



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

SUSANE LOPES

**PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE CASCAS DE BANANA
(*Musa* sp., CV. PRATA ANÃ) E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS SEUS
EFEITOS SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E
FOTOPROTEÇÃO À RADIAÇÃO UVB**

FLORIANÓPOLIS

2019

Susane Lopes

**PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE CASCAS DE BANANA
(*Musa sp.*, CV. PRATA ANÃ) E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS SEUS
EFEITOS SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E
FOTOPROTEÇÃO À RADIAÇÃO UVB**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e
do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Susane

Perfil químico do extrato aquoso de cascas de banana (Musa sp., cv. Prata Anã) e avaliação in vitro dos seus efeitos sobre a cicatrização de lesões cutâneas e fotoproteção à radiação UVB / Susane Lopes ; orientador, Marcelo Maraschin, 2019.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Cascas de banana. 3. Compostos fenólicos. 4. Cicatrização cutânea. 5. Fotoproteção à radiação UVB. I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Susane Lopes

Perfil químico do extrato aquoso de cascas de banana (*Musa* sp., cv. Prata Anã) e avaliação *in vitro* dos seus efeitos sobre a cicatrização de lesões cutâneas e fotoproteção à radiação UVB

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Paulo Fernando Dias, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Letícia Mazzarino, Dra.
NanoScoping Soluções em Nanotecnologia Ltda.

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof. Dr. Geison Souza Izídio
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Orientador

Florianópolis, 2 de agosto de 2019.

Este trabalho é dedicado à minha família por todo amor, fé e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Hoje não quero pedir, meu Deus, apenas agradecer por todas as bênçãos, pois todos os dias me dáis mais do que eu mereço. Por tudo que já superei e alcancei na vida, por todas as pessoas maravilhosas que colocastes no meu caminho, eu Te agradeço.

À minha família, pelo amor infinito, pela fé diária, pelo apoio em todas as minhas escolhas. Agradeço pela educação e pelos valores dos quais herdei. Amo vocês!

Ao meu professor orientador, Marcelo Maraschin, por aceitar fazer parte deste processo tão importante de aperfeiçoamento profissional e pessoal. Um exemplo de serenidade, humildade e generosidade.

A todos os mestres que tive a honra de conhecer; que não só ensinam, mas inspiram e fazem realmente a diferença na educação deste país.

À minha segunda família, meus amigos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, pelo acolhimento, compreensão, carinho, suporte técnico e apoio, que foram fundamentais para a superação de várias fases do desenvolvimento deste trabalho. Um carinho especial a Deise, Eduardo, Thais e Letícia. Estendo os meus agradecimentos ao meu chefe imediato, professor André Pasa, por toda compreensão e apoio.

À minha estagiária Giulia Galani, por todo amor dedicado a este projeto. Pela sua paciência, disposição e alegria incondicional. Você foi a melhor companhia e estagiária que eu poderia ter. Muito obrigada por me proporcionar ensinar e aprender.

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho, amor e paciência. Muito obrigada por ser esse exemplo de generosidade e determinação.

À Mayla, pelo amor absoluto e pela companhia.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, vocês são sensacionais! Um carinho especial e toda minha gratidão a Daniela Sousa Coelho, Elizandra Buzarello, Rodolfo Moresco, Ana Voytena, Fernanda Ramlov e Bianca Coelho.

As minhas amigas queridas, Bruna Oliveira, Priscila Natasha Kinas e Naira Schneider por me manterem salva, porém não tão sã! Nai, gratidão sem prazo de validade a você pelo apoio científico, fundamental para o enriquecimento desta tese.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programada de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, por serem o palco do meu processo de ensino-aprendizagem.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, por todo apoio e incentivo.

À EPAGRI, em especial ao Luiz Augusto Martins Peruch, pelo apoio e parceria.
À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Na vida não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.

(Marie Curie)

RESUMO

A banana (*Musa* sp.) é mundialmente reconhecida como uma fruta importante devido à sua produção global e pelas suas aplicações nutraceuticas. Além disso, vem sendo explorada na comunidade científica pelas suas propriedades cicatrizantes reconhecidas na medicina tradicional brasileira, por conta da sua composição rica em compostos bioativos. A sua casca é considerada uma biomassa de baixo valor econômico e representa um problema à indústria devido à grande quantidade gerada. Este subproduto possui quantidades interessantes de compostos fenólicos que podem ser recuperados e utilizados como matéria-prima em produtos farmacêuticos e cosméticos relacionados à terapêutica da pele. Assim, com o intuito de destinar este subproduto às indústrias de saúde ou cosméticos, este estudo avaliou o extrato aquoso (EA) de cascas de bananas (*Musa* sp., cv. Prata Anã) como fonte de compostos fenólicos bioativos e suas atividades biológicas. Para tanto, amostras de cascas de banana foram quimicamente avaliadas ao longo do ano para identificar o melhor tempo de colheita dessas biomassas quanto à sua composição fenólica. Nesse sentido, ensaios analíticos foram realizados e relacionados aos dados climáticos para elaboração de modelos quimiométricos, suportados por ferramentas de bioinformática. Além disso, o EA foi avaliado com relação às suas propriedades cicatrizantes e fotoprotetoras contra danos causados pela radiação ultravioleta-B, em modelos *in vitro*. As amostras coletadas no inverno demonstram ser promissoras para futuros estudos biológicos, devido às suas composição fenólica e atividade antioxidante, conforme análise quimiométrica. Assim, a amostra de cascas de banana coletada em junho foi selecionada em função de seu perfil fitoquímico e seu EA usado nos tratamentos para avaliação de atividades biológicas com fibroblastos 3T3. O EA apresentou baixa citotoxicidade e promoveu a proliferação e a migração celular, além de aumentar a síntese de colágeno. Adicionalmente, mostrou efeito positivo na fotoproteção de fibroblastos expostos à radiação UVB, influenciando na manutenção de morfologia celular e nuclear. Apesar do EA não inibir a diminuição da viabilidade celular, ele estimulou a manutenção da síntese de colágeno. O extrato aquoso obtido de cascas de banana é um candidato à formulações de produtos farmacêuticos/cosméticos para estimular a cicatrização da pele e o combate ao fotoenvelhecimento causado pela radiação UVB.

Palavras-chave: Banana. *Musa* sp. Cascas. Compostos Fenólicos. Antioxidantes. Quimiometria. Cicatrização Cutânea. Fotoproteção. Radiação. UVB. Fotoenvelhecimento.

ABSTRACT

Banana (*Musa* sp.) is globally recognized as an important fruit due to its global production and nutraceutical applications. In addition, it has been investigated by the scientific community for its healing property recognized in traditional Brazilian medicine, due to its composition rich in bioactive compounds. Its peel is considered a biomass of low economic value and represents a major problem for the industry because of the large amount produced. This byproduct has interesting amounts of phenolic compounds which can be recovered and used in pharmaceutical and cosmetic products related to skin therapy. Thus, this study aimed to evaluate the aqueous extract (AE) of banana peels (*Musa* sp., cv. Prata Anã) as a source of bioactive phenolic compounds, aiming its usage by the health and cosmetic industries in therapies related to the skin. For this purpose, the banana peels samples were chemically investigated throughout the year to identify the best harvest time of this biomass as to its phenolic composition. In this sense, analytical tests were performed and related to the climatic data for obtaining chemometric models supported by bioinformatics tools. In addition, AE was evaluated for its scarring and photoprotective properties against damage caused by ultraviolet-B radiation in cell culture models. Samples collected in the winter showed to be promise for future biological studies, due to their phenolic profiles and antioxidant activity, according to chemometric analysis. The sample collected in June sample was selected because of its phytochemical traits and its AE was used for evaluation of biological activity in 3T3 fibroblasts. AE revealed low cytotoxicity and promoted cell proliferation and migration, as well as increased collagen synthesis. Additionally, AE showed a positive effect on the photoprotection of fibroblasts exposed to UVB radiation, contributing to the maintenance of cellular and nuclear morphologies. Although AE did not inhibit the decrease in cell viability, it preserved the collagen biosynthesis. The AE from banana peels is a candidate for pharmaceutical/cosmetic formulations to stimulate skin healing and combat photoaging caused by UVB radiation.

Keywords: Banana. *Musa* sp. Peels. Phenolic Compounds. Antioxidants. Chemometrics. Wound Healing. Photoprotection. Radiation. UVB. Photoaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhes da planta (a) e do cacho (b) da cultivar Prata Anã.	21
Figura 2 - (A) Representação esquemática da pele humana. (B) Micrografia histológica de corte de pele - coloração hematoxilina e eosina (400 ×).....	25
Figura 3 - Perfil espectral de varredura ($\lambda = 200 - 800$ nm) representativo do extrato aquoso de cascas de banana. Seta indica pico na região de absorção dos compostos fenólicos (~280 nm).	41
Figura 4 - Conteúdo médio de compostos fenólicos totais (CFT mg EAG/g) dos EA, para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.	42
Figura 5 - Conteúdo médio de flavonoides totais (FT mg EQ/g) dos EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.	44
Figura 6 - Perfil cromatográfico (FR-CLAE-DAD, $\lambda = 280$ nm) representativo do EA de cascas de banana. A seta vermelha identifica o pico relativo ao composto majoritário, ácido gálico.	45
Figura 7 - Conteúdos médios de ácido gálico (mg AG/g) (FR-CLAE-DAD, $\lambda = 280$ nm) em EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.	46
Figura 8 - Sequestro do radical DPPH (%) pelos EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.	47
Figura 9 - Distribuição de pontos amostrais (amostra/mês) da variável compostos fenólicos totais (mg GAEq/g) vs. temperatura mínima ($^{\circ}$ C), consoante ao modelo de regressão linear ($r^2 = 0,702$).	54

Figura 10 - Correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas e climáticas. A correlação entre as variáveis é mais intensa na cor azul (correlação negativa), diminuindo em vermelho (correlação positiva).....	55
Figura 11 - Perfis espectrais de UV-vis ($\lambda = 200 - 800$ nm) de 12 amostras de extratos aquosos de cascas de banana, cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.	56
Figura 12 - Escores de dispersão dos dados espectrais UV-vis ($\lambda = 200 - 800$ nm) nos eixos PC1 e PC2 de amostras (n = 108) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016. Cada conjunto de pontos envolvidos por uma elipse da mesma coloração representa uma estação.....	57
Figura 13 - Dendograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) das absorvâncias UV-vis ($\lambda = 200 - 800$ nm) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.	58
Figura 14 - Escores de dispersão dos dados espectrais UV-vis ($\lambda = 280 - 320$ nm) nos eixos PC1 e PC2 de amostras (n = 108) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016. Cada conjunto de pontos envolvidos por uma elipse da mesma coloração representa uma estação.....	59
Figura 15 - Dendograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) das absorvâncias UV-vis ($\lambda = 280 - 320$ nm) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.	60
Figura 16 - Linhagem celular de fibroblastos BALB/3T3 clone A31 sob cultivo em meio DMEM (200 \times). Escala = 100 μ m.	65
Figura 17 - Efeito do EA (0,1 – 1000 μ g/mL) de cascas de banana (amostra - junho de 2015) sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 h de tratamento, consoante aos métodos colorimétricos utilizados, MTT e o VN. Os resultados são expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. * indica $p < 0,05$, *** indica $p < 0,001$	71
Figura 18 - Proliferação de fibroblastos 3T3 após tratamentos com EA (0,1 – 100 μ g/mL) durante 24 h através da técnica de imunofluorescência, utilizando-se <i>click</i> EdU como marcador. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....	73
Figura 19 - Micrografias representativas (400 \times) da imunofluorescência após marcação com EdU e DAPI para avaliação da proliferação celular de fibroblastos 3T3, após 24 h de	

exposição aos tratamentos com EA (0,1 – 100 µg/mL). Núcleos azuis: núcleos totais marcadas com DAPI. Núcleos verdes: núcleos positivos para EdU (células em proliferação). *Merge* representa a sobreposição dos filtros para DAPI e EdU. Escala: barra = 50 µm. 74

Figura 20 - Oclusão (%) da área correspondente à migração de fibroblastos 3T3 após a indução da solução de continuidade à monocamada celular e adição dos tratamentos com EA (0,1 – 100 µg/mL), por 24 h. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. 76

