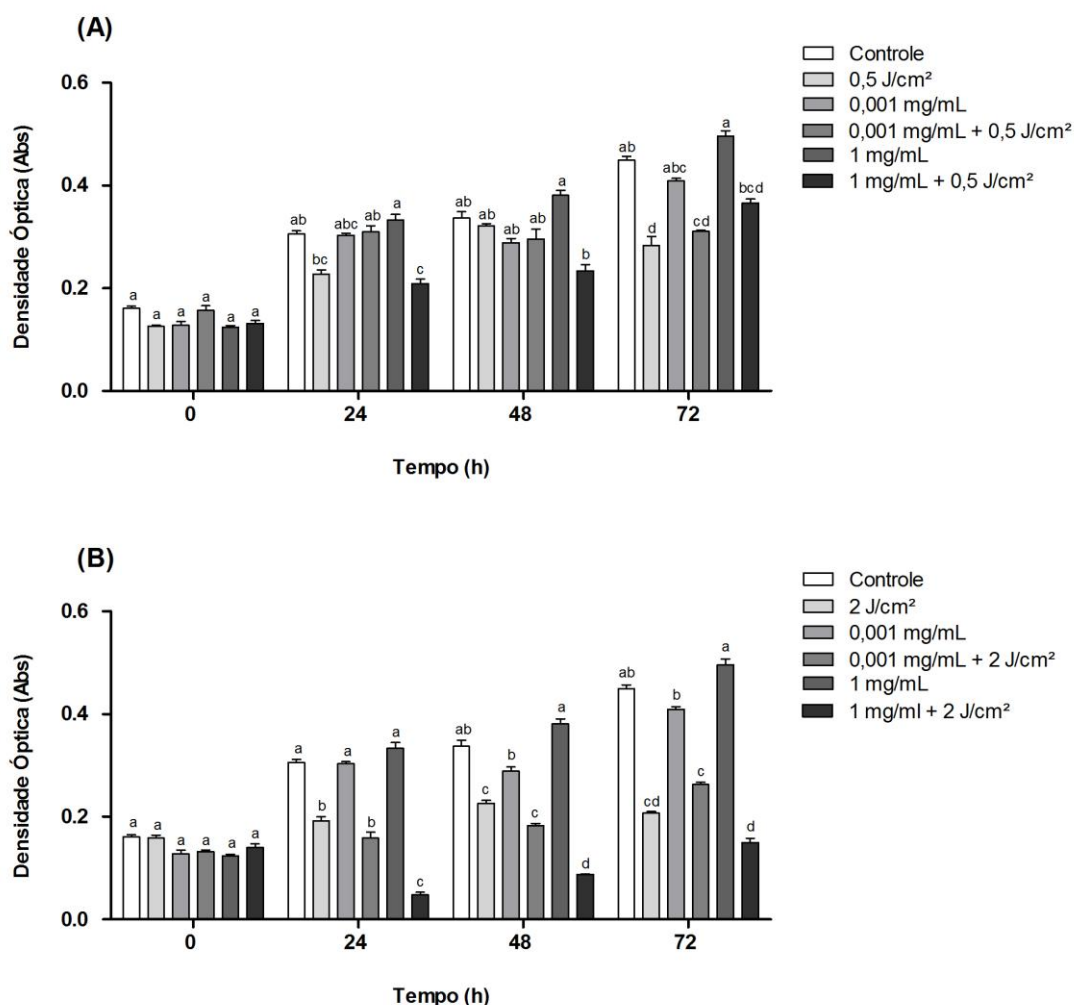


Viabilidade celular. Queratinócitos humano HaCaT foram irradiados com 0,5 J/cm², 1 J/cm², 2 J/cm², 4 J/cm² e 6 J/cm² de UVA e incubados a 37 °C durante 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. As diferenças estatísticas do respectivo controle, em cada tempo, estão indicadas por asterisco (*) quando $p < 0,05$.

3.3.3.5 Efeito da exposição de células HaCaT à diferentes associações entre UVA e extrato de CFC

A análise do efeito fotoprotetor do extrato de CFC em células HaCaT foi realizada pelo tratamento com extrato pré-irradiação, simultâneo à irradiação e pós-irradiação UVA. O extrato de CFC, em ambas concentrações, não apresentou efeito fotoprotetor quando exposto às células 30 min antes da irradiação (Figura 4). Em 24 h, a viabilidade de células tratadas com 1 mg/mL + 0,5 J/cm² diferiu significativamente do controle, porém não de células irradiadas somente com 0,5 J/cm² (Figura 4(A)). Em 24 h e 48 h, a associação 1 mg/mL + 2 J/cm² diminuiu a viabilidade celular de células HaCaT (Figura 4(B)).

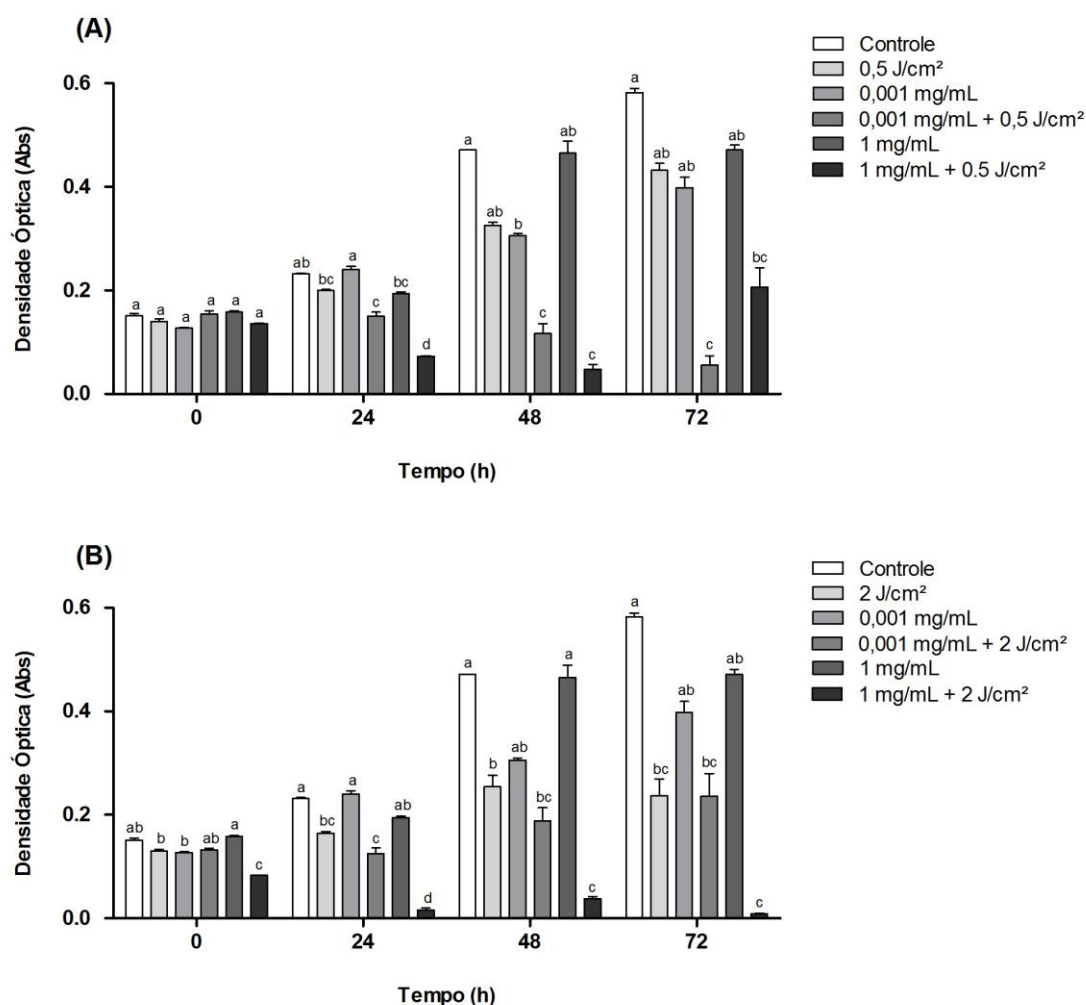
Figura 4 - Efeito do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados pré-irradiação UVA



Viabilidade celular. Queratinócitos humano HaCaT foram tratados com extrato de CFC nas concentrações 0,001 mg/mL e 1 mg/mL e incubados a 37 °C por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e irradiadas com 0,5 J/cm² (A) e 2 J/cm² (B) de UVA. Após irradiação, as células foram re-incubadas com meio suplementado por 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em cada tempo de incubação.

O mesmo foi observado quando as células foram tratadas com extrato de CFC e irradiadas, de forma simultânea (Figura 5). Quando associado 0,001 mg/mL + 0,5 J/cm², nós observamos diminuição da viabilidade em 48 e 72 h. Para a associação 1 mg/mL + 0,5 J/cm² foi observada diminuição da viabilidade em 24 e 48 h (Figura 5(A)). Para a associação 1 mg/mL + 2 J/cm², foi observada diminuição da viabilidade a partir de 24 h após exposição (Figura 5(B)).

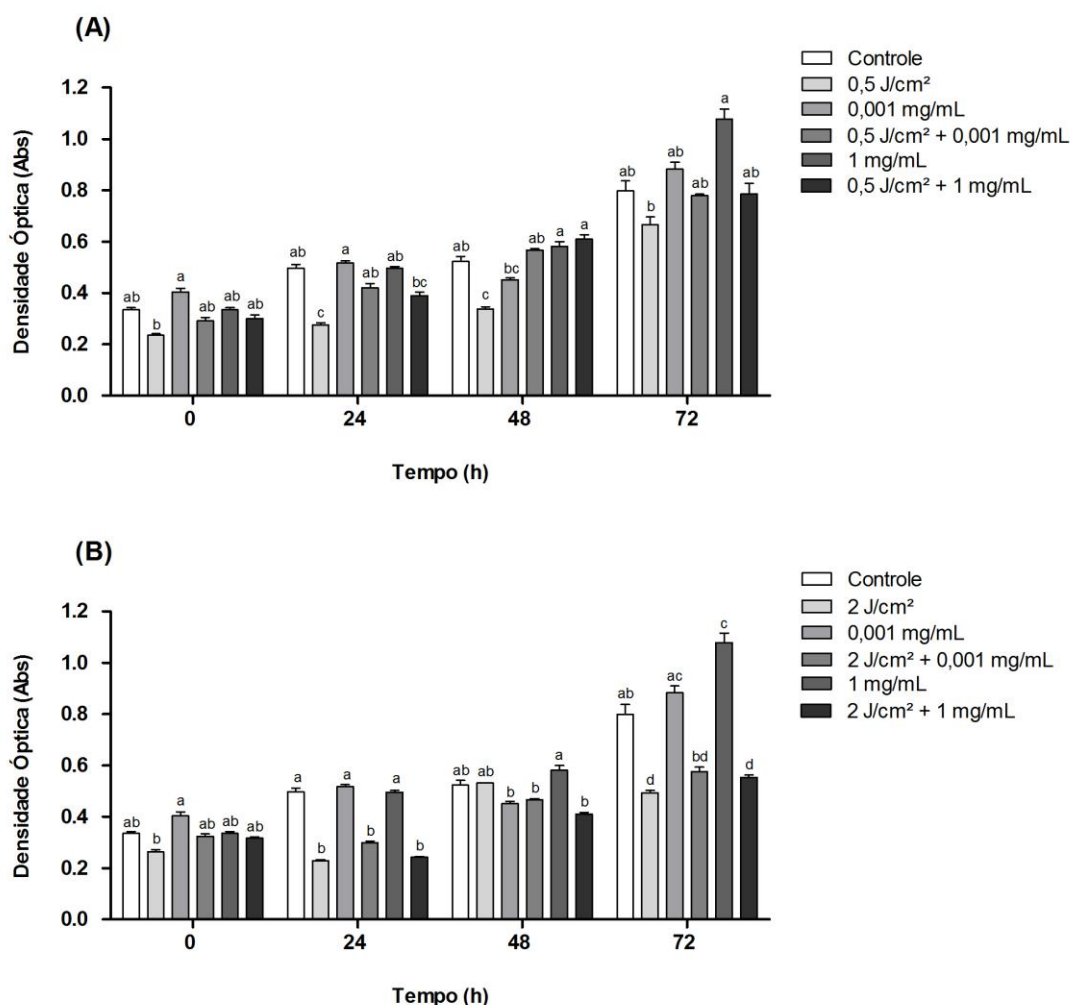
Figura 5 - Efeito do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados e irradiados com UVA, de forma simultânea



Viabilidade celular. Queratinócitos humano HaCaT foram tratados com extrato de CFC nas concentrações 0,001 mg/mL e 1 mg/mL e irradiados com 0,5 J/cm² (A) e 2 J/cm² (B) de UVA, de forma simultânea. Em seguida, as células foram incubadas com meio suplementado a 37 °C por 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em cada tempo de incubação.

O contrário se observa em células HaCaT tratadas com extrato de CFC pós-irradiação UVA (Figura 6). Efeito fotoprotetor foi observado após 24 h e 48 h, quando as células foram irradiadas com dose de 0,5 J/cm² e tratadas com a menor concentração de extrato (Figura 6(A)). O extrato, em sua maior concentração, apresentou efeito fotoprotetor somente em 48 h (Figura 6(A)). Após 72 h, esse efeito não foi mais observado para as duas concentrações (Figura 6(A)). Nenhuma resposta de fotoproteção ou diminuição da viabilidade foi observada quando as células foram expostas à 2 J/cm² e tratadas com ambas concentrações de extrato (Figura 6(B)). Nesse sentido, somente a dose de 0,5 J/cm² foi utilizada para a avaliação do dano lipídico e produção de ERO induzido por UVA em células HaCaT.

Figura 6 - Efeito fotoprotetor do extrato de CFC em queratinócitos humano HaCaT tratados pós-irradiação UVA



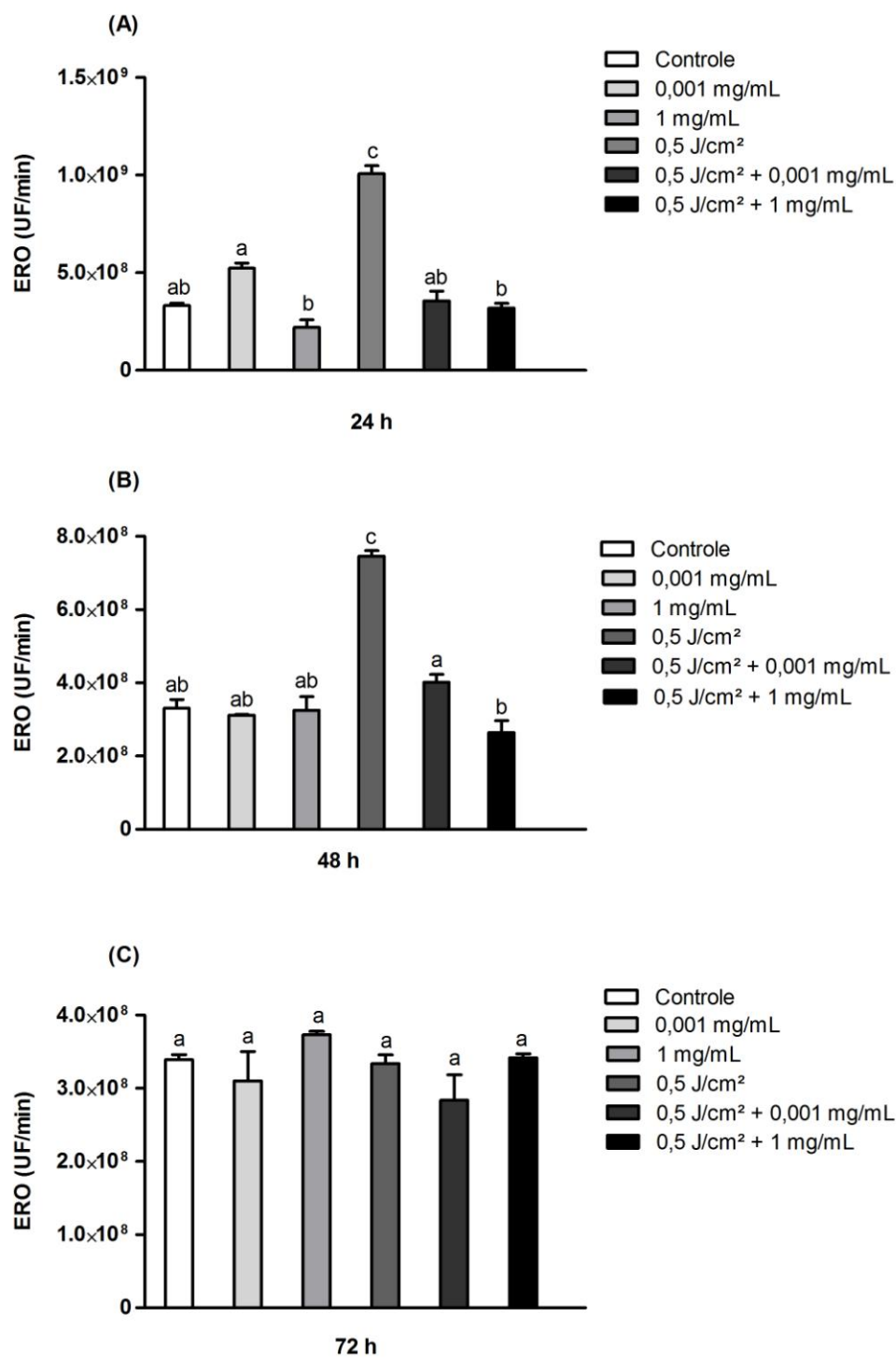
Viabilidade celular. Queratinócitos humano HaCaT foram irradiados com 0,5 J/cm² (A) e 2 J/cm² (B) de UVA e, posteriormente, tratados com 0,001 mg/mL e 1 mg/mL de extrato de CFC, seguido de incubação a 37 °C por 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em cada tempo de incubação.