Figura 21 - Micrografias representativas do ensaio de migração celular (*scratch assay*) de fibroblastos 3T3 expostos à diferentes concentrações do EA (0,1 – 100 µg/mL), nos tempos 0 h e 24 h após a indução da solução de continuidade à monocamada celular (250 ×). Escala: barra = 100 µm. Setas indicam células fusiformes, característica que sugere o processo migratório. 77

Figura 22 - Incremento na síntese de colágeno avaliado com o corante *Sirius red* por fibroblastos 3T3 após tratamentos com EA (0,1 – 100 µg/mL) por 72 h. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. 79

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade pela viabilidade de fibroblastos 3T3 expostos ao EA (0,1 – 100 µg/mL) nos tempos de incubação de 1, 12 e 24 h, através do método MTT. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo * = $p < 0,0001$ demonstra diferença estatística entre o tratamento e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. Letra **a** significa diferença estatística entre os grupos tratados de 100 µg/mL. 89

Figura 24 - Efeito dose-resposta de irradiação UVB sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, determinado via ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolo # corresponde à diferença estatística ($p < 0,001$) entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. Colunas brancas representam os grupos celulares que não foram irradiados (controle) para cada dose de radiação. Colunas pretas representam os grupos irradiados com doses crescentes de radiação UVB. 90

Figura 25 - Efeito dose-resposta de irradiação UVB sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, determinado via ensaio de citotoxicidade. (A) Pré-tratamento: as células foram tratadas por 1

h com EA (0,1 – 100 µg/mL) e posteriormente irradiados com UVB (160 mJ/cm²). (B) Pós-tratamento: as células foram irradiados com UVB (160 mJ/cm²) e posteriormente tratados por 1 h com EA (0,1 – 100 µg/mL). Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolo # corresponde à diferença estatística ($p < 0,001$) entre o controle positivo e os demais grupos por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. 91

Figura 26 - Incremento na síntese de colágeno por fibroblastos 3T3, avaliado com o corante *Sirius red*, após tratamentos com radiação UVB (160 mJ/cm²) e tratamento por 72 h com o EA (0,1 – 100 µg/mL). Cada coluna representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os símbolos representam diferença estatística entre o controle positivo e os demais grupos, # = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$ por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. 93

Figura 27 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 µg/mL) por 1 h e irradiadas com UVB (160 mJ/cm²). Núcleos de fibroblastos 3T3 marcados com DAPI para detectar a morfologia nuclear. Setas brancas indicam núcleos normais (N). Setas amarelas indicam núcleos irregulares (I). Setas vermelhas indicam núcleos grandes e regulares (LR) (630 ×), escala: barra = 25 µm. 94

Figura 28 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 µg/mL) por 1 h e irradiadas com UVB (160 mJ/cm²). Dados apresentados como um gráfico do Índice de Irregularidade de Área versus Nuclear (NII), que separa os núcleos considerando seus fenótipos morfométricos. As letras vermelhas representam núcleos normais (N), grandes e regulares (LR), grandes e irregulares (LI), mitóticos (S) pequenos e regulares (SR) e irregulares (I). 95

Figura 29 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 µg/mL) por 1 h e irradiadas com UVB (160 mJ/cm²). Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle negativo (CN) por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. 96

Figura 30 - Análise morfológica celular. Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 µg/mL) por 1 h e irradiados com UVB (160 mJ/cm²) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (1000 e 2000 ×). Setas brancas indicam formação de filopódios. Símbolos * indicam formação de lamelipódios. 98

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sistema de gradiente de fase móvel (FR-CLAE-DAD) utilizado para a separação de compostos fenólicos das amostras dos EA de cascas de banana. Gradiente linear de H₂O acidificada com 0,1% de TFA (fase A) e ACN (fase B), em fluxo de 1 mL/min. 38
- Tabela 2** - Dados climáticos coletados na Estação Experimental de Urussanga da EPAGRI (Urussanga/SC, latitude: 28°31'04'', longitude: 49°19'15''). Os dados são referentes as médias obtidas em cada mês de coleta das amostras de bananas. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN – Acetonitrila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
- CFT – Compostos Fenólicos Totais
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CN – Controle Negativo
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CP – Controle Positivo
- CPD – Cumulative Population Doubling (Duplicação Populacionais Cumulativas)
- DAPI – 4'-6-diamino-2-fenilindol
- DMEM – Dulbecco'S Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DPPA – 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil
- EA – Extrato Aquoso
- EAs – Extratos Aquosos
- EBA – Extrato Bruto Aquoso
- EAG – Equivalentes de Ácido Gálico
- EdU – 5-etinil-2'-desoxiuridina
- EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- EQ – Equivalentes de Quercetina
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- FT – Flavonoides Totais
- HCA – Hierarchical Cluster Analysis (Análise de Agrupamento Hierárquico)
- HMDS – Hexametildisilazano
- LI – Grandes e Irregulares
- LMBV – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
- LR – Grandes e Regulares
- MMP – Metaloproteinases de Matriz
- MMP-1 – Metaloproteinases de Matriz-1
- MMP-9 – Metaloproteinases de Matriz-9

MTT – 3-(4, 5 dimetil tiazole-2il)-2, 5 difeetil tetrazóliobrometo

N – Normal

NII – Índice de Irregularidade Nuclear

NMA – do inglês, Análise Morfométrica Nuclear

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

PCA – Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

PFA – Paraformaldeído

RL – Radicais Livres

S – Mitóticos

SFB – Soro Fetal Bovino

SR – Pequenos e Regulares

TFA – Ácido Trifluoracético

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta-A

UVB – Ultravioleta-B

UVC – Ultravioleta-C

VN – Vermelho Neutro

LISTA DE SÍMBOLOS

λ - Comprimento de onda

\varnothing - Diâmetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 BANANA	17
2.1.1 Classificação taxonômica	17
2.1.2 Origem e distribuição	19
2.1.3 Importância econômica	20
2.1.4 A casca como um subproduto	22
2.1.5 Banana como fonte de compostos biativos para a proteção da saúde	22
2.2 PELE	24
2.2.1 Cicatrização de lesões cutâneas e os compostos naturais.....	25
2.3 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	28
2.3.1 Incidência de câncer de pele.....	28
2.3.2 Danos causados pela radiação ultravioleta.....	29
2.3.3 Compostos naturais como agentes fotoprotetores.....	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO I	33
Avaliação do perfil químico do extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (<i>Musa</i> sp.)	34
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 MATÉRIA-PRIMA.....	35
2.1.1 Identificação botânica e local do cultivo das bananas.....	35
2.1.2 Processamento do material vegetal.....	35
2.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS.....	36
2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATOS AQUOSO	36
2.3.1 Avaliação por espectrofotometria de varredura UV-visível.....	36

2.3.2	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	36
2.3.3	Quantificação de flavonoides totais	37
2.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiencia (FR-CLAE-UV-visível)	37
2.3.5	Determinação da atividade antioxidante	38
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO	39
3.1.1	Perfil espectrofotométrico UV-visível.....	40
3.1.2	Teores de compostos fenólicos totais (CFT)	42
3.1.3	Teores de flavonoides totais (FT).....	43
3.1.4	Análise dos perfis cromatográficos	45
3.1.5	Avaliação da atividade antioxidante.....	47
4	CONCLUSÃO	49
CAPÍTULO II.....		50
Espectrofotometria UV-Vis e quimiometria como ferramentas para reconhecimento dos perfis bioquímicos de extratos aquosos de cascas de bananas (<i>Musa</i> sp.) de acordo com a sazonalidade		51
1	INTRODUÇÃO.....	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	52
2.2	DADOS CLIMÁTICOS.....	52
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4	CONCLUSÃO.....	61
CAPÍTULO III.....		62
1	INTRODUÇÃO.....	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	CULTURA DE CÉLULAS	64
2.2	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR.....	65

2.2.1 Método MTT	65
2.2.2 Método do corante vermelho neutro	66
2.3 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	66
2.4 DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	67
2.5 DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO.....	68
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR PELOS MÉTODOS DO MTT E DO VERMELHO NEUTRO.....	69
3.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	72
3.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	75
3.4 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO.....	78
4 CONCLUSÃO.....	81
CAPÍTULO IV.....	82
Estudo do efeito fotoprotetor do extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (<i>Musa</i> sp.) em fibroblastos expostos à radiação ultravioleta-B	83
1 INTRODUÇÃO.....	83
2 MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO EA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	84
2.2 IRRADIAÇÃO UVB	85
2.3 DETERMINAÇÃO DO EFEITO FOTOCITOPROTETOR	85
2.4 DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO.....	86
2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR.....	87
2.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	87
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
3.1 EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	88
3.2 IRRADIAÇÃO UVB	89

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOCITOPROTETOR.....	91
3.4 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO.....	92
3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR.....	93
3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	97
4 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE A – Publicação.....	114

1 INTRODUÇÃO

Diferentes culturas, através do conhecimento empírico na prática da medicina tradicional, contribuíram ao longo da história da humanidade para o desenvolvimento de estratégias medicamentosas à proteção de doenças.

A extração de produtos naturais tem sido usada provavelmente desde a descoberta do fogo. Egípcios, fenícios, índios, chineses, gregos e romanos, e até mesmo os maias e astecas, possuíam processos de extração eficientes (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012). Assim, as investigações etnofarmacológicas de medicamentos tradicionais trouxeram contribuições significativas para o avanço da farmacologia moderna (LEONTI et al., 2017).

Dentre as diversas aplicações dos produtos naturais, como os polifenóis, menciona-se o desenvolvimento de cosméticos. Estes produtos representam o maior investimento em pesquisa envolvendo matérias-primas naturais, especialmente no Brasil, onde a disseminação de cosméticos orgânicos no país está relacionada às políticas de sustentabilidade que promovam integridade ambiental através da prática do uso de matérias-primas não extrativistas (DE PAULA PEREIRA; DOURADO, 2017).

Os polifenóis são componentes naturais encontrados em uma diversidade de plantas. Eles apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomodulatórias. São explorados como agentes quimiopreventivos em diversas doenças de pele, além de apresentarem eficácia no combate à inflamação, estresse oxidativo, danos ao DNA e supressão da resposta imune induzidos pela radiação UV (BALOGH; PEDRIALI; KANEKO, 2011).

Face ao exposto, o grupo de pesquisa, no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, busca avaliar os efeitos de compostos bioativos derivados de subprodutos, i.e., cascas de bananas, em diferentes modelos biológicos, com vistas ao desenvolvimento de novas formulações às indústrias cosmética e farmacêutica.

O presente trabalho apresenta uma proposta de uso da biomassa de cascas de banana geradas pela indústria de processamento daquele fruto. Como estratégia, será investigado o perfil químico do extrato aquoso derivado de cascas de banana e seu efeito em mecanismos relacionados ao processo de cicatrização cutânea e o efeito fotoprotetor em fibroblastos expostos à radiação ultravioleta-B, em modelos *in vitro*.

Após a revisão bibliográfica, o trabalho é organizado em quatro capítulos. O primeiro apresenta o estudo referente à investigação do perfil químico de extratos aquosos de

cascas de banana (*Musa* sp., cv. Prata Anã). São expostos resultados referentes a estudos por espectrofotometria UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência e atividade antioxidante.

No segundo capítulo, investigou-se a influência das variáveis climáticas e sua relação com a biossíntese de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em amostras de extratos aquosos obtidos de cascas de banana coletadas ao longo das estações, através da aplicação de técnicas estatísticas multivariadas, apoiadas por *scripts* utilizando a linguagem R.

No terceiro e quarto capítulo são apresentados resultados de estudos *in vitro* do efeito do extrato aquoso de cascas de banana em fibroblastos 3T3. No terceiro, foi avaliada sua influência em mecanismos celulares envolvidos no processo de cicatrização cutânea; enquanto que no quarto, o seu potencial fotoprotetor contra danos causados pela radiação UVB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BANANA

2.1.1 Classificação taxonômica

Bananas e plátanos (*Musa* spp.) são plantas monocotiledôneas do gênero *Musa* (família Musaceae, ordem Zingiberales). São ervas gigantes com, aproximadamente, 3 m de altura, sem lignificação ou espessamento secundário de caules, que é característico de árvores (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007).