3.3.3.6 Efeito do extrato de CFC nos níveis intracelulares de ERO induzido por UVA em células HaCaT

Baseado nos resultados anteriormente descritos, nós avaliamos os níveis intracelulares de ERO em células HaCaT tratadas pós-irradiação UVA com 0,5 J/cm². O aumento da geração de ERO (UF/min) em células após irradiação foi detectado por H₂DCF-DA e significativamente suprimido pelo extrato de CFC, em ambas concentrações, em 24 h e 48 h após tratamento (Figura 7(A) e (B)). Em 72 h, este efeito não foi observado (Figura

7(C)).

Figura 7 - Efeito do extrato de CFC nos níveis intracelulares de ERO induzido por UVA em células HaCaT



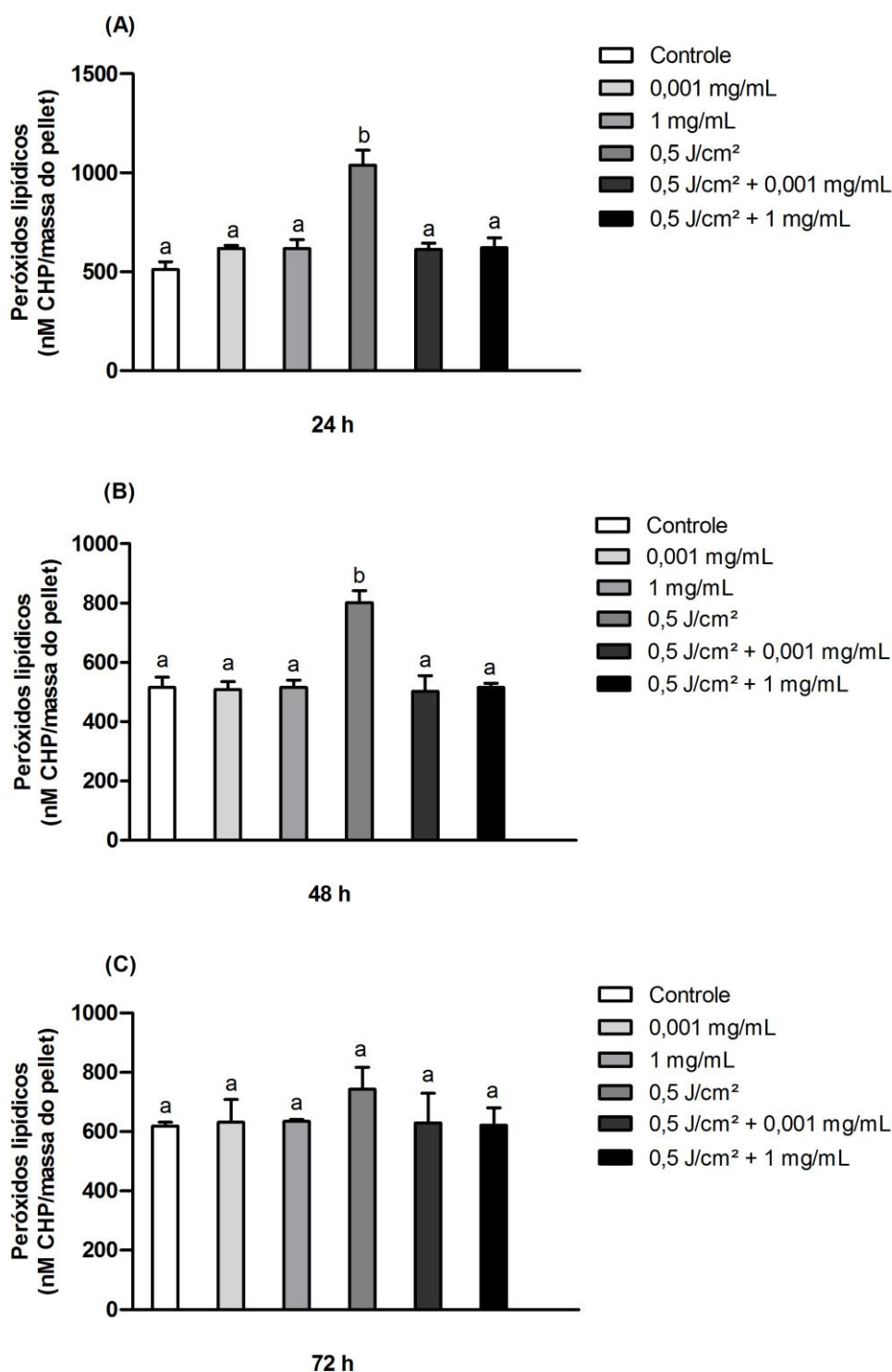
Produção de ERO. Queratinócitos humano HaCaT foram irradiados com 0,5 J/cm² de UVA e tratados com 0,001 mg/mL e 1 mg/mL de extrato de CFC, seguido de incubação a 37 °C por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). Após incubação, a geração de ERO foi detectada por H₂DCF-DA. Os dados estão expressos como média ± erro

padrão, em termos de área de fluorescência emitida longo do tempo de medição (UF/min). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em cada tempo de incubação.

3.3.3.7 Efeito do extrato de CFC sobre a peroxidação lipídica em células HaCaT irradiadas com UVA

Como demonstrado na Figura 8, os níveis de peróxidos lipídicos (nM CHP/massa do pellet) produzidos foi significativamente maior em células HaCaT irradiadas com 0,5 J/cm² de UVA, em 24 h e 48 h (Figura 8(A) e (B)). O tratamento com extrato de CFC resultou em diminuição da produção de LPO, indicando que o dano oxidativo foi menor nas células HaCaT tratadas com extrato.

Figura 8 - Efeito do extrato de CFC sobre a peroxidação lipídica em células HaCaT irradiadas com UVA



Análise de Lipídios Peroxidados. Queratinócitos humano HaCaT foram irradiados com 0,5 J/cm² de UVA e tratados com 0,001 mg/mL e 1 mg/mL de extrato de CFC, seguido de incubação a 37 °C por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). Após incubação, a peroxidação lipídica foi medida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão pelo conteúdo de peróxidos lipídicos formados (nM CHP/massa do pellet). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em cada tempo de incubação.

3.3.4 Discussão

A CFC é uma biliproteína que pode ser extraída da microalga *Spirulina*. Ensaios *in vitro* demonstraram que a CFC possui atividade antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (CHERNG et al., 2007; KU et al., 2013; LIU et al., 2011; ROMAY et al., 2003; SHALABY; SHANAB, 2013). Neste estudo, nós investigamos as atividades biológicas da CFC, com foco particular no seu efeito protetor contra o dano lipídico e a produção de ERO induzido por UVA em linhagem celular de queratinócitos humano HaCaT.

A capacidade antioxidante da CFC têm sido atribuída à sua parte apoteica bem como à sua fluorescência (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; ZHOU et al., 2005). Neste trabalho, nós observamos que em 30 min o extrato de CFC foi adsorvido e/ou absorvido à célula, o mesmo acontecendo para 1 h ou 24 h (Figura 1).

Células tratadas com CFC não apresentaram alteração na viabilidade celular (Figura 2), reforçando o fato de que o extrato pode ser utilizado na formulação de alimentos ou suplementos dietéticos (COSTA et al., 2017, no prelo; FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014).

A pele humana está constantemente exposta à radiação UV, que pode induzir uma série de alterações celulares patobiológicas (SALADI; PERSAUD, 2005). Conforme observamos em nosso trabalho, o aumento da dose de radiação UVA induz diminuição da viabilidade celular (Figura 3), corroborando com os trabalhos de Assefa et al. (2005) e Shorrocks; Paul; Mcmillan (2008), que verificaram morte celular em células HaCaT dependente da intensidade da radiação e do tempo de exposição.

Quando as células foram incubadas com o extrato de CFC por 30 min antes da irradiação, os danos causados pelo UVA não foram revertidos. Além disso, os resultados observados com a associação 1 mg/mL + 0,5 J/cm² foram similares aos observados para UVA, sendo assim a diminuição de viabilidade pode ser atribuída ao UVA, ao contrário de células tratadas com 1 mg/mL + 2 J/cm² (Figura 4). O decréscimo da viabilidade celular também foi observado em células tratadas e irradiadas, de forma simultânea (Figura 5). A não proteção observada neste caso pode estar associada à fotodestruição da CFC, uma vez que este composto é altamente fotossensível (LI; YANG; CAO, 2009). Dos tratamentos com associação (extrato de CFC+UVA), nós descobrimos que a menor concentração de extrato (0,001 mg/mL) pode efetivamente diminuir o dano induzido por UVA à viabilidade celular, quando células irradiadas com dose de 0,5 J/cm² são tratadas com extrato após a irradiação

(Figura 6).

Considerando que a UVA estimula a produção de ERO em células epidérmicas (MARIONNET et al., 2014; RINNERTHALER et al., 2015), os níveis de ERO foram avaliados neste estudo. A produção de ERO, conduzida principalmente por UVA (KRUTMANN; SCHROEDER, 2009; WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2006), é o principal fator envolvido no dano oxidativo induzido por UVA às células da pele. A produção dessas espécies em níveis aumentados, incluindo ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxil (OH^\bullet), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode ativar vias de sinalização e causar danos cutâneo (PRASAD; POSPÍŠIL, 2012; WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2006). Neste trabalho, nós observamos que o extrato de CFC diminuiu efetivamente os níveis intracelulares de ERO em células HaCaT tratadas após exposição à UVA (Figura 7).

O estresse oxidativo é fator fundamental a se considerar no processo de envelhecimento cutâneo (RINNERTHALER et al., 2015). Embora a pele possua um complexo sistema de defesa antioxidante para lidar com o estresse oxidativo, a exposição desprotegida à radiação UV pode sobrecarregar a capacidade antioxidante e resposta imune cutânea, levando a danos oxidativos, imunotoxicidade, envelhecimento prematuro e câncer da pele (GODIC et al., 2014; SYED; AFAQ; MUKHTAR, 2012).

Em resposta ao ataque de ERO, a pele desenvolveu um sistema de defesa antioxidante enzimático complexo. A epiderme é composta principalmente de queratinócitos, que são ricos em enzimas detoxificantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GSH-px) e glutaciona redutase (GSR), que oferecem proteção natural contra ERO (AFAQ; MUKHTAR, 2001; SHINDO et al., 1994; SHINDO; WITT; PACKER, 1993). Tal fato é justificado pela exposição direta da epiderme à agressores ambientais, onde há predominância de queratinócitos (FREINKEL; WOODLEY, 2001). Neste estudo, células expostas somente à UVA apresentaram decréscimo da geração intracelular de ERO ao longo do tempo, devido provavelmente ao seu sistema de defesa antioxidante enzimático.

O extrato de CFC demonstrou atividade antioxidante *in vitro* (Tabela 1) e esta pode estar relacionada a sua capacidade em sequestrar ERO gerados durante a irradiação (Figura 7), o que não foi observado quando as células foram tratadas por 30 min com extrato e irradiadas com 2 J/cm^2 de UVA (Figura 6). Neste caso, nós sugerimos que maior dose de radiação conseguiu estimular maior produção de ERO. Além disso, a foto-oxidação do extrato pode ter ocorrido (Figura 5) em razão de a CFC reagir com os fótons através de transferência

de energia intramolecular e/ou de reações com radicais gerados durante a irradiação, conforme sugerido por Li; Yang; Cao (2009).

Neste estudo também ficou evidenciado que a geração de ERO através da UVA pode induzir reações de peroxidação lipídica nas membranas celulares, com o aumento dos níveis de peróxidos lipídicos, biomarcador de dano da membrana celular (AFAQ et al., 2007). De forma eficiente, o extrato de CFC apresentou efeito protetor, reduzindo este dano. A capacidade do extrato de CFC em reduzir os produtos formados pode ser devido à sua função antioxidante capaz de eliminar os radicais iniciadores do processo de dano na membrana celular (Figura 8). Níveis aumentados de LPO são altamente prejudiciais à estrutura e função da membrana celular e têm sido associado à perda de fluidez, inativação de enzimas de membrana, aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons, como também à ruptura da membrana celular levando a liberação de organelas celulares (BRUNET et al., 2000; CUZZOCREA et al., 2001).

Nos últimos anos, diversos estudos têm relatado os efeitos protetores de ingredientes naturais contra danos foto-oxidativos induzidos por UV. Por exemplo, Song e Gao (2014), utilizando a mesma linhagem deste estudo, relataram que o extrato etanólico de *Lindera coreana* exerceu atividade protetora contra o UVB. Huang et al. (2016), demonstraram que a cicloheterofilina ($C_{30}H_{30}O_7$), isolada de *Artocarpus heterophyllus*, também protegeu linhagem de fibroblastos humano contra efeitos deletérios do UVA. Neste trabalho, o composto estudado foi a CFC, considerado o pigmento mais abundante em cianobactérias, incluindo o gênero *Spirulina*.

Como conclusão, no presente estudo, o efeito fotoprotetor do extrato bruto de CFC foi investigado em linhagem celular epidérmica. Nossos resultados demonstraram que o extrato de CFC até 1 mg/mL não apresentou diminuição de viabilidade celular e que células irradiadas com doses que variaram de 0,5 J/cm² a 6 J/cm² de UVA apresentaram viabilidade celular diminuída após 72 h. Quando os tratamentos foram associados, efeito fotoprotetor não foi observado em células previamente expostas ao extrato de CFC, quando irradiadas com doses de 0,5 J/cm² e 2 J/cm² de UVA. Tal observação também foi feita quando células foram tratadas e irradiadas, de forma simultânea. Todavia, o extrato, em ambas concentrações, protegeu células HaCaT quando tratadas após irradiação com 0,5 J/cm² (15 min de exposição). Tal efeito, pode ser atribuído, em parte, à capacidade antioxidante do extrato de CFC, diminuindo os níveis intracelulares de ERO gerados e inibindo a formação de peróxidos lipídicos na membrana celular, induzidos por UVA. Por fim, os resultados deste estudo mostram que o extrato de CFC protege contra os danos lipídicos causados pela radiação UVA,

sugerindo que esta proteção ocorra devido a diminuição da produção de ERO.

Referências

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 63, p. 61–69, 2001.

AFAQ, F.; SYED, D. N.; MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M. H.; KHAN, N.; ZAID, M. A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 222–232, 2007.

AGAR, N. S.; HALLIDAY, G. M.; BARNETSON, R. S.; ANANTHASWAMY, H. N.; WHEELER, M.; JONES, A. M. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4954-9, 2004.

ANUNCIATO, T. P.; DA ROCHA FILHO, P. A. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 51-4, 2012.

ASSEFA, Z.; VAN LAETHEM, A.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1755, n. 2, p. 90-106, 2005.

BACHELOR, M. A.; BOWDEN, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 2, p. 131-8, 2004.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 257–262, 2012.

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **Journal of Pathology**, v. 211, n. 2, p. 241-251, 2007.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419, 1973.

BRUNET, S.; THIBAUT, L.; LEPAGE, G.; SEIDMAN, E. G.; DUBE, N.; LEVY, E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 46–54, 2000.

CHERNG, S. C.; CHENG, S. N.; TARN, A.; CHOU, T. C. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Life Sciences**, v. 81,

n. 19-20, p. 1431-5, 2007.

COLLA, L. M.; BERTOL, C. D.; FERREIRA, D. J.; BAVARESCO, J.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 332-339, 2017.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 237–241, 2004.

COSTA, J. A. V.; MORO, G. M. B.; FILGUEIRA, D. M. V.; CORSINI, E.; BERTOLIN, T. E. The potential of *Spirulina* and its bioactive metabolites as ingested agents for skin care. **Industrial Biotechnology**, 2017. In press.

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

DE GRUIJL, F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 15, n. 5, p. 316-20, 2002.

DIFFEY, B. L. What is light?. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, n. 2, p. 68-74, 2002.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503–508, 2000.

EDING, C. B.; DOMERT, J.; WÄSTER, P.; JERHAMMAR, F.; ROSDAHL, I.; ÖLLINGER, K. Melanoma growth and progression after ultraviolet A irradiation: impact of lysosomal exocytosis and cathepsin proteases. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 7, p. 792–797, 2015.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSENER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 2, p. 87-95, 2008.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. **Food & Function**, v. 5, n. 9, p. 1994-2003, 2014.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375–392, 2014.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. New York: Parthenon Publishing, 2001.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xilenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 271–280, 1995.

- HEWARD, J. A.; ROUX, B. T.; LINDSAY, M. A. Divergent signalling pathways regulate lipopolysaccharide-induced eRNA expression in human monocytic THP1 cells. **FEBS Letters**, v. 589, p. 396-406, 2015.
- HO, J. N.; CHO, H. Y.; LIM, E. J.; KIM, H. K. Effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes HaCaT. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, p. 475–480, 2009.
- HUANG, C-H.; LI, H-J.; WU, N-L.; HSIAO, C-Y.; LIN, C-N.; CHANG, H-H.; HUNG, C-F. Photoprotective effects of cycloheterophyllin against uva-induced damage and oxidative stress in human dermal fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.
- KAWANO, A.; KADOMATSU, R.; ONO, M.; KOJIMA, S.; TSUKIMOTO, M.; SAKAMOTO, H. Autocrine regulation of UVA-induced IL-6 production via release of ATP and activation of P2Y receptors. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.
- KAWASAKI, T; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-8, 2014.
- KLIGMAN, L. H.; KLIGMAN, A. M. The nature of photoaging: its prevention and repair. **Photodermatology**, v. 3, p. 215-227, 1986.
- KRUTMANN, J.; SCHROEDER, P. Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, n. 1, p. 44-9, 2009.
- KU, C. S.; PHAM, T. X.; PARK, Y.; KIM, B.; SHIN, M. S.; KANG, I.; LEE, J. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 4, p. 2981–2988, 2013.
- KULMS, D.; SCHWARZ, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 16, p. 195–201, 2000.
- LI, Y.; YANG, H.; CAO, F. M. Effect of ultraviolet irradiation on photostability of C-phycocyanin in a silica matrix. **Research on Chemical Intermediates**, v. 35, n. 5, p. 607–613, 2009.
- LIU, J-G.; HOU, C-W.; LEE, S-Y.; CHUANG, Y.; LIN, CHIH-CHENG. Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v.46, n. 7, p. 1405–1410, 2011.
- LORENCINI, M.; BROHEM, C. A.; DIEAMANT, G. C.; ZANCHIN, N. I. T.; MAIBACH, H. I. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100-115, 2014.
- MARIONNET, C.; PIERRARD, C.; GOLEBIEWSKI, C.; BERNERD, F. Diversity of biological effects induced by longwave UVA rays (UVA1) in reconstructed skin. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-

435, 2008.