As bananas e plátanos diferem de suas parentes silvestres por serem sem sementes e partenocárpicas - o fruto se desenvolve sem desenvolvimento de sementes ou polinização e fertilização. Não está bem estabelecido como as bananas silvestres se tornaram domesticadas, mas é possível que a maioria das cultivares sejam coleções silvestres feitas por agricultores de mutantes espontâneos com produção de frutos partenocárpicos, que foram trazidos para o cultivo e depois multiplicados e distribuídos pela propagação vegetativa (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007; DEJESUS et al., 2013). Não existe uma distinção botânica direta entre bananas e plátanos, mas, em geral, as bananas se referem às formas mais

doces que são comidas não cozidas, enquanto plátanos são frutas amiláceas que são descascadas com uma faca quando não maduras e depois cozidas. A família Musaceae inclui um segundo gênero, *Ensete* (falsas bananeiras), com a Banana Etíope, usada ocasionalmente como alimento na África Oriental (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007).

Linnaeus, em *Species Plantarum* (1753), foi o primeiro a atribuir nomenclatura científica às bananas, descrevendo *Musa paradisiaca* (com base em *Musa cliffortiana-Linnaeus*, 1736, 2007), estabelecendo ao mesmo tempo a moderna nomenclatura botânica, que ainda hoje é amplamente utilizada (HÄKKINEN, 2013). A taxonomia de *Musa* nunca foi totalmente resolvida e permanece em debate, principalmente por causa da reprodução vegetativa difundida e da ocorrência natural de muitos híbridos (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). A primeira classificação do gênero *Musa* L. foi a de Sagot (1887), que dividiu este gênero em três grupos sem nome (chamados de “seções”); depois J.F. Gmel. Baker (1893) adotou a divisão de Sagot quase inalterada definindo três subgêneros (HÄKKINEN, 2013). Em 1947, baseado no fenótipo da planta e no número de cromossomos, o gênero foi dividido em quatro seções como proposto por Cheesman: *Eumusa* ($x = 11$), *Rhodochlamys* ($x = 11$), *Callimusa* ($x = 10$) e *Australimusa* ($x = 10$) (BARTOŠ et al., 2005; VILELA et al., 2014). Posteriormente, em 1976, Argent criou uma seção separada, *Ingentimusa*, que continha apenas uma única espécie *M. ingens* ($x = 7$). Esta classificação foi questionada recentemente e vários reagrupamentos foram sugeridos. A genotipagem com vários tipos de marcadores de DNA confirmou a necessidade de revisão das seções de *Musa* (ČÍŽKOVÁ et al., 2015). Com base nas análises moleculares, as espécies de bananeiras silvestres foram reclassificadas em duas seções, *Musa* (fundindo *Eumusa* com *Rhodochlamys*) e *Callimusa* ($x = 9, 10$) com a inclusão de *Australimusa* e *Ingentimusa* (SHETTY et al., 2016).

São conhecidos 4 genomas A, B, S e T que correspondem às espécies *Musa acuminata*, *M. balbisiana*, *M. schizocarpa* e *M. textilis*, respectivamente. Estas quatro espécies são responsáveis pela geração de uma grande diversidade de cultivares híbridos diploides, triploides e tetraploides (SARDOS et al., 2016). As bananas disponíveis para consumo são diplóides ou triplóides correspondentes aos genomas A e B, ou são híbridos das duas espécies, resultando em grupos de classificação como AAA, AA, AB, AAB e ABB (SHIGA et al., 2017).

O inter cruzamento entre espécies e subespécies diplóides resultou no aparecimento de grupos triplóides com indivíduos estéreis, uma característica que foi selecionada durante a

domesticação das bananeiras, assim como partenocarpia e propagação vegetativa (CRESTE et al., 2004). No Brasil, quase toda a produção é destinada ao mercado local, o que favorece os frutos de cultivares de Prata e Maçã, ambos AAB (CRESTE et al., 2003).

2.1.2 Origem e distribuição

O registro mais antigo de cultivo de bananas é da Nova Guiné, cultivada por pelo menos 5000 e 4500 a.C. (HAMILTON; KARAMURA; KAKUDIDI, 2016). *Musa* spp. originou-se no sudeste da Ásia e no Pacífico Ocidental e foi introduzida na África nos tempos antigos e levado por exploradores europeus para as Américas e outras partes do mundo. Atualmente, bananas e plátanos são amplamente cultivados em regiões tropicais e subtropicais como importantes alimentos básicos e commodities em muitos países (DE JESUS et al., 2013). As variedades comerciais de banana são cultivadas principalmente por pequenos agricultores (MILLER et al., 2010). Elas compreendem cultivos muito importantes na África Subsariana, América do Sul e Central e grande parte da Ásia. Um genoma (designado A) de *Musa acuminata* Colla, nativa da Melanésia ocidental e sudeste da Ásia, e o outro (B) de *Musa balbisiana* Colla, nativa do sudeste da Ásia e da China. (HAMILTON; KARAMURA; KAKUDIDI, 2016) ambas com $2n = 22$ cromossomos, representam os dois principais progenitores das variedades de banana cultivada (CHEUNG; TOWN, 2007) que são derivadas de hibridações intra e interespecíficas. (VILELA et al., 2014). A maioria dos cultivos modernos contém combinações de genomas com vários níveis de ploidia, como diploides (AA; BB; ou AB; $2n = 2x = 22$); triploide (AAA; AAB; ou ABB; $2n = 3x = 33$); e tetraplóide (AAAA; AAAB; AABB; ou ABBB; $2n = 4x = 44$) (DE JESUS et al., 2013).

O número e a morfologia dos cromossomos descrevem um cariótipo, característica importante de uma espécie e no caso do gênero *Musa*, o número de cromossomos determina a classificação seccional das espécies individuais. Estudos citogenéticos mais detalhados são complicados, pelo tamanho pequeno dos cromossomos, pela sua semelhança morfológica e pela falta de pontos de referência específicos de cromossomos. Até o momento, a identificação de todos os cromossomos dentro do cariótipo não foi possível. Em 2011, foi estabelecida uma plataforma padronizada de genotipagem baseada em microssatélites para a caracterização molecular do germoplasma de *Musa*. A plataforma permite a discriminação

entre espécies individuais, subespécies e subgrupos de adesões de *Musa* e é adequada para caracterização de acessos desconhecidos (ČÍŽKOVÁ et al., 2015).

M. acuminata e *M. balbisiana* têm uma estrutura genômica altamente conservada, o que mostra que esses dois genomas divergiram relativamente recentemente (MAHENDHIRAN et al., 2014). Devido à dificuldade de reproduzir plantas inférteis, apenas algumas cultivares foram introduzidas nos últimos 50 anos. No entanto, o advento da propagação clonal, combinado com programas de seleção, levou ao destaque de clones de "elite" em termos de produtividade e qualidade dos frutos, adaptados às condições agroecológicas (VILELA et al., 2014).

Apesar de ser um importante alimento nos países em desenvolvimento em termos de valor de produção - após o arroz, trigo e milho - o melhoramento genético tem sido limitado (MILLER et al., 2010). A banana tem sido ameaçada por doenças, nematóides, e pragas virais e fúngicas. Apesar de sua enorme importância socioeconômica, a banana continua sendo uma cultura sub-pesquisada que, como os citros, está em considerável perigo devido à sua dependência da reprodução assexuada. Claramente, um maior conhecimento do genoma da banana é necessário para facilitar a criação de cultivares melhoradas (HŘIBOVÁ et al., 2007).

2.1.3 Importância econômica

A banana é considerada um alimento básico para milhões de pessoas e cultivada em mais de 130 países, em regiões tipicamente tropicais e subtropicais (SARDOS et al., 2016) como Índia, Uganda, Filipinas, China, Equador e Brasil, representando cerca de 60% da produção mundial (BRITO et al., 2017). A fruta é classificada como a quarta cultura alimentar mais importante após o arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) (SHETTY et al., 2016). A importância econômica da banana também está relacionada à sua sazonalidade, sendo uma das poucas frutas disponíveis ao longo de todo o ano (YUAN et al., 2017).

No Brasil, a produção de banana no ano de 2017 alcançou 6.675.100 milhões de toneladas, sendo os estados da Bahia, São Paulo e Santa Catarina os principais produtores nacionais (EMBRAPA, 2018). Estas produções ocorrem em todo o território nacional, entretanto, a região nordeste é a principal produtora deste fruto, responsável por 35% da produção (WEBER et al., 2017).

O estado de Santa Catarina é destaque no cenário nacional da produção de banana, ocupando o terceiro lugar entre os estados produtores. Recente levantamento da EPAGRI/Cepa, de 2015, indica uma produção total de 735.112 toneladas dos dois grupos varietais, o Cavendish e o Prata. A banana é a fruta de maior expressão em Santa Catarina, tanto em número de produtores, como em área ocupada e produção total, perdendo apenas em valor bruto da produção apurada, não só pelo maior valor unitário de outras frutas, mas pela grande informalidade ainda presente nas transações comerciais dentro da cadeia produtiva (LIVRAMENTO; NEGREIROS, 2017).

O cultivar Prata Anã surgiu no início do século 20 no sul de Santa Catarina, a partir de uma mutação da banana Branca. Apresenta porte médio (2,2 a 4,5 metros de altura). Seu cacho pesa entre 7 e 40 quilos, com média de 15 quilos. É uma excelente banana para o mercado interno brasileiro. É moderadamente suscetível à sigatoka amarela e ao mal do Panamá e suscetível à sigatoka negra (Figura 1) (LIVRAMENTO; NEGREIROS, 2017).

Figura 1 - Detalhes da planta (a) e do cacho (b) da cultivar Prata Anã.



Fonte: (a) EPAGRI, 2017; (b) CNA, 2017.

Nos últimos tempos, mais atenção tem sido dada à banana devido à sua importância econômica e nutricional (OMOLOLA; JIDEANI; KAPILA, 2015). Em todo o mundo, a importância da bananeira aumenta com suas diferentes aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia (QAMAR; SHAIKH, 2018) em outros processos relacionados à biotecnologia (EHIOWEMWENGUAN; EMOGHENE; INETIANBOR, 2014).

2.1.4 A casca como um subproduto

A casca é o principal subproduto da indústria de transformação de bananas, sendo responsável por aproximadamente 38% do peso total do fruto. Uma grande quantidade de cascas é gerada anualmente, sendo considerada como um resíduo com baixo valor econômico (VU; SCARLETT; VUONG, 2016). Geralmente, as cascas de bananas consumidas são usadas na alimentação animal, como adubo orgânico, ou simplesmente são descartadas (PEREIRA; MARASCHIN, 2015).

Os subprodutos do processamento de alimentos de plantas representam um grande problema para a indústria, mas também são fontes promissoras de compostos que podem ser usados devido às suas propriedades tecnológicas ou nutricionais favoráveis (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001). Os subprodutos industriais de alimentos são ricas fontes de ingredientes funcionais, como fibras, minerais e fitoquímicos, entre outros (MARTINS; PINHO; FERREIRA, 2017).

Diferentes aplicações são sugeridas para as cascas de banana de cunho biotecnológico como, por exemplo, a produção de álcool, metano, ração animal e adsorventes para purificação de água (HAPPI EMAGA et al., 2007). No entanto, estudos que destinem esta biomassa às indústrias farmacêutica e cosmética ainda são escassos.

2.1.5 Banana como fonte de compostos biativos para a proteção da saúde

Dados na literatura demonstram que todas as partes da banana são fontes de compostos bioativos para a proteção da saúde. A polpa da banana é considerada uma fonte rica em compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferol, beta-caroteno, fenólicos, dopamina e galocatequina (DARSINI et al., 2012; (SHIAN et al., 2012). Ademais, a polpa contém boas concentrações de minerais como K, Mg, Cu e Mn, além de fibras (WALL, 2006).

Nos vegetais, os compostos fitoquímicos são produtos naturais, conhecidos como metabólitos secundários, apresentando funções ecológicas importantes como proteção contra herbívoros e patógenos, ação alelopática, além de agir como atrativos para animais polinizadores (FERRERA et al., 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários e, em parte, são produzidos como resultado da interação da planta com o meio ambiente (RANDHIR; SHETTY;

SHETTY, 2002). Eles são encontrados com estruturas variadas, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, taninos e flavonoides (FERRERA et al., 2016). A casca da banana possui polifenóis com uma série de propriedades medicinais, em particular, à diminuição dos teores de espécies reativas de oxigênio (APRIASARI; SUHARTONO, 2014).

As plantas são uma das fontes mais importantes ao desenvolvimento de novos medicamentos e muitas apresentam moléculas biologicamente ativas ao tratamento de feridas. Em virtude disso, constantemente muitos pesquisadores buscam identificar substâncias bioativas em espécies vegetais. (TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013). A utilização de extratos vegetais como agentes antitumorais e em processo de cicatrização cutânea, por exemplo, tem sido alvo de estudos envolvendo usualmente a determinação do potencial antioxidante de compostos naturais, em virtude da ocorrência de processos celulares de natureza óxido-redutora de importância nas fisiopatologias (TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013; (ABERA, 2014). Em relação aos constituintes químicos da banana, na medicina popular, ela tem sido utilizada como uma alternativa terapêutica no tratamento de alguns tipos de lesões cutâneas (VON ATZINGEN et al., 2011). Na medicina local e tradicional brasileira, a casca de banana tem uma história de utilidade para promover a cicatrização de feridas, principalmente por queimaduras, quando usada topicamente. Cascas de bananas maduras podem ser usadas para fazer um cataplasma para feridas, que é enrolado em torno de uma lesão para reduzir a dor ou o inchaço. Como o interior da casca tem propriedades anti-sépticas, ela pode ser enrolada diretamente em torno de feridas ou cortes em uma emergência (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Adicionalmente, ela é requerida para tratar muitas doenças, como diarreia, lesões intestinais causadas por colite ulcerativa, diabetes, uremia e hipertensão (YOO et al., 2016).

Diversos trabalhos desenvolvidos nos últimos anos corroboram resultados significativos do uso de extratos provenientes de bananas utilizados em diversos modelos biológicos. O estudo de Phuaklee e colaboradores (2012) revelou que o conteúdo de fenólicos do extrato da casca de *Musa sapientum* diminui processos relacionados a eventos inflamatórios em culturas de macrófagos de ratos. Em um trabalho conduzido por Apriasari e seu grupo (2014), utilizando extratos derivados do caule de *Musa* sp., foram detectados teores importantes de compostos bioativos como o ácido ascórbico, beta-caroteno, licopeno, tanino, saponina e flavonóides com atividade antioxidante potente para a eliminação de radicais livres

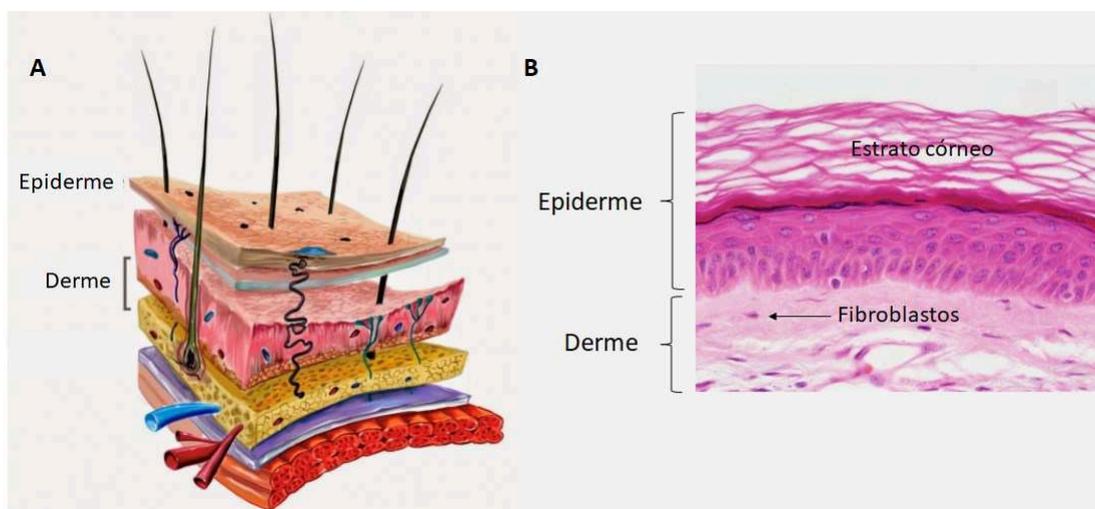
(RL). Além disso, foi observada atividade antioxidante e efeito protetor contra a hemólise oxidativa em eritrócitos expostos a extratos de cascas de *Musa paradisiaca* (SUNDARAM et al., 2011). De forma similar, o estudo de Yoo e colaboradores (2016) examinou a possibilidade de utilizar as folhas de *Musa sapientum* como matéria-prima cosmética. O extrato promoveu a expressão de procolágeno e inibiu a expressão de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos. Por sua vez, Von Atzingen e colaboradores (2011) demonstram um efeito positivo no processo de cicatrização, especialmente no reparo de lesões operatórias em ratos utilizando um gel da casca de *Musa sapientum*. Ademais, Suryono e seu grupo (2019) examinaram a efetividade da aplicação de um gel contendo extrato de casca de banana (*Musa paradisiaca* L.) como adjuvante na periodontite de ratos. Entre os resultados positivos da aplicação deste gel destaca-se, além do acréscimo na densidade de colágeno do ligamento periodontal, um aumento da angiogênese do osso alveolar.

Como descrito acima, muitas são as propriedades atribuídas aos compostos naturais da casca da banana, suas contribuições à saúde humana e seus múltiplos efeitos biológicos, principalmente aqueles relacionados às investigações de tratamento e cuidado da pele. As investigações encontradas na literatura remetem, geralmente, a estudos *in vivo*. Entretanto, são escassos os trabalhos que demonstrem a ação dos extratos de cascas de banana (*Musa* sp., cv Prata Anã) em mecanismos celulares dos diversos constituintes celulares encontrados na pele, como por exemplo, nos fibroblastos.

2.2 PELE

Com uma superfície média de cerca de 2 m², a pele é um dos maiores órgãos do corpo humano. Além de atuar como tecido de suporte, suas funções variam de um órgão multisensorial, termorregulador, hormonal e imunocompetente ao de uma barreira física e metabólica mais eficaz contra impactos exógenos e xenobióticos (RIEBEGIN; LUCH AND TRALAU, 2018). É constituída pelo estrato córneo como a camada mais externa da epiderme, compreendendo as células cornificadas que são cercadas por uma matriz lipídica. A epiderme é composta de epitélio escamoso estratificado que serve de barreira à infecção e também contra fatores externos mecânicos, químicos e de radiação. O estrato mais profundo, a derme, encontra-se abaixo da epiderme. É constituída por tecido conjuntivo que amortece o corpo de tensões, onde anexos como glândulas sudoríparas e folículos capilares estão localizados (Figura 2) (FRANZEN; WINDBERGS, 2015; LOPES et al., 2017a).

Figura 2 - (A) Representação esquemática da pele humana. (B) Micrografia histológica de corte de pele - coloração hematoxilina e eosina (400 ×).



Fonte: (A) ISIC, 2019, com modificações; (B) Laboratório de Histologia da UFSC, 2014.

A saúde da pele está associada com a atividade diária dos fibroblastos na derme. A principal função destas células é sintetizar proteínas estruturais, tais como colágeno, proteínas da matriz extracelular (MEC) e outras proteínas que dão suporte à integridade estrutural desse órgão e são associados com a pele mais jovem, firme, elástica e que é capaz de resistir e de se recuperar melhor quando lesionada (KHAN; WENDER; ALKON, 2017).

2.2.1 Cicatrização de lesões cutâneas e os compostos naturais

A pele está sujeita a diferentes tipos de danos, os quais podem estimular diversas vias metabólicas responsáveis pela sua restauração. Após a lesão, o objetivo da cicatrização de lesões cutâneas é restaurar a estrutura e a função de um tecido lesionado, buscando estabelecer as características anteriores ao ferimento (AGARWAL et al., 2009). Essa restauração pode ocorrer de duas formas: (1) regeneração, com a recomposição da integridade estrutural que inclui a atividade funcional do tecido ou, (2) cicatrização, com restabelecimento da homeostasia do tecido, porém com perda da sua atividade funcional pela formação de uma cicatriz fibrótica (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; THAKUR et al., 2011).

Todo o processo de cicatrização de lesões é uma série complexa de eventos que começa no momento da lesão (XU et al., 2013). Este processo pode ser dividido didaticamente em três fases que se sobrepõem: a inflamatória, a proliferativa e a

remodeladora. Essas três fases envolvem eventos complexos de interação célula-célula e célula-matriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; THAKUR et al., 2011).

No início da cicatrização, na fase inflamatória, a sinalização das células inflamatórias no local da ferida promove a migração de fibroblastos a partir das margens da lesão. Os fibroblastos secretam fatores parácrinos, que sinalizam aos queratinócitos adjacentes. Além disso, em resposta à sinalização parácrina de queratinócitos e células inflamatórias, os fibroblastos sintetizam o colágeno e promovem reticulação para formar uma matriz extracelular, seguido de diferenciação em um fenótipo miofibroblástico para facilitar o fechamento da lesão (WOJTOWICZ et al., 2014).

Na segunda fase do processo ocorre a migração e a proliferação celular, concomitantes à síntese de novos componentes da MEC, assim como o desenvolvimento de novos vasos e re-epitelização, sob estímulo de citocinas. À medida que os fibroblastos e outras células migram para o local da lesão, inicia-se a proliferação destas, formando o tecido de granulação (TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013). Fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos que iniciam o processo de deposição de colágeno III. Concomitantemente aos fenômenos descritos, há formação de novos vasos a partir dos vasos adjacentes à lesão (ISAAC et al., 2010).

A substituição do tecido danificado por células novas começa por um processo chamado de re-epitelização (TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013) que visa reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão. Para tanto, os estratos de queratinócitos devem ser renovados (ISAAC et al., 2010). As células proliferam e migram até ocorrer inibição por contato. A inibição da proliferação de queratinócitos parece ser necessária para o restabelecimento e total diferenciação da epiderme (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A migração pode exigir também a secreção de MMPs (metaloproteinases de matriz), que desempenham um importante papel na remodelação do tecido conjuntivo durante o processo de cicatrização. As MMPs fazem parte de um grupo de enzimas que, em conjunto, são capazes de degradar a maioria, se não todas, as moléculas da matriz extracelular, viabilizando a migração e a proliferação celular (FRANCO et al., 2009).

A terceira e última fase do processo de cicatrização é a de remodelação, em que ocorre mudança do colágeno III para o colágeno I, além da reorganização das fibras, de paralelas dispostas aleatoriamente, para fibras entrelaçadas e organizadas (ISAAC et al., 2010; TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013).

A fase final do processo de cicatrização é acompanhada pela eliminação de fibroblastos e macrófagos por apoptose. O crescimento de capilares e a atividade metabólica local diminuem, culminando em uma cicatriz com menor número de células e vasos sanguíneos (TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013).

Em condições fisiológicas, os RL, também denominados espécies reativas de oxigênio e nitrogênio encontram-se em concentrações baixas (PARIHAR et al., 2008). A fase inflamatória de um processo de cicatrização produz muitos RL que reagem com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana (BARREIROS; DAVID, 2006; ISAAC et al., 2010). As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem reagir diretamente com as proteínas, gerando dano oxidativo, danificando receptores celulares, enzimas e interferindo em vias de transdução de sinal, entre outras interferências. A peroxidação lipídica é, provavelmente, a maior consequência da ação deletéria das ERO, causando perturbações nas funções das membranas celulares e organelas (MARNETT, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Para combater os RL o organismo produz substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, os quais exercem seu papel como antioxidantes (ALVES et al., 2010). Quando os antioxidantes endógenos não conseguem reverter o dano oxidativo *per se*, antioxidantes exógenos podem ser apresentados como alternativa ao tratamento. Os compostos naturais apresentam um elevado potencial antioxidante no sistema biológico ao atuarem como neutralizadores destes RL gerados no organismo (SOARES, 2002). Neste contexto, alguns estudos demonstraram a diminuição desses RL e, conseqüentemente, a redução da atividade antioxidante endógena quando da exposição a compostos de origem vegetal em culturas *in vitro* (CALHELHA et al., 2014; TRABELSI et al., 2014; SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011). De acordo com dados epidemiológicos, as dietas ricas em frutas e vegetais podem reduzir a incidência de várias doenças crônicas que compartilham um componente inflamatório. Estes efeitos protetores são atribuídos, em parte, à ocorrência de produtos naturais com atividade antioxidante (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2014).