MICHELS, A. J.; DRAELOS, Z. D. **Skin Health**. 2011. Disponível em: <<http://lpi.oregonstate.edu/mic/health-disease/skin-health>>. Acesso em 25 jun 2017.

MONSERRAT, J. M.; GERACITANO, L. A.; PINHO, G. L. L.; VINAGRE, T. M.; FALEIROS, M.; ALCIATI, J. C.; BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, p. 177–183, 2003.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, suppl. S1, p. 133–148, 2010.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. R.; ANDRADE, M. R. TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

NATARAJAN, V. T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 7, p. 542-551, 2014.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, p. 249–256, 2011.

OYAIZU, M. Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PANDEL, R.; POLJŠAK, B.; GODIC, A.; DAHMANE, R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Notices: Dermatology**, v. 2013, 2013.

PARISI, A. V.; WONG, J. C. An estimation of biological hazards due to solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 126-30, 2000.

PEREIRA, V. S. R. **Mecanismos celulares da inflamação – avaliação da atividade anti-inflamatória de flavonoides**. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 17–34, 2005.

PRASAD, A.; POSPÍŠIL, P. Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: in vivo charge coupled device imaging. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 8, 2012.

- QUAN, C.; CHO, M. K.; PERRY, D.; QUAN, T. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 62, 2015.
- RINNERTHALER, M.; BISCHOF, J.; STREUBEL, M. K.; TROST, A.; RICHTER, K. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545–589, 2015.
- ROMAY, C. H.; GONZALÉZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.
- ROYER, M.; PRADO, M.; GARCÍA-PÉREZ, M. E.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from *Canadian forest* species. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 158-167, 2013.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128**. Fortaleza, Brasil, 2007a.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127**. Fortaleza, Brasil, 2007b.
- SALADI, R. N.; PERSAUD, A. N. The causes of skin cancer: a comprehensive review. **Drugs of Today**, v. 41, p. 37–53, 2005.
- SCHAGEN, S. K.; ZAMPELI, V. A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Discovering the link between nutrition and skin aging. **Dermatoendocrinology**, v. 4, n. 3, p. 298–307, 2012.
- SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 1-11, 2006.
- SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Antiradical and antioxidant activities of different *Spirulina platensis* extracts against DPPH and ABTS radical assays. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 2, n. 1, 2013.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260–265, 1993.
- SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; TZENG, B.; AZIZ, T.; NGUYEN, L.; PACKER, L. Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and

dermis after acute ultraviolet radiation exposure. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 10, n. 5, p. 183–191, 1994.

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**, v. 128, n. 3, p. 685–93, 2008.

SONG, J-L.; GAO, Y. Protective Effects of *Lindera coreana* on UVB-induced oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 4, p. 1369–1378, 2014.

SYED, D. N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 1184–1190, 2012.

TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R.; RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemistry Photobiology**, v. 69, p. 694–699, 1999.

WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 215–37, 2006.

YOGIANTI, F.; KUNISADA, M.; NAKANO, E.; ONO, R.; SAKUMI, K.; OKA, S.; NAKABEPPU, Y.; NISHIGORI, C. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 10, p. 2610–9, 2014.

ZHOU, Z. P.; LIU, L. N.; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; CHEN, M.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. Factors that effect antioxidant activity of C-phycoyanins from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 313–322, 2005.

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

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, o extrato de C-ficocianina foi obtido a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e a concentração de ficocianina mensurada foi igual a 5,5 mg/mL.

Os ensaios utilizando a linhagem celular monocítica de leucemia aguda humana THP-1 com lipopolissacarídeo como estimulador demonstraram que o extrato de C-ficocianina apresentou atividade imunomoduladora, tanto imunossuprimindo quanto imunoestimulando IL-8 e TNF- α , mediadores importantes na regulação da resposta imune. A produção destas citocinas foi devido a ativação do TLR4, um dos receptores envolvidos no reconhecimento do efeito imunoestimulador do extrato de C-ficocianina. Contudo, a expressão de genes que codificam estas citocinas não foi alterada.

A fluorescência do extrato de C-ficocianina foi observada em cultura celular com queratinócitos humano HaCaT, estando este composto adsorvido e/ou absorvido às células a partir de 30 min.

Células HaCaT tratadas com extrato de C-ficocianina não apresentaram alteração na viabilidade celular; entretanto, quando irradiadas com doses que variaram de 0,5 J/cm² a 6 J/cm² de UVA apresentaram viabilidade celular diminuída após 72 h da exposição.

Células HaCaT previamente expostas ao extrato de C-ficocianina (30 min) e irradiadas com 0,5 J/cm² e 2 J/cm² de UVA, apresentaram diminuição da viabilidade celular. O mesmo foi observado para células HaCaT tratadas e irradiadas, de forma simultânea.

Células HaCaT irradiadas com dose de 0,5 J/cm² de UVA e tratadas com extrato de C-ficocianina após irradiação tiveram aumento da viabilidade celular, produziram menor quantidade de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, tiveram menor formação de peróxidos lipídicos na membrana celular.

As respostas de fotoproteção observadas neste estudo podem ser atribuídas, em parte, à capacidade antioxidante do extrato de C-ficocianina, previamente avaliada através de diferentes métodos *in vitro*.

A partir destes achados, o extrato de C-ficocianina mostra capacidade de imunomodulação e fotoprotetora, inibindo a produção de ERO e o dano lipídico induzido por UVA.

CAPÍTULO V

APÊNDICE A – Carta de aceite de manuscrito enviado à *Industrial Biotechnology***Decision Letter (IND-2017-0010.R2)**

From: akuehnle@liebertpub.com
To: jorgealbertovc@terra.com.br
CC:

Subject: Industrial Biotechnology - Decision on Manuscript ID IND-2017-0010.R2

Body: 07-Aug-2017

Dear Dr. Costa:

It is my pleasure to inform you that your manuscript, "The Potential of Spirulina and its Bioactive Metabolites as Ingested Agents for Skin Care", has been accepted for publication in an upcoming issue of *Industrial Biotechnology: The journal of biobased industries*.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will receive a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of *Industrial Biotechnology*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Unable to Display Letter Tag (##DOCUMENT_DOI##)

Sincerely,
Dr. Adelheid Kuehnle
Co-Editor-in-Chief, *Industrial Biotechnology*
akuehnle@liebertpub.com

Date Sent: 07-Aug-2017

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-DAIM, M.; EL-BIALY, B. E.; RAHMAN, H. G. A.; RADI, A. M.; HEFNY, H. A.; HASSAN, A. M. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: Biochemical and histopathological studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 77, p. 79-85, 2016.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v.2, p. 283–318, 1984.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782–7, 2000.
- AFAQ, F.; KATIYAR, S. K. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1200-15, 2011.
- AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 63, p. 61–69, 2001.
- AFAQ, F.; SYED, D. N.; MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M. H.; KHAN, N.; ZAID, M. A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 222–232, 2007.
- AGAR, N. S.; HALLIDAY, G. M.; BARNETSON, R. S.; ANANTHASWAMY, H. N.; WHEELER, M.; JONES, A. M. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 4954-9, 2004.
- AL-BATSHAN, H. A.; AL-MUARREJ, S. I.; AL-HOMAIDAN, A. A.; QURESHI, M. A. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23 p. 281–289, 2001.
- AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; D’ORAZIO, J. A. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6202–6219, 2014.
- ANUNCIATO, T. P.; DA ROCHA FILHO, P. A. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, n.1, p. 51–4, 2012.
- ANWAR, F.; CHAUDHRY, F.; NAZEER, S.; ZAMAN, N.; AZAM, S. Causes of ozone layer depletion and its effects on human: review. **Atmospheric and Climate Sciences**, v. 6, p. 129-134, 2016.
- ASSEFA, Z.; VAN LAETHEM, A.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. Ultraviolet radiation-

induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1755, n. 2, p. 90-106, 2005.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

BACHELOR, M. A.; BOWDEN, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 2, p. 131-8, 2004.

BAI, S. K.; LEE, S. J.; NA, H. J.; HA, K. S.; HAN, J. A.; LEE, H.; KWON, Y. G.; CHUNG, C. K.; KIM, Y. M. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 37, n. 4, p. 323-334, 2005.

BARON, E. D.; SUGGS, A. K. Introduction to photobiology. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 255-66, 2014.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257-262, 2012.

BASAVARAJ, K. H; SEEMANTHINI, C.; RASHMI R. Diet in dermatology: present perspectives. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. 205-210, 2010.

BATTISTI, B. Z.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Nutricosmetics aging process in women. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 29, p. 51-62, 2014.

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **Journal of Pathology**, v. 211, n. 2, p. 241-251, 2007.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419, 1973.

BIBBY M. C. The specificity of early changes in the skin during carcinogenesis. **British Journal of Dermatology**, v. 104, p. 485-488, 1981.

BONAVENTURE, J.; DOMINGUES, M. J.; LARUE, L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, p. 316-325, 2013.

BRUNET, S.; THIBAUT, L.; LEPAGE, G.; SEIDMAN, E. G.; DUBE, N.; LEVY, E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 46-54, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **VII Lista dos novos ingredientes aprovados**. Brasília: Comissões Tecno-científicas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. 2013. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm>.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 539-549, 2007.

BRITANNICA ESCOLA. **Pele**. 2017. Disponível em:

<<http://escola.britannica.com.br/levels/fundamental/assembly/view/135568>>. Acesso em: 9 de julho de 2017.

BURKE, K. E. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. **Dermatology and Therapy**, v. 20, n. 5, p. 314-21, 2007.

BURKE, K. E.; CLIVE, J.; COMBS, G. F. JR.; COMMISSO, J.; KEEN, C. L.; NAKAMURA, R. M. Effects of topical and oral vitamin E on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation in Skh:2 hairless mice. **Nutrition and Cancer**, v. 38, p. 87-97, 2000.

BURKE, K. E. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. **Dermatology and Therapy**, v. 20, n. 5, p. 314-21, 2007.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; DI MASCIO, P. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p. 903–911, 2009.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARRIE, M. Nutricosmetics: Decoding the convergence of beauty and healthcare. In: **“In-Cosmetics” Conference**, Amsterdam, 2008.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 37–45, 2014.

CHEN, J. C.; LIU, K. S.; YANG, T. J.; HWANG, J. H.; CHAN, Y. C.; LEE, I. T. *Spirulina* and C-phycoyanin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v.15, n. 6, p. 252-256, 2012.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C.; WANG, E. I. C.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1337-1344, 2014.

CHERNG, S. C.; CHENG, S. N.; TARN, A.; CHOU, T. C. Anti-inflammatory activity of c-phycoyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Life Sciences**, v. 81, n. 19-20, p. 1431-5, 2007.

CHO, S.; LEE, D. H.; WON, C. H.; KIM, S. M.; LEE, S.; LEE, M. J.; CHUNG, J. H. Differential effects of lowdose and high-dose beta-carotene supplementation on the signs of photoaging and type I procollagen gene expression in human skin in vivo. **Dermatology**

(Basel, Switzerland), v. 221, n. 2, p. 160–171, 2010.

CHOJNACKA, K.; SAEID, A.; WITKOWSKA, Z.; TUHY, L. Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. **Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, p. 20-28, 2012.

CHULASIRI, M. Antiaging cosmeceuticals from pigmented rice. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, 2016.

CIE. **Standardization of the terms UV-A1, UV-A2 and UV-B**. Vienna: Commission Internationale de l'Eclairage. Report CIE-134/1, 1999.

CIE. **International lighting vocabulary**. Vienna: Commission Internationale de l'Eclairage. Publication CIE n. 17 (E-1.1), 1987.

COLLA, L. M.; BERTOL, C. D.; FERREIRA, D. J.; BAVARESCO, J.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 332-339, 2017.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 237–241, 2004.

COSTA, J. A. V.; MORO, G. M. B.; FILGUEIRA, D. M. V.; CORSINI, E.; BERTOLIN, T. E. The potential of *Spirulina* and its bioactive metabolites as ingested agents for skin care. **Industrial Biotechnology**, 2017. In press.

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

DARVIN, M. E.; JUNG, S.; SCHANZER, S.; RITCHER, H.; KURTH, E.; THEIDE, G.; MEINKE, M. C.; LADEMANN, J. Influence of the systemic application of blue–green *Spirulina platensis* algae on the cutaneous carotenoids and elastic fibers in vivo. **Cosmetics**, v. 2, p. 302-312, 2015.

DEFELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 59-61, 1995.

DE GRUIJL, F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 15, n. 5, p. 316-20, 2002.

DE GRUIJL, F. R.; VAN DER LEUN, J. C. Environment and health: 3. Ozone depletion and ultraviolet radiation. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, p. 851–5, 2000.

DELEVOYE, C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 877-879, 2014.

DELSIN, S. D.; MERCURIO, D. G.; FOSSA, M. M.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing *Spirulina* extract on young and mature skin: effects on the skin hydrolipidic barrier and structural properties. **Clinical Pharmacology**

and Biopharmaceutics, v. 4, n. 4, p. 1-5, 2015.

DE MARSAC, N. T.; COHEN-BAZIRE, G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 4, p. 1635–9, 1977.

DIFFEY, B. L. What is light?. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, n. 2, p. 68-74, 2002.

DIFFEY, B.; KOICHEVAR, I. **Basic principles of photobiology**. In: LIM, H.; HONIGSMANN, H.; HAWK, J. L. (editors). *Photodermatology*. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 15–27.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503–508, 2000.

D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DOUKI T. The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1286-1302, 2013.

DRAELOS, Z. D. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 400-408, 2010.

EDING, C. B.; DOMERT, J.; WÄSTER, P.; JERHAMMAR, F.; ROSDAHL, I.; ÖLLINGER, K. Melanoma growth and progression after ultraviolet A irradiation: impact of lysosomal exocytosis and cathepsin proteases. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 7, p. 792–797, 2015.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSENER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 87-95, 2008.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. **Food & Function**, v. 5, n. 9, p. 1994-2003, 2014.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375–392, 2014.

FINAMORE, A.; PALMERY, M.; BENSEHAILA, S.; PELUSO, I. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127**. CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2003. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm267267.pdf>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)**. 2012a. Disponível em :<<http://www.fda.gov/cosmetics/guidanceregulation/lawsregulations/ucm074201.htm>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000424**. 2012b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm335743.htm>>. Acesso em dez. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Labeling & Nutrition**. 2016. Disponível em <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/labelingnutrition/ucm2006860.htm>>. Acesso em mai. 2017.

FLOYD, R. A.; TOWNER, R. A.; HE, T.; HENSLEY, K.; MAPLES, K. R. Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 931–941, 2011.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. New York: Parthenon Publishing, 2001.

FRIEDBERG, E. C. A history of the DNA repair and mutagenesis field: the discovery of base excision repair. **DNA Repair**, v. 37, p. 35-39, 2016

FRIEDMAN, O. Changes associated with the aging face. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 13, p. 371–380, 2005.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 3, p. 199-209, 2002.

GERSHWIN, A.; BELAY, A. **Spirulina in Human Nutrition and Health**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NFkappaB in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 837-848, 2008.

GHOSH, S.; MARY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. **The Global Nutricosmetics Market: Trends, Drivers & Projections**. 2015. Disponível em :<http://www.strategyr.com/MarketResearch/Nutricosmetics_Market_Trends.asp>. Acessado em Maio 2017.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

GOMBART, A. F. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. **Future Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1151-65, 2009.

GOMES, L.; TARANTINO, M. Beleza em cápsulas. **ISTOÉ**. Abr 2012. Disponível em: <http://www.istoe.com.br/reportagens/200947_BELEZA+EM+CAPSULAS>. Acesso: mar 2017.

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

GRZANNA, R.; POLOTSKY, A.; PHAN, P. V.; PUGH, N.; PASCO, D.; FRANDOZA, C. G. Immolina, a high-molecular-weight polysaccharide fraction of *Spirulina*, enhances chemokine expression in human monocytic THP-1 cells. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 12, n. 5, p. 429-435, 2006.

GUPTA, N. K.; GUPTA, K. P. Effects of C-phycoyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 941-948, 2012.

HALLIDAY, G. M.; LYONS, J. G. Inflammatory doses of UV may not be necessary for skin carcinogenesis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 2, p. 272-83, 2008.

HARMAN, D. Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HAYASHI O, KATOH T, OKUWAKI Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 40, p. 431-441, 1994.

HEINRICH, U.; GARTNER, C.; WIEBUSCH, M.; EICHLER, O.; SIES, H.; TRONNIER, H.; STAHL, W. Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 98-101, 2003.

HELFRICH, Y. R.; SACHS, D. L.; VOORHEES, J. J. Overview of skin aging and photoaging. **Dermatology Nursing**, v. 20, n. 3, p. 177-184.

HENRIKSON, R. **Earth Food *Spirulina***. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: STOREY, K. B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley-Liss, Hoboken, p. 319-368, 2004.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xilenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 271-280, 1995.

HEWARD, J. A.; ROUX, B. T.; LINDSAY, M. A. Divergent signalling pathways regulate lipopolysaccharide-induced eRNA expression in human monocytic THP1 cells. **FEBS Letters**, v. 589, p. 396-406, 2015.

HO, J. N.; CHO, H. Y.; LIM, E. J.; KIM, H. K. Effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes HaCaT. **Food Science and**

Biotechnology, v. 18, p. 475–480, 2009.

HOSSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231-7, 2013.

HUANG, C. H.; LI, H. J.; WU, N. L.; HSIAO, C. Y.; LIN, C. N.; CHANG, H. H.; HUNG, C. F. Photoprotective effects of cycloheterophyllin against uva-induced damage and oxidative stress in human dermal fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.

ISHIDA, T.; SAKAGUCHI, I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 928-34, 2007.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 376p.