Atualmente, estima-se que cerca de 3% da população brasileira tem algum tipo de lesão cutânea. Em números absolutos, existem cerca de quatro milhões de pessoas com feridas crônicas ou complicações do processo de cura. Isso requer a busca de novos recursos e tecnologias que possam proporcionar um tratamento eficaz da ferida a baixo custo e mais

acessível à população brasileira (VON ATZINGEN et al., 2011). Neste contexto, vários produtos de origem vegetal têm sido utilizados no tratamento de lesões ao longo dos anos com o objetivo de promover a coagulação sanguínea, combater infecções e acelerar o processo de cicatrização (THAKUR et al., 2011). A importância dos compostos bioativos naturais levou ao desenvolvimento de um mercado em potencial em produtos farmacêuticos e os polifenóis são considerados como promissores candidados à defesa contra os RL (ZAWAWY, 2015), sobretudo, àqueles oriundos de cascas de banana.

2.3 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

O espectro de luz solar ultravioleta (UV) pode ser dividido em três segmentos com base em diferentes intervalos de comprimento de onda: UVC: 200 - 290 nm, UVB: 290 - 320 nm e UVA: 320 - 400 nm. Cada intervalo espectral tem uma penetração característica dos estratos epidérmicos e dérmicos da pele (CHAN et al., 2014). O UVC é completamente absorvido pela camada de ozônio e não afeta a pele. Embora o UVA seja mais abundante na luz solar do que o UVB (95% de UVA e 5% de UVB) e penetre mais profundamente na pele, a exposição ao UVB causa dano cutâneo mais grave em doses de irradiação semelhantes (BRAVO et al., 2017).

2.3.1 Incidência de câncer de pele

As radiações UVB e UVA produzem ERO nas células da pele, que causam danos ao DNA, levando a mutações gênicas e proliferação celular anormal (RYOO et al., 2001). Estas alterações podem ser causadas pela excessiva exposição aos raios solares, tendo como consequência o desenvolvimento de cânceres (CARBONELL et al., 2019)

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. É o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase. A estimativa proposta de acordo com um estudo do Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi de 6.260 novos casos no Brasil em 2018, sendo 2.920 homens e 3.340 mulheres (INCA, 2018).

Dentre os tumores de pele, o câncer de pele não melanoma é o mais frequente e de menor mortalidade, porém, se não tratado adequadamente pode deixar mutilações bastante

expressivas. Segundo dados do INCA, a estimativa para 2018 foi de 165.580 novos casos, sendo 85,170 homens e 80.140 mulheres (INCA, 2018b).

2.3.2 Danos causados pela radiação ultravioleta

A pele está localizada na camada mais externa do corpo e, portanto, é o órgão em que as mudanças relacionadas à idade em combinação com a influência dos raios ultravioleta (UV) tornam-se avançadas (YAMABA et al., 2016).

A exposição à radiação UV pode resultar em vários distúrbios patológicos cutâneos, incluindo eritema, imunossupressão, edema, queimaduras solares, hiperplasia, hiperpigmentação, câncer de pele e envelhecimento prematuro, também referido como fotoenvelhecimento (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016; HU et al., 2016).

O envelhecimento da pele é um processo progressivo, deletério multifatorial que afeta a aparência, estrutura, mecanismos e funções daquele órgão. Esses processos resultam da ação de fatores intrínsecos, caracterizados por pele lisa, seca, pálida e finamente enrugada, ou extrínsecos, que causam danos que induzem ao fotoenvelhecimento (BRAVO et al., 2017). O processo de envelhecimento intrínseco ou cronológico é uma consequência inevitável de mudanças fisiológicas e genéticas que ocorrem não apenas na pele, mas também em todos os outros órgãos devido à passagem do tempo. O envelhecimento extrínseco é causado por exposição cumulativa a estímulos externos, como radiação ultravioleta, toxinas ambientais e agentes infecciosos que induzem alterações de DNA e danificam a pele (CAVINATO; JANSEN-DÜRR, 2017).

O processo de fotoenvelhecimento ocorre devido, principalmente, a alterações do tecido conjuntivo, na derme, envolvendo mecanismos diferentes e bastante documentados (SILVA et al., 2013) como, por exemplo, a formação de ERO, que levam ao estresse oxidativo.

A radiação UV induz a formação de ERO tais como ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que em níveis elevados podem causar danos oxidativos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (PÉREZ-SÁNCHEZ et al. 2016; WEN et al. 2011). Estes eventos podem promover mutações genéticas, proliferação celular anormal e contribuir para diversas alterações morfológicas celulares (HU

et al., 2016). Além disso, o estresse oxidativo (EO) estimula receptores de superfície celular que levam a ativação de via de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), desencadeando apoptose mediada por mitocôndrias (SALUCCI et al., 2014). O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e induz o aumento de ERO (APRIASARI; SUHARTONO, 2014). As ERO podem ativar as defesas celulares via fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2*) e a expressão de enzimas de defesa antioxidantes endógenas (LEERACH et al., 2017).

Os fibroblastos é o principal componente celular da derme e desempenham um papel crítico no metabolismo das proteínas da matriz extracelular (MEC). Estas células apresentam uma morfologia tipicamente achatada ou extensível, que é determinante para sua função. A radiação UV provoca alterações quantitativas e qualitativas nos fibroblastos e em sua MEC, provocando desorganização e danificando fibrilas de colágeno (YAMABA et al., 2016). As ERO formadas pela radiação UV ativam vias MAPK que reduzem o colágeno dérmico através de dois caminhos: inibição da síntese do procolágeno e elevação da expressão das MMPs (HWANG et al., 2014).

As MMPs, como a colagenase (MMP-1), medeiam a degradação do colágeno tipo I e III e são a principal causa do dano do tecido conjuntivo que ocorre no fotoenvelhecimento (BRAVO et al., 2017; LEERACH et al., 2017). Desta forma, na presença de quantidades elevadas de ERO estas enzimas são produzidas em ritmo acelerado, resultando em uma degradação mais rápida da elastina e do colágeno, que são o principal fundamento da MEC (KARIM et al., 2014).

Os principais sistemas de proteção dos constituintes celulares da pele contra a radiação UV são melanina, proteína p53 e enzimas de defesa antioxidantes, i.e., catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase (HU et al., 2016). Os antioxidantes são produzidos naturalmente pelo organismo, ou podem ser providos através de alimentos e/ou suplementos (APRIASARI; SUHARTONO, 2014).

Nos últimos anos, a utilização de antioxidantes exógenos, como os compostos bioativos extraídos de fontes naturais, tem sido frequentemente relatada por suas possíveis aplicações na prevenção de danos causados pela exposição à radiação UV, aparentemente associada às suas capacidades antioxidantes. As moléculas com ação antioxidante, como os compostos fenólicos, tem sido alvo de estudos por prevenirem a formação de ERO, reduzindo os níveis de estresse oxidativo (YAKAEW et al., 2016).

2.3.3 Compostos naturais como agentes fotoprotetores

A fotoquimioproteção proveniente de produtos naturais representa uma estratégia importante na proteção da pele contra a radiação solar UV, especialmente UVB. Os produtos naturais são utilizados como agentes quimiopreventivos devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e seu potencial para modular mecanismos celulares de proliferação, transformação, migração e sobrevivência celular (OLTEANU et al., 2014).

A utilização de extratos vegetais tem sido alvo de estudos nos últimos anos envolvendo, usualmente, a determinação do potencial antioxidante. A literatura apresenta resultados relevantes no que concerne à fotoquimioproteção de extratos vegetais em processos deletérios promovidos pela radiação UV, tais como, a redução do fotoenvelhecimento, obtida com extratos de *Passiflora tarminiana* (BRAVO et al., 2017), efeitos anti-inflamatórios com *Aspalathus linearis* e *Cyclopia* spp. (MAGCWEBEBA et al., 2016), inibição de apoptose com extratos de *Calluna vulgaris* (OLTEANU et al., 2014), diminuição de danos no DNA com *Castanea sativa* (ALMEIDA et al., 2015), *Ligusticum chuanxiong* e *Cnidium officina* (JEONG et al., 2009) e redução dos níveis de estresse oxidativo com *Ixora parviflora* (WEN et al., 2011a), *Melissa officinalis* (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016) *Theobroma cacao* (KARIM et al., 2014) e *Terminalia chebula* (YAKAEW et al., 2016).

Assim, parece consenso que polifenóis derivados de produtos naturais podem prevenir a citotoxicidade induzida por UV, demonstrando a importância desses metabólitos e seu potencial de uso em terapias preventivas contra o fotoenvelhecimento (CHAN et al., 2014). Neste contexto, com relação aos constituintes químicos da banana, a fruta pode ser usada como fonte natural para obtenção de antioxidantes por seus conteúdos em carotenóides, compostos fenólicos e aminas biogênicas (PEREIRA; MARASCHIN, 2015) com potencial para serem explorados em processos de proteção a danos causados pela radiação UVB.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil químico de compostos bioativos de extratos de cascas de banana orgânica (*Musa* sp., cv. Prata Anã) e o seu efeito em mecanismos celulares relacionados à cicatrização de feridas e fotoproteção contra danos causados pela radiação UVB em fibroblastos de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo de metabólitos secundários dos extratos aquosos de cascas de bananas orgânicas coletadas ao longo das estações do ano;
- Caracterizar o perfil cromatográfico dos extratos aquosos;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos aquosos;
- Avaliar a influência de variáveis climáticas na biossíntese de compostos fenólicos e potencial antioxidante dos extratos aquosos;
- Analisar a citotoxicidade do extrato aquoso em fibroblastos 3T3;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso em mecanismos proliferativo e migratório em fibroblastos 3T3;
- Determinar o potencial de indução do extrato aquoso na síntese de colágeno em fibroblastos 3T3;
- Avaliar o potencial fotoprotetor do extrato aquoso através da viabilidade celular em fibroblastos 3T3 expostos à radiação ultravioleta-B;
- Avaliar o potencial do extrato aquoso na proteção da síntese de colágeno em fibroblastos 3T3 expostos à radiação ultravioleta-B;
- Analisar a influência do extrato aquoso na preservação/manutenção da morfologia nuclear e celular de fibroblastos 3T3 expostos à radiação ultravioleta-B.

CAPÍTULO I

No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade.

(Albert Einstein)

Avaliação do perfil químico do extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (*Musa sp.*)

1 INTRODUÇÃO

Bananas (*Musa spp.*) são consideradas como fonte de carboidratos, fibras, minerais e vitaminas (PASSO TSAMO et al., 2015; DEANGELIS-PEREIRA et al., 2016). Adicionalmente, esta fruta tem sido caracterizada como uma matriz rica em metabólitos secundários, i.e., compostos fenólicos, carotenoídeos, amins biogênicas e fitoesteróis, com muitos efeitos positivos relacionados à promoção da saúde humana (SINGH et al., 2016; PEREIRA; MARASCHIN, 2015).

Encontram-se estudos investigando as propriedades das bananas para realizar efeitos de proteção da saúde tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Os resultados sugerem que os compostos fenólicos desempenham um papel importante contra uma gama de distúrbios fisiológicos, i.e., câncer, diabetes, deficiências neurodegenerativas, distúrbios cardiovasculares, lesões gastrointestinais e danos ósseos (RODRÍGUEZ-MORATÓ et al., 2015). Estess benefícios resultam de suas diversas atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórios, regulação da expressão enzimática e quimioprotetores (MANOSROI et al., 2013).

A fruta da banana tem sido relatada como uma importante fonte de compostos fenólicos, sendo os flavonoides a principal forma. Estes compostos são os polifenóis mais abundantes nas dietas humanas e o grupo mais comum de polifenóis nas plantas também. Apresentam atividades anti-inflamatória, antitumoral e hepatoprotetora, além de forte capacidade antioxidante (DONG et al., 2016).

Carotenoides, vitaminas A e C são descritos como os antioxidantes mais abundantes na polpa e casca de banana,(TOH et al., 2016). Além disso, amins biogênicas, como dopamina, serotonina e a histamina foram detectadas na polpa de bananas e em suas cascas (ADÃO; GLÓRIA, 2005). A serotonina foi detectada em quantidades elevadas em *Musa spp.*, especialmente quando comparado a outras frutas e vegetais (ISLAM et al., 2016).