KAFI, R.; KWAK, H. S.; SCHUMACHER, W. E.; CHO, S.; HANFT, V. N.; HAMILTON, T. A.; KING, A. L.; NEAL, J. D.; VARANI, J.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J.; KANG, S. Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). **Archives of Dermatology**, v. 143, n. 5, p. 606-12, 2007.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidative events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KAWANO, A.; KADOMATSU, R.; ONO, M.; KOJIMA, S.; TSUKIMOTO, M.; SAKAMOTO, H. Autocrine regulation of UVA-induced IL-6 production via release of ATP and activation of P2Y receptors. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

KAWASAKI, T; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

KENDALL, A. C.; KIEZEL-TSUGUNOVA, M.; BROWNBRIDGE, L. C.; HARWOOD, J. L.; NICOLAOU, A. Lipid functions in skin: differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2017.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 141-64, 2013.

KIERSZENBAUM, A. K.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular** - Uma Introdução á Patologia. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. 752p.

KILLILEA, S. D.; O'CARRA, P. Structure and apoprotein linkages of phycourobilin S. **Biochemical Journal**, v. 226, p. 723-731, 1985.

KLIGMAN, L. H.; KLIGMAN, A. M. The nature of photoaging: its prevention and repair.

Photodermatology, v. 3, p. 215-227, 1986.

KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 873-84, 2011.

KÖPCKE, W.; KRUTMANN, J. Protection from sunburn with beta-carotene—a meta-analysis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 284–288, 2008.

KOZMA, B.; EIDE, M. J. Photocarcinogenesis an epidemiologic perspective on ultraviolet light and skin cancer. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p. 301–313, 2014.

KRUTMANN, J.; HUMBERT, P. **Nutrition for Healthy Skin: Strategies for Clinical and Cosmetic Practice**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

KU, C. S.; PHAM, T. X.; PARK, Y.; KIM, B.; SHIN, M. S.; KANG, I.; LEE, J. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 4, p. 2981–2988, 2013.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

KULMS, D.; SCHWARZ, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 16, p. 195–201, 2000.

LEEM, K. H. Effects of *Olibanum* extracts on the collagenase activity and procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts and tyrosinase activity. **Advanced Science and Technology Letters**, v. 88, p. 172–175, 2015.

LEPHART, E. D. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 31, p. 36-54, 2016.

LI, Y.; YANG, H.; CAO, F. M. Effect of ultraviolet irradiation on photostability of C-phycoyanin in a silica matrix. **Research on Chemical Intermediates**, v. 35, n. 5, p. 607–613, 2009.

LIU, J. G.; HOU, C. W.; LEE, S. Y.; CHUANG, Y.; LIN, CHIH, C. Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v.46, n. 7, p. 1405–1410, 2011.

LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **European Respiratory Journal**, v. 38, p. 191-208, 2011.

LORENCINI, M.; BROHEM, C. A.; DIEAMANT, G. C.; ZANCHIN, N. I. T.; MAIBACH, H. I. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100-115, 2014.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-51, 2008.

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

MAJEED, M.; BHAT, B.; ANAND, S.; SIVAKUMAR, A.; PALIWAL, P.; GEETHA, K. G. Inhibition of UV-induced ROS and collagen damage by *Phyllanthus emblica* extract in normal human dermal fibroblasts. **Journal of Cosmetic Science**, v. 62, n. 1, p. 49-56, 2011.

MARINI, A. Beauty from the inside. Does it really work?. **Der Hautarzt**, v. 62, n. 8, p. 614-7, 2011.

MARIONNET, C.; PIERRARD, C.; GOLEBIEWSKI, C.; BERNERD, F. Diversity of biological effects induced by longwave UVA rays (UVA1) in reconstructed skin. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. Experimental evidence that skin carcinogenesis is a multistep phenomenon. **British Journal of Dermatology**, v. 115, p. 1-8, 1986.

MARROT, L.; MEUNIER, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, p. 139-148, 2008.

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, p. 474–9, 1995.

MASUDA, M.; MURATA, K.; NARUTO, S.; UWAYA, A.; ISAMI, F.; MATSUDA, H. Matrix metalloproteinase-1 inhibitory activities of *Morinda citrifolia* seed extract and its constituents in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 210—215, 2012.

McARDLE, F.; RHODES, L. E.; PARSLEW, R.; JACK, C. I.; FRIEDMANN, P. S.; JACKSON, M. J. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 1355-1362, 2002.

MEADOWS, C.; MOORE, D. J.; MOORE, D. M.; DRAELOS, Z. D.; KERN, D. Age-related NADH oxidase (arNOX)-catalyzed oxidative damage to skin protein. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, p. 645-652, 2014.

MECHAM, R. P.; BROEKELMANN, T. J.; FLISZAR, C. J.; SHAPIRO, S. D.; WELGUS, H. G.; SENIOR, R. M.. Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18071–18076, 1997.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MICHELS, A. J.; DRAELOS, Z. D. **Skin Health**. 2011. Disponível em: <<http://ipi.oregonstate.edu/mic/health-disease/skin-health>>. Acesso em 25 jun 2017.

MINIC, S. L.; STANIC-VUCINIC, D.; MIHAILOVIC, J.; KRSTIC, M.; NIKOLIC, M. R.; CIRKOVIC VELICKOVIC, T. Digestion by pepsin releases biologically active

chromopeptides from C-phycoyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 132-9, 2016.

MITCHNICK, M. A.; FAIRHURST, D.; PINNELL, S. R. Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, p. 85-90, 1999.

MONSERRAT, J. M.; GERACITANO, L. A.; PINHO, G. L. L.; VINAGRE, T. M.; FALEIROS, M.; ALCIATI, J. C.; BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, p. 177-183, 2003.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, suppl. S1, p. 133-148, 2010.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. R.; ANDRADE, M. R. TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MORO, G. M. B. **Potencial nutricosmético da microalga *Spirulina* em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo***. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande.

MURPHY, G. M. Ultraviolet radiation and immunosuppression. **British Journal of Dermatology**, v. 16, suppl 3, p. 90-5, 2009.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; HANNAH, A. C. Oxidative stress and skin cancer: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 110-115, 2013.

NATARAJAN, V. T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R. S. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 7, p. 542-551, 2014.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, p. 249-256.

NDLOVU, G.; FOUCHE, G.; TSELANYANE, M.; CORDIER, W.; STEENKAMP, V. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 304-310, 2013.

NEAGU, M.; CARUNTU, C.; CONSTANTIN C.; BODA, D.; ZURAC, S.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A. M. Chemically induced skin carcinogenesis: updates in experimental models (review). **Oncology Reports**, v.35, n. 5, p. 2516–2528, 2016.

NEVES, K. Nutricosméticos – Beleza de dentro para fora. **Revista Cosmetic & Toiletries**, v. 21, n. 3, p. 18-23, 2009.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Directive 2002/46/EC the European Parliament and of the Council**. Approximation of the laws of the member states relating to food supplements. Luxembourg, 10 jun 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:183:0051:0057:EN:PDF>>. Acesso em: 5 mar. 2017.

ONAR, H. C.; YUSUFOGLU, A.; TURKER, G.; YANARDAG, R. Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. **Journal of Medical Plants Research**, v. 6, n. 5, p. 716-726, 2012.

OSAKABE A, TACHIWANA H, KAGAWA W.; HORIKOSHI, N.; MATSUMOTO, S.; HASEGAWA, M.; MATSUMOTO, N.; TOGA, T.; YAMAMOTO, J.; HANAOKA, F.; THOMÄ, N. H.; SUGASAWA, K.; IWAI, S.; KURUMIZAKA, H. Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6–4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

OYAIZU, M. Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PAMPLONA, R.; CONSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. R843–R863, 2001.

PANDEL, R.; POLJŠAK, B.; GODIC, A.; DAHMANE, R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Network**, v. 2013, 2013.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, 2013.

PARK, K. Role of micronutrients in skin health and function. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 207-217, 2015.

PARISI, A. V.; WONG, J. C. An estimation of biological hazards due to solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 126-30, 2000.

PATEL, A.; PAWAR, R.; MISHRA, S.; SONAWANE, S.; GHOSH, P. K. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycoyanin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254–257, 2004.

PATRICK, H.; RAHN, R. O. Photochemistry of DNA and polynucleotides: photoproducts. In: WANG, S. Y. **Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids**. New York, NY: Academic Press, p. 35-91, 1976.

PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Actions of ultraviolet light on cellular structures. **EXS**, v. 96, p. 131–57, 2006.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G.; CARNES, B. A. Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 3, p. 381–387, 1987.

PEREIRA, V. S. R. **Mecanismos celulares da inflamação – avaliação da atividade anti-inflamatória de flavonoides**. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PICCARDI, N.; MANISSIER, P. Nutrition and nutritional supplementation: impact on skin health and beauty. **Dermato-endocrinology**, v. 1, n. 5, p. 271–274, 2009.

PICKART, L.; VASQUEZ-SOLTERO, J. M.; MARGOLINA, A. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 17–34, 2005.

POLJSAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIC, A. Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 21, n. 2, p. 33–36, 2012.

PRASAD, A.; POSPÍŠIL, P. Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: in vivo charge coupled device imaging. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 8, 2012.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

QUAN, C.; CHO, M. K.; PERRY, D.; QUAN, T. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, p. 62, 2015.

QURESHI, M. A.; GARLICH, J.; KIDD, M. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune function in chickens. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 18, p. 465–476, 1996.