Dados na literatura indicam que a banana contém boas quantidades de fitoesteróis (SHENG et al., 2017). Os glicosídeos de esterilo, em particular o glucosido de sitosterol, merecem particular atenção devido às suas atividades farmacológicas, como as encontradas

em processos relacionados à hepatoproteção, efeito anti-inflamatório, antimutagênico e antitumoral (OLIVEIRA et al., 2008).

Afere-se que as quantidades de metabólitos secundários variam de acordo com os estágios de desenvolvimento do fruto e essa variação depende do genótipo analisado (EKESA et al., 2012). Há de se considerar que o clima, o cultivo e o manejo também afetem o perfil químico.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi de caracterizar o extrato aquoso de cascas de banana, cultivar Prata Anã (*Musa* sp.), disponibilizadas pela Estação Experimental de Urussanga (EPAGRI) em intervalos mensais de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016, oriundas de cultivos em sistema orgânico no município de Criciúma/Santa Catarina.

No presente estudo analisaram-se as 12 amostras por espectrofotometria UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e atividade antioxidante, visando determinar o perfil de metabólitos secundários.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

2.1.1 Identificação botânica e local do cultivo das bananas

Biomassas de cascas de bananas (*Musa* sp., subgrupo Prata, cultivar Prata Anã) foram gentilmente fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, estação experimental de Urussanga (EPAGRI), em intervalos mensais de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016, oriundas de cultivos em sistema orgânico no município de Criciúma/Santa Catarina.

2.1.2 Processamento do material vegetal

As amostras de frutos foram higienizadas em água corrente e secas com papel toalha. Em seguida, as cascas dos frutos foram retiradas manualmente e submetidas à secagem em

estufa (45°C), com fluxo de ar, até peso constante. A biomassa seca foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada a -20°C.

2.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção do extrato aquoso (EA), a 0,5 g de cascas de banana seca pulverizada foram adicionados 7,5 mL de água destilada. O conteúdo foi agitado (vórtex) por 1 min e incubado em banho-maria (37°C, 30 min), seguido de centrifugação (2 × 4000 rpm, 15 min) e recuperação do sobrenadante, i.e., EA (PEREIRA, 2014).

2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATOS AQUOSO

2.3.1 Avaliação por espectrofotometria de varredura UV-visível

O perfil espectral UV-visível das amostras de extratos de cascas de banana orgânica foi determinado a partir de uma varredura exploratória em espectrofotômetro UV-vis (Modelo UV – 2000A; Marca: Instrutherm). As amostras foram diluídas em água destilada (1: 19) com o intuito de não ultrapassar a absorvância de 4 uA. Em três ensaios independentes (n = 9), três espectros foram coletados para cada amostra, com intervalo de 1 nm/ponto amostral. Os espectros foram expressos em valores de absorvância para a janela espectral de $\lambda = 200 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$.

2.3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado conforme o método descrito por Randhir e colaboradores (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 40 uL de EA (conforme descrito no item 2.2), na diluição de 1: 9, foi acrescentada de 3,16 mL de água destilada, 0,2 mL do reativo de Folin Ciocalteu, 0,6 mL de carbonato de sódio 2% (m/v), seguido de agitação (vórtex) e incubação por 2 h, ao abrigo de luz. A solução controle (branco) foi preparada substituindo o volume do EA por água destilada. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis (Modelo UV – 2000A; Marca: Instrutherm), a 760 nm. A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão de ácido gálico ($15,625 - 1000 \mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,99$; $y =$

0,00113x) e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de CFT em mg de equivalentes de ácido gálico/g de casca seca (CFT mg EAG/g de casca seca). As análises foram realizadas em três experimentos independentes em triplicata (n = 9).

2.3.3 Quantificação de flavonoides totais

A determinação da concentração de flavonoides totais seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). A 0,16 mL do EA foram adicionados 0,08 mL de cloreto de alumínio 5% (m/v) em metanol e 3,76 mL de metanol PA. A solução controle (branco) foi preparada substituindo-se o volume do EA por água destilada. Após 30 min de incubação ao abrigo de luz, procedeu-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-vis (Modelo UV – 2000A; Marca: Instrutherm), a 442 nm. Para efeito de cálculos dos teores dos metabólitos de interesse, uma curva padrão de quercetina (2,5 - 15 μ g/mL; $r^2 = 0,99$; $y = 0,002899x$) foi utilizada. Os valores de conteúdo total de flavonoides foram expressos como a média \pm desvio padrão de FT em mg de equivalentes de quercetina/g de casca seca. (FT mg EQ/g de casca seca). As análises foram realizadas em três experimentos independentes em triplicata (n = 9).

2.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE-UV-visível)

Alíquotas (10 μ L) de amostras EA foram analisadas em cromatógrafo líquido de fase reversa (Thermo Scientific UltiMate 3000RS Dual System), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (Kinetex® 150 x 4,6 mm, \varnothing 2,6 μ m), termostaticada a 25°C e detector de arranjo de diodos ($\lambda = 254, 270, 280$ e 354 nm). A eluição utilizou solução aquosa acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA - fase A) e acetonitrila (ACN - fase B) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min, em sistema de gradiente linear (Tabela 1), ao longo de 15 min.

Tabela 1 - Sistema de gradiente de fase móvel (FR-CLAE-DAD) utilizado para a separação de compostos fenólicos das amostras dos EA de cascas de banana. Gradiente linear de H₂O acidificada com 0,1% de TFA (fase A) e ACN (fase B), em fluxo de 1 mL/min.

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0 – 5 min	90	10
5 – 10 min	20	80
10 – 15 min	90	10

Fonte: Produção da própria autora.

A identificação dos compostos de interesse (e.g., ácido gálico, quercetina, epicatequina, epigallocatequina e galocatequina) considerou os tempos de retenção e cromatografia de amostras de padrões analíticos (Sigma-Aldrich – 10 µg/mL), solubilizados em fase móvel A e B (1: 1, v/v), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos analitos utilizou curva padrão externa de ácido gálico (1 – 100 µg/mL; $r^2 = 0,99$; $y = 0,34623x$), tendo como referencial a integral da área dos picos correspondentes expressa em µg/g de casca seca. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão de três injeções consecutivas.

2.3.5 Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos EA foi realizada pelo método de captura do radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme proposto por Ribeiro e colaboradores (2008). Para a análise das amostras, 2,9 mL da solução metanólica de DPPH foram adicionados uma alíquota de 0,1 mL do EA (diluição 1: 9), incubando-se ao abrigo de luz por 30 min. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis (Modelo UV – 2000A; Marca: Instrutherm), a 515 nm. Todas as determinações foram realizadas em três experimentos independentes, em triplicata, e acompanhadas de um controle (branco, substituindo-se o EA por água destilada). Os resultados foram apresentados em forma de % de inibição do radical DPPH, obtidos através da equação:

$$\text{Sequestro do radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{BRANCO}} - \text{Abs}_{\text{AMOSTRA}}}{\text{Abs}_{\text{BRANCO}}} \times 100$$

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os dados foram coletados, sumarizados e avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de suas variâncias, seguido da análise de variância (ANOVA), complementada por teste de comparação múltipla de Tukey, admitindo-se um nível de significância de 5%, ou inferior. Os dados foram analisados com suporte do *software* GraphPad Instat® 3 e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO

Diversos métodos são conhecidos para extrair fracionadamente os constituintes de uma planta consoante à sua natureza química. O método mais comum baseia-se na extração por solventes com polaridades distintas. Estudos prévios em nosso laboratório (Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal - LMBV) conduzidos por Pereira (2014) investigaram protocolos de extração de compostos fenólicos obtidos de cascas de bananas (i.e., solventes, processo de secagem das cascas em diferentes temperaturas, *in natura* e/ou liofilizadas). Os métodos investigados apresentaram rendimentos satisfatórios de recuperação desses compostos, com relação aos encontrados por outros autores. Os dados obtidos desta análise demonstraram que o método de secagem da casca a 45°C apresentou os melhores rendimentos, recuperando $0,255 \pm 0,015$ mg/g de compostos fenólicos, quando comparado aos demais métodos, i.e., *in natura*, a 65°C e liofilização, com $0,111 \pm 0,005$, $0,178 \pm 0,034$, $0,145 \pm 0,001$ mg/g, respectivamente.

Além disto, os resultados demonstram que os sistemas solventes extratores diferiram quanto aos valores de rendimento de extração de metabólitos secundários, conforme o grau de afinidade dos analitos pelo solvente, notadamente devido à polaridade deste. O solvente que apresentou a maior taxa de recuperação de compostos fenólicos foi o metanol acidificado (HCl 1%) com, aproximadamente, 2,8 mg/g. Apesar do solvente água ter apresentado um dos menores rendimentos destes compostos ($0,255 \pm 0,015$ mg/g), ele foi selecionado como solvente padrão no presente estudo por apresentar uma baixa toxicidade nos estudos seguintes

de atividade biológica nas culturas celulares, por estar associada às técnicas aplicadas comumente na medicina popular e, adicionalmente, por ser uma técnica relativamente simples de execução, de baixo custo, e que não utiliza solventes orgânicos tóxicos e poluentes.

Outra variável analisada por Pereira (2014) foi o efeito temperatura (Tabela 2). Esta variável interferiu na recuperação dos compostos de interesse, sendo que a secagem da biomassa se faz necessária a fim de preservá-los. Sendo assim, utilizou-se o protocolo de pré-processamento do material vegetal em pós-colheita aonde as cascas de bananas foram secas em fluxo de ar a 45°C, até peso constante.

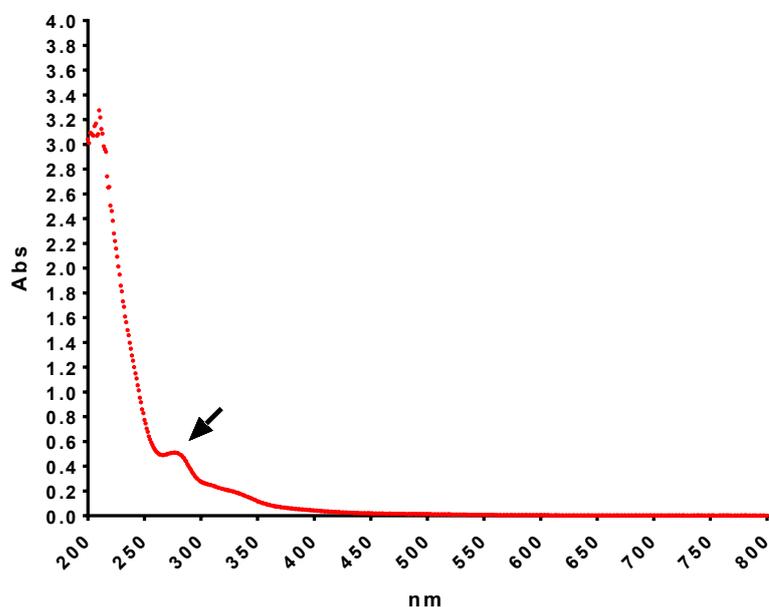
Posteriormente, a produção dos extratos foi seguida conforme o protocolo padronizado por aquela autora (item 2.2).

3.1.1 Perfil espectrofotométrico UV-visível

Todas as amostras de EA de cascas de banana coletadas ao longo do período de fevereiro de 2015 a janeiro 2016 foram analisadas por espectrofotometria de varredura, registrando-se as absorbâncias na janela espectral de $\lambda = 200 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$.

Os compostos fenólicos mostram tipicamente absorção na região UV, i.e., 270 - 350 nm (DE MELO; MATSUDA; DE ALMEIDA-MURADIAN, 2012). A análise dos perfis espectrais (200 - 800 nm) das amostras estudadas revelaram sinais de absorbância naquela janela espectral com máxima absorbância em $\sim 280 \text{ nm}$, indicando que o sistema de extração foi capaz de recuperar os compostos fenólicos das cascas de banana. Além disso, os perfis espectrais mostraram-se semelhantes, sugerindo uma composição química homogênea entre as amostras ao longo dos períodos de coleta, independente da sazonalidade (Figura 3). Assim, os resultados constataam a viabilidade de obtenção destes compostos ao longo de todo o ano, uma vez que a banana é classificada como um fruto não sazonal.

Figura 3 - Perfil espectral de varredura ($\lambda = 200 - 800$ nm) representativo do extrato aquoso de cascas de banana. Seta indica pico na região de absorção dos compostos fenólicos (~ 280 nm).



Fonte: Produção da própria autora.

Análises anteriores do nosso grupo de pesquisa utilizaram a biomassa de cascas de bananas do mesmo genótipo, i.e., cultivar Prata Anã, entretanto, essas foram adquiridas de cultivos da cidade de Urussanga-SC (PEREIRA, 2014), enquanto que o material vegetal destinado às atuais análises, de Criciúma-SC. Analisando os dados obtidos por Pereira (2014) e comparando aos dados obtidos nessa análise, é possível identificar algumas discrepâncias entre as amostras de Urussanga e Criciúma. Como referido anteriormente, o único pico encontrado nos extratos aquosos de amostras oriundas dos cultivos de Criciúma foi em ~ 280 nm. Já nas amostras de Urussanga (PEREIRA, 2014) os compostos fenólicos apresentaram absorvância no espectro entre 300 à 375 nm. Além disto, foi identificado um pico na região de 400 nm, caracterizando a presença de compostos carotenóidicos, os quais não foram identificados nas amostras de Criciúma.

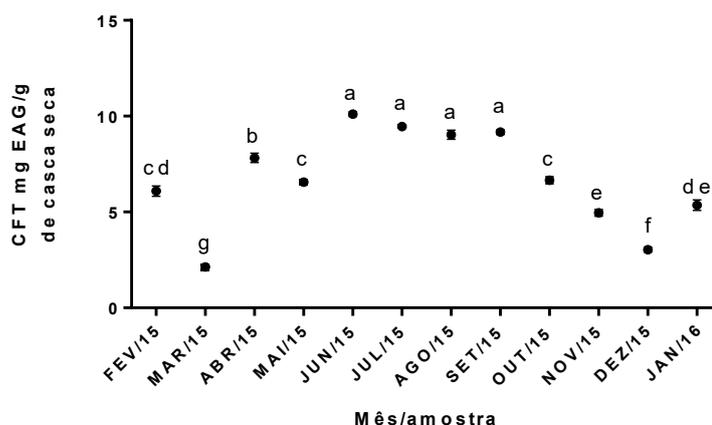
Após a identificação das absorvâncias de interesse, procederam-se as análises dos teores de compostos fenólicos totais.

3.1.2 Teores de compostos fenólicos totais (CFT)

A espectrofotometria é uma técnica analítica relativamente simples e útil à quantificação de fenóis derivados de biomassa vegetal. Os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são amplamente utilizados para mensurar os valores de concentração de compostos fenólicos totais em amostras quimicamente complexas, como os extratos de tecidos vegetais. Tais métodos baseiam-se em reações de oxi-redução, envolvendo reagentes contendo tungstênio e molibdênio, respectivamente (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Neste estudo, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, em que os produtos desta redução, na presença de compostos fenólicos, desenvolvem coloração azul, cuja absorbância pode ser medida em comprimento de ondade aproximadamente 760 nm.

A partir dos espectros analisados, nota-se que os teores de compostos fenólicos totais dos EAs variaram entre $2,12 \pm 0,38$ e $10,10 \pm 0,37$ mg EAG/g de casca seca, representados pelas amostras coletadas em março e junho de 2015, respectivamente. Observa-se ainda que as amostras de julho ($9,45 \pm 0,17$ mg EAG/g), agosto ($9,16 \pm 0,34$ mg EAG/g) e setembro de 2015 ($9,02 \pm 0,72$ mg EAG/g) não diferiram estatisticamente da amostra de junho de 2015, porém, foram discrepantes em relação às demais ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4 - Conteúdo médio de compostos fenólicos totais (CFT mg EAG/g) dos EA, para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Os dados encontrados ainda foram comparados às análises de Pereira (2014). Segundo esta autora, os teores de compostos fenólicos das amostras de Urussanga variaram entre $0,92 \pm 0,07$ e $34,53 \pm 3,89$ mg EAG/g de casca seca, representadas pelas amostras de dezembro e agosto de 2012, respectivamente. Sendo assim, é possível considerar que, apesar dos teores desta classe de metabólitos terem sido menores nas amostras de Criciúma, eles estão dentro da média esperada.

Além disso, é possível verificar que as amostras de inverno apresentaram os maiores teores de CFT e que a partir de outubro houve um declínio nos teores daqueles metabólitos secundários. Estes resultados concordam com o mesmo período amostral encontrado por Pereira (2014) nas amostras de 2012, i.e., predominante da estação de inverno. Contrariamente, as amostras coletadas e analisadas por Pereira (2014) nos meses de inverno de 2011 revelaram uma queda significativa destes compostos.

Nos vegetais, os compostos fitoquímicos apresentam funções ecológicas importantes como proteção contra herbívoros e patógenos, ação alelopática, além de agir como atrativos para animais polinizadores (FERRERA et al., 2016). Diante dos dados analisados, é possível supor que, além dos fatores bióticos interferirem na composição de metabólitos secundários, há de se ressaltar que o tipo de cultivo e o manejo também devem ser considerados para as variações encontradas.

Adicionalmente, apesar das amostras analisadas entre o período de fevereiro de 2015 a janeiro 2016 apresentarem variações nos seus teores ao longo dos períodos amostrais, sugere-se que o genótipo sob estudo caracteriza-se pela biossíntese constante de compostos fenólicos, confirmando os achados anteriores dos perfis espectrais.

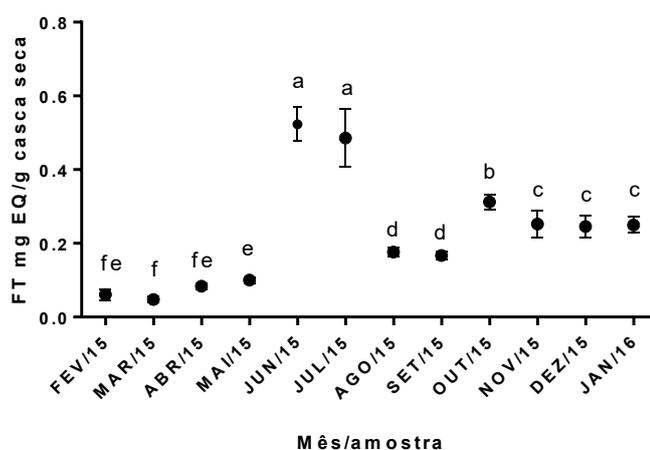
3.1.3 Teores de flavonoides totais (FT)

As cascas de banana comumente apresentam, além dos ácidos fenólicos, compostos flavonoídicos, como quercetina e epicatequina (TSAMO et al., 2015). Sendo assim, a seguinte análise permitiu identificar a presença dos teores totais desta classe de compostos.

As amostras de cascas de banana coletadas em junho e julho de 2015 destacam-se novamente devido aos maiores teores de FT, com $0,52 \pm 0,04$ e $0,48 \pm 0,07$ mg EQ/g, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas. Da mesma forma, a amostra de

março de 2015 apresentou o menor teor destes metabólitos secundários, i.e., $0,047 \pm 0,002$ mg EQ/g, não diferindo significativamente das amostras de fevereiro $0,06 \pm 0,004$ mg EQ/g e abril $0,084 \pm 0,002$ mg EQ/g (Figura 5).

Figura 5 - Conteúdo médio de flavonoides totais (FT mg EQ/g) dos EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Os compostos fenólicos são encontrados nos vegetais com estruturas variadas, como os ácidos fenólicos, taninos e flavonoides (FERRERA et al., 2016). Sendo assim, hipotetizou-se uma relação proporcionalmente positiva entre os teores de CFT e FT. Os dados apresentados sustentam esta hipótese, onde as concentrações obtidas de FT são constantes ao longo dos períodos amostrais e relacionam-se aos teores de CFT. Há de ressaltar que a discrepância encontrada nos meses de agosto e setembro no conteúdo de flavonoides e fenólicos totais podem ainda estar relacionada à reaceleração do metabolismo da planta, onde ocorre aumento da biossíntese de aminoácidos/proteína nestes períodos e que, o reagente Folin-Ciocalteu poderia reagir com outros componentes antioxidantes (proteínas) presentes nas amostras, resultando em uma reação cruzada.

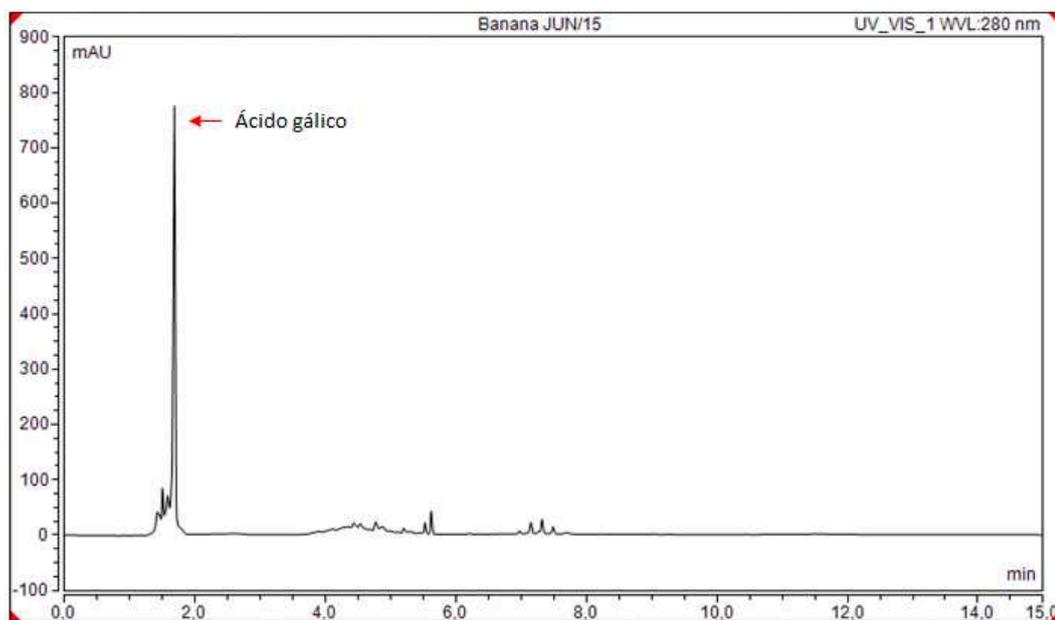
3.1.4 Análise dos perfis cromatográficos

Enquanto as análises espectrofotométricas são usualmente dedicadas à dosagem total de um determinado grupo de compostos, os métodos cromatográficos permitem isolar e identificar cada composto de uma amostra em circunstâncias quantitativas.

Todas as amostras foram submetidas à avaliação quanto ao perfil cromatográfico. Em uma primeira análise, constatou-se que as amostras apresentaram similaridade de perfis, ratificando os resultados observados via espectrofotometria UV-vis. Além disto, observou-se que todas as amostras caracterizam-se pela presença majoritária de ácido gálico (AG), conforme demonstrado na figura 6. Os extratos foram enriquecidos com o padrão para confirmar sua presença.

Outros picos passíveis de identificação, apesar da baixa área encontrada, foram observados no decorrer das análises, com tempos de retenção menores que 1,5 min. Entretanto, não foi possível indentificá-los de acordo com a biblioteca de compostos padrões.

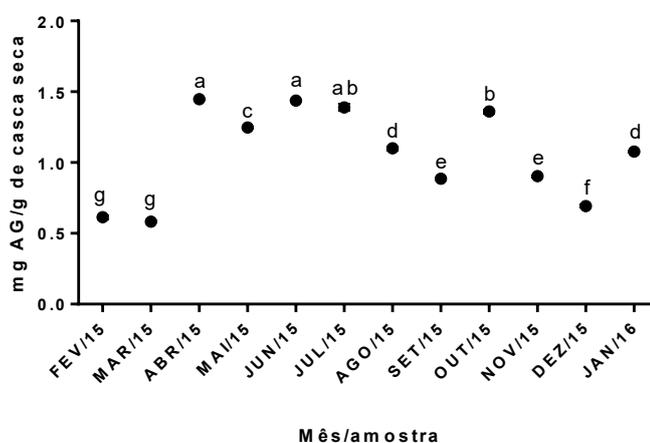
Figura 6 - Perfil cromatográfico (FR-CLAE-DAD, $\lambda = 280$ nm) representativo do EA de cascas de banana. A seta vermelha identifica o pico relativo ao composto majoritário, ácido gálico.