RABE, J. H.; MAMELAK, A. J.; MCELGUNN, P. J. S.; MORISON, W. L.; SAUDER, D. N. Photoaging: Mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.

- RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.
- RAFFERTY, T. S.; MCKENZIE, R. C.; HUNTER, J. A.; HOWIE, A. F.; ARTHUR, JR.; NICOL, F.; BECKETT, G. J. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochemical Journal**, v. 332, p. 231-236, 1998.
- RAJA, R.; HEMAISWARYA, S. **Microalgae and immune potential**. In: WATSON, R. R.; ZIBADI, S. PREEDY, V. R. Dietary components and immune function. New York: Humana Press, 2010.
- RASOOL, M.; SABINA, E. P. Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 2, p. 169-75, 2009.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- RINNERTHALER, M.; BISCHOF, J.; STREUBEL, M. K.; TROST, A.; RICHTER, K. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.
- RIZVI, S.; RAZA, S. T.; MAHDI, F. Telomere length variations in aging and age-related diseases. **Current Aging Science**, v. 7, n. 3, p. 161-7, 2014.
- ROBERFROID, M. B. **Aliments Fonctionnels: Définitions, Concepts et Strategies**. In: ROBERFROID, M.; COXAM V.; DELZENNE, N. Aliments Fonctionnels. Paris: Lavoisier, p. 53-72, 2008.
- ROMAY, C.; DELGADO R.; REMIREZ D.; GONZÁLES, R.; ROJAS, A. Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 9, p. 733-736, 2001.
- ROMAY, C. H.; GONZALÉZ, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.
- ROUZAUD, F.; KADEKARO, A. L.; ABDEL-MALEK, Z. A.; HEARING, V. J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research**, v. 57, p. 133-152, 2005.
- ROYER, M.; PRADO, M.; GARCÍA-PÉREZ, M. E.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from *Canadian forest* species. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 158-167, 2013.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128**. Fortaleza, Brasil, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127**. Fortaleza, Brasil, 2007b.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 129-141, 2013.

SALADI, R. N.; PERSAUD, A. N. The causes of skin cancer: a comprehensive review. **Drugs of Today**, v. 41, p. 37–53, 2005.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1247, p. 1-11, 1995.

SCHAFER, F. Q.; WANG, H. P.; KELLEY, E. E.; CUENO, K. L.; MARTIN, S. M.; BUETTNER, G. R. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 383, n. 3–4, p. 671–681, 2002.

SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 3, p. 307-16, 2000.

SCHAGEN, S. K.; ZAMPELI, V. A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. Discovering the link between nutrition and skin aging. **Dermatoendocrinology**, v. 4, n. 3, p. 298–307, 2012.

SEIBERG, M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. **Pigment Cell Research**, v. 14, p. 236–242, 2001.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 1-11, 2006.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Antiradical and antioxidant activities of different *Spirulina platensis* extracts against DPPH and ABTS radical assays. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 2, n. 1, 2013.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 3, p. 260–265, 1993.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; TZENG, B.; AZIZ, T.; NGUYEN, L.; PACKER, L. Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 10, n. 5, p. 183–191, 1994.

- 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**, v. 128, n. 3, p. 685-93, 2008.
- SILVA, M. R.; CELEM, L. R.; SILVA, S. R.; COSTA, A. P. F. Anti-aging cosmetics: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 6, p. 750–758, 2013.
- SIVASAKTHIVEL, T.; REDDY, KSK. Ozone layer depletion and its effects: a review. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 2, n. 1, 2011.
- SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal Production for Biomass and High-Value Products**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016.
- SLOMINSKI, A. T.; ZMIJEWSKI, M. A.; SKOBOWIAT, C.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, R. M.; STEKETEE, J. D. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**, v. 212, p. 1-115, 2012.
- SOMCHIT, M. N.; MOHAMED, N. A.; AHMAD, Z.; ZAKARIA, Z. A.; SHAMSUDDIN, L.; OMAR-FAUZEE, M. S.; KADIR, A. A. Anti-inflammatory and anti-pyretic properties of *Spirulina platensis* and *Spirulina lonar*: a comparative study. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1277-80, 2014.
- SONG, J-L.; GAO, Y. Protective Effects of *Lindera coreana* on UVB-induced oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 4, p. 1369–1378, 2014.
- SOTIROUDIS, T. G.; SOTIROUDIS, G. T. Health aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*) microalga food supplement. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 3, p. 395–405, 2013.
- SOUZA, C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants *Spirulina* and *dimethylmethoxy chromanol* on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, p. 52-64, 2017.
- STAHL, W; SIES, H. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 1179S-84S, 2012.
- SVOBODOVA, A; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 150, p. 25-38, 2006.
- SYED, D. N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 1184–1190, 2012.
- SZYSZKOWSKA, B.; ĹEPECKA-KLUSEK, C.; KOZŁOWICZ, K.; JAZIENICKA, I.; KRASOWSKA, D. The influence of selected ingredients of dietary supplements on skin condition. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 31, n. 3, p. 174–181, 2014.

SWALWELL, H.; LATIMER, J.; HAYWOOD, R. M.; BIRCH-MACHIN, M. A. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 626–634, 2012.

TAEYMANS, J.; CLARYS, P.; BAREL, A. O. **Use of Food Supplements as Nutricosmetics in Health and Fitness**. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. (Eds). *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 583–596. 2014.

TAIEB, A.; CARIO-ANDRE, M.; BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Inhibitors and enhancers of melanogenesis. In: BOROVIANSKY J.; RILEY P. A. **Melanins and Melanosomes**. Wiley-Blackwell: Weinheim, Germany, p. 117–166, 2011.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TELANG, P. S. Vitamin C in dermatology. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 2, p. 143–146, 2013.

THOMAS, N. V.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. K. Potential matrix metalloproteinase inhibitors from edible marine algae: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1090– 1100, 2014.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 27, p. 1-11, 2009.

TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R.; RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemistry Photobiology**, v. 69, p. 694–699, 1999.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.

ULMANN, L.; RODEAU, J. L.; DANOUX, L.; CONTET-AUDONNEAU, J. L.; PAULY, G.; SCHLICHTER, R. Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 113–125, 2007.

VALACCHI, G.; PECORELLI, A.; MENCARELLI, M.; MAIOLI, E.; DAVIS, P. A. Beta-carotene prevents ozone-induced proinflammatory markers in murine skin. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 4-5, p. 241-247, 2009.

VARANI, J.; WARNER, R. L, GHARAEI-KERMANI, M.; PHAN, S. H.; KANG, S.; CHUNG, J. H.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 480-6, 2000.

VOLINSKY, R.; KINNUNEN, P. K. J. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. **FEBS Journal**, v. 280, n. 12, p. 2806–2816, 2013.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n.3, p. 349-374, 2000.

WANG, H. M.; CHEN, C. C.; HUYNH, P.; CHANG, J. S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 355-62, 2015.

WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 215-37, 2006.

WOLLENBERG, A.; KRAFT, S.; HANAU, D.; BIEBER, T. Immunomorphologic and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, n.3, p. 446-453, 1996.

WU, L. C.; LIN, Y. Y.; YANG, S.Y; WENG, Y. T.; TSAI, Y. T. Antimelanogenic effect of c-phycoyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2011.

WU, M.; HEMESATH, T.J.; TAKEMOTO, C.M.; HORSTMANN, M. A.; WELLS, A. G.; PRICE, E. R.; FISHER, D. Z.; FISHER, D. E. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. **Genes & Development**, v. 14, n. 3, p. 301-312, 2000.

WU, S.; GAO, J.; DINH, Q. T.; CHEN, C.; FIMMEL, S. IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2288- 2296, 2008.

WUANG, S. C.; KHIN, M. C.; CHUA, P. Q. D.; LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59-64, 2016.

YOGIANTI, F.; KUNISADA, M.; NAKANO, E.; ONO, R.; SAKUMI, K.; OKA, S.; NAKABEPPU, Y.; NISHIGORI, C. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 10, p. 2610-9, 2014.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, 2016.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHOU, Z. P.; LIU, L. N.; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; CHEN, M.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. Factors that effect antioxidant activity of C-phycoyanins from *Spirulina platensis*.

Journal of Food Biochemistry, v. 29, p. 313–322, 2005.

ZILINSKAS, B. A.; GREENWALD, L. S. Phycobilisome structure and function. **Photosynthesis Research**, v. 35, n. 10, p. 7–35, 1986.

ZINGG, J. M. Modulation of signal transduction by vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 481-506, 2007.

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

CAPÍTULO VII

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

1. Investigar a capacidade antioxidante total de células HaCaT irradiadas com UVA ou com tratamento combinado (irradiação + extrato de C-ficocianina).
2. Avaliar o dano ao DNA, induzido por UVA, em células HaCaT irradiadas com UVA ou com tratamento combinado (irradiação + extrato de C-ficocianina).
3. Analisar, através de microscopia confocal, se a C-ficocianina atravessa a membrana celular de células HaCaT.
4. Avaliar o efeito protetor do extrato de C-ficocianina em células HaCaT expostas à UVB.
5. Avaliar o efeito protetor do extrato de C-ficocianina em linhagem celular de fibroblastos humano.
6. Estimar a bioacessibilidade do extrato de C-ficocianina após a execução de teste de digestão in vitro.