Fonte: Produção da própria autora.

Em uma abordagem quantitativa ao referido composto majoritário identificado, os resultados demonstram que as amostras coletadas em abril, junho e julho de 2015 apresentaram os maiores teores daquele metabólito ($1,44 \pm 0,01$; $1,43 \pm 0,01$ e $1,3 \pm 0,02$ mg AG/g, respectivamente) e não diferem estatisticamente (Figura 7). Contrariamente, as amostras de março e fevereiro apresentam os menores conteúdos daquele composto fenólico ($0,58 \pm 0,01$ e $0,61 \pm 0,01$ mg AG/g, respectivamente). A média de conteúdo de AG ao longo dos períodos amostrais foi de $1,06 \pm 0,31$ mg AG/g. Já nos perfis analisados por Pereira (2014), valores bastante inferiores foram detectados, $0,055$ mg/g AG/g de casca seca. Entretanto, naquele estudo foram identificados outros compostos, e.g., galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico, onde o primeiro, representativo da classe dos flavonoides, destacou-se majoritariamente.

Figura 7 - Conteúdos médios de ácido gálico (mg AG/g) (FR-CLAE-DAD, $\lambda = 280$ nm) em EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

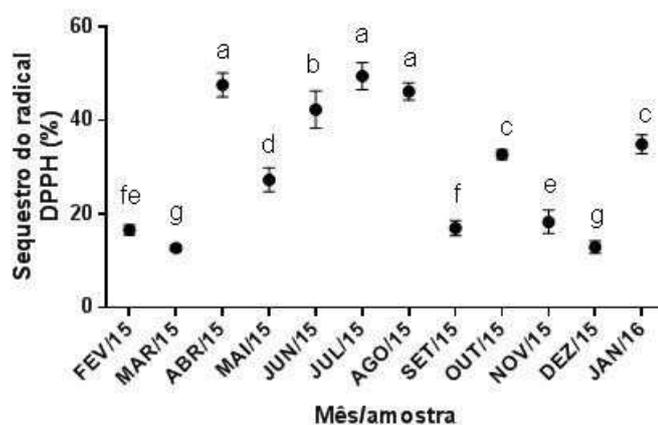
Tsamo e seu grupo de pesquisa (2015) também identificaram favonols, uma classe de flavonoides, como compostos majoritários em cascas de diferentes cultivares de *Musa* sp. Segundo Dong e colaboradores (2016), a banana tem sido relatada como uma importante fonte de compostos fenólicos, sendo os flavonoides a principal forma. Entretanto, não foi possível identificar picos referentes a esta classe de compostos nas amostras analisadas.

3.1.5 Avaliação da atividade antioxidante

O método de determinação da capacidade antioxidante dos EAs baseia-se na atividade sequestradora do radical livre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O radical DPPH possui coloração púrpura, com absorvância em comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido e convertido a difenil-picril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente redução da absorção, a qual é monitorada espectrofotometricamente (CHANDRASEKAR et al., 2006). Como regra, tem-se que quanto maior a capacidade de sequestro do radical livre DPPH, maior será a atividade antioxidante do extrato em análise.

A figura 8 indica que os EAs das amostras coletadas nos meses de julho, abril e agosto de 2015 apresentam as maiores percentagens de sequestro do radical livre DPPH ($49,48 \pm 2,91\%$, $47,88 \pm 2,55 \%$ e $46,18 \pm 1,83\%$, respectivamente). De interesse, ressalta-se que os menores valores desta variável foram detectados nas amostras coletadas em março ($12,79 \pm 0,56 \%$) e dezembro ($12,98 \pm 1,29 \%$) de 2015.

Figura 8 - Sequestro do radical DPPH (%) pelos EA para o período amostral de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras representam diferenças estatísticas quando comparados os meses amostrais, por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

É documentado na literatura que os compostos fenólicos podem supostamente atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores

do oxigênio singlete (FERRERA et al., 2016). Sendo assim, é putativo a uma relação da atividade antioxidante aos teores de CFT e à concentração de ácido gálico verificada.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada à atividade dos antioxidantes naturais presentes nos frutos (APRIASARI; SUHARTONO, 2014). Os antioxidantes servem para manter baixos os níveis de radicais livres, permitindo-lhes desempenhar funções biológicas úteis sem danificar as células e prevenir doenças (HALLIWELL, 2006).

Fenólicos, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e ligninas têm sido relatados como componentes benéficos à saúde humana de alimentos funcionais por nutricionistas (DONG et al., 2016). Esses antioxidantes neutralizam os RL inibindo a cadeia de iniciação ou interrompendo a cadeia de propagação de reações oxidativas, convertendo os RL em moléculas menos nocivas e reparando o dano oxidativo nas células humanas (DU et al., 2009).

As análises relacionadas à investigação do perfil químico das cascas de banana demonstram que foi possível recuperar os compostos de interesse, i.e., compostos fenólicos. Adicionalmente, cabe ressaltar a existência de variações dos perfis químicos bastante significativas quando confrontados os resultados obtidos nesse estudo com a literatura disponível, especialmente considerando-se o uso de métodos de extração distintos entre os relatos. De acordo com Shian e colaboradores (2012), a recuperação do antioxidante depende muito do tipo e polaridade do solvente utilizado para extração. Segundo o autor, a acetona é considerada o melhor solvente para os tecidos da banana. Seus dados demonstram que o solvente água recuperou compostos que foram responsáveis por no máximo 6,9 % de capacidade de sequestro do radical DPPH, enquanto que a acetona 70% recuperou compostos com capacidade sequestradora de até 42,5 %, dos cultivares analisados Berangan e Mas, respectivamente. De maneira comparativa aos dados obtidos no presente estudo, o extrato aquoso apresentou maior capacidade de sequestro do radical DPPH (aproximadamente 50% na amostra de julho) no cultivar sob análise, Prata Anã. Complementarmente, Sundaram e colaboradores (2011) também avaliaram diferentes solventes na recuperação de CFT. Enquanto que o clorofórmio foi capaz de recuperar apenas $0,178 \pm 0,024$ mg EAG/g de casca seca de *Musa paradisiaca*, a extração com água e acetato de etil promoveram um aumento no rendimento de $3,717 \pm 0,038$ e $6,3014 \pm 0,028$ mg EAG/g, respectivamente. Ressalta-se que as amostras analisadas no presente estudo resultaram em $34,53 \pm 3,89$ mg EAG/g nos teores de CFT, e essa maior concentração pode, hipoteticamente, estar relacionado ao seu genótipo.

Outra variável analisada por Sundaram e colaboradores (2011) e importante a ser considerada na determinação do perfil químico de uma amostra vegetal, porém, não analisada nesse estudo, é o estágio de desenvolvimento do fruto. De acordo com aqueles dados, os teores de compostos fenólicos apresentaram variação em extratos aquosos obtidos de cascas de frutas imaturas ($7,41 \pm 0,04$ mg EAG/g de casca seca) e maduras ($3,71 \pm 0,03$ mg EAG/g).

De fato, a variabilidade nos perfis químicos, comumente encontrada nos estudos, pode interferir na reprodutibilidade dos ensaios fitoquímicos, bem como nos ensaios de atividade biológica em que forem administrados. Neste cenário, a busca por estratégias para selecionar as melhores amostras para estudos em atividades biológicas se torna necessária.

Análises complementares são de interesse, a fim de esclarecer de maneira minuciosa a matriz complexa dos EA, que além de compostos fenólicos pode apresentar em sua composição, vitaminas solúveis e açúcares totais em quantidades relevantes.

Foram realizadas análises utilizando o método de cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) com o intuito de identificar outros possíveis compostos (dados não mostrados), porém requer-se a padronização do protocolo experimental. Por fim, as amostras também foram conduzidas às análises de ressonância magnética nuclear (RMN), todavia, necessita-se de mais tempo hábil para compreender a técnica e discorrer sobre os elementos reconhecidos.

4 CONCLUSÃO

Com relação às análises desenvolvidas até o presente instante dos EAs obtidos de amostras de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016, assume-se que:

- É possível recuperar os compostos fenólicos de interesse, majoritariamente, o ácido gálico, ao longo de todas as estações do ano,
- As amostras apresentam atividade antioxidante, característica importante a ser considerada para futuras análises em atividades biológicas.
- Na generalidade, o período amostral do inverno apresentou os melhores resultados com relação aos teores de CFT, FT, ácido gálico e atividade antioxidante.

CAPÍTULO II

A oportunidade favorece a mente bem preparada.

(Louis Pasteur)

Espectrofotometria UV-Vis e quimiometria como ferramentas para reconhecimento dos perfis bioquímicos de extratos aquosos de cascas de bananas (*Musa* sp.) de acordo com a sazonalidade

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* sp.) é uma fruta comestível cultivada em regiões tropicais e subtropicais com variação química sazonal em sua composição de polpa e casca, devido ao efeito de fatores climáticos, como chuva e temperatura (ANYASI; JIDEANI; MCHAU, 2015).

A banana é a fruta mais popular nos países industrializados. É cultivada em mais de 130 países como a segunda fruta mais produzida após a citricultura. Contribui com aproximadamente 17% da produção total de frutas do mundo (EDENTA; OKODUWA; OKPE, 2017). Em virtude disto, quantidades significativas de cascas de banana, equivalentes à 35-40% do peso total da fruta fresca, são geradas como resíduos de seu processamento industrial, e.g., banana congelada, frita ou desidratada, purê de banana e farinha de banana (PALACIOS et al., 2017).

Produtos naturais, especialmente extratos de plantas, foram usados como constituintes ativos de fármacos ou cosméticos ao longo da história (WEN et al., 2011b). Neste cenário, nosso grupo de pesquisa objetiva investigar os compostos bioativos das cascas de bananas, i.e., compostos fenólicos, e conferir um uso à esse resíduo.

Neste estudo, pretendeu-se investigar a influência de variáveis climáticas e sua relação com a biossíntese de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em amostras de casca de banana, coletadas ao longo das estações, através da aplicação de técnicas estatísticas multivariadas (análise de componentes principais - *principal component analysis* - PCA e análise de agrupamentos hierárquicos - *hierarchical clustering analysis* - HCA), objetivando a construção de modelos descritivos que auxiliem na interpretação das variáveis climáticas e bioquímicas. Esta estratégia visa obter informações adicionais sobre a heterogeneidade bioquímica das amostras oriunda da sazonalidade, a fim de selecionar as melhores amostragens para futuros estudos de atividades biológicas, levando também a um eventual uso tecnológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Os perfis químicos dos extratos encontrados no Capítulo I foram utilizados para integrar aos dados climáticos. Assim, foram utilizados os dados obtidos por espectrofotometria de varredura UV-Vis em uma janela espectral de 200 a 800 nm (resolução de 1 nm/ponto de dados), além das médias dos teores de fenólicos e flavonoides totais, percentagem de atividade antioxidante e quantificação de ácido gálico de cada período amostral.

2.2 DADOS CLIMÁTICOS

Buscando uma análise integrada dos dados de perfis bioquímicos e climáticos, as variáveis temperatura, umidade relativa, precipitação pluviométrica e insolação do local de cultivo de *Musa* sp. foram consideradas. Os dados climáticos foram gentilmente cedidos pela Estação Experimental de Urussanga da EPAGRI (Urussanga/SC, latitude: 28°31'04'', longitude: 49°19'15''). Para efeitos das análises, os valores médios das variáveis de interesse, coletadas ao longo do período de fevereiro de 2015 a janeiro de 2016, foram considerados (Tabela 2). Ao conjunto de dados bioquímicos e climáticos, técnicas de análise estatística multivariada foram aplicadas, numa abordagem tipicamente quimiométrica.

Tabela 2 - Dados climáticos coletados na Estação Experimental de Urussanga da EPAGRI (Urussanga/SC, latitude: 28°31'04'', longitude: 49°19'15''). Os dados são referentes as médias obtidas em cada mês de coleta das amostras de bananas.

Mês/ano	Temp. Mín. (°C)	Temp. Méd. (°C)	Temp. Máx. (°C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	Insolação (h)
FEV/15	20,6	24,3	30,0	86,3	260,8	153,2
MAR/15	20,4	23,4	28,6	85,7	271,6	159,0
ABR/15	17,1	20,8	26,3	87,2	134,9	151,3
MAI/15	14,7	17,6	19,7	88,7	206,8	134,4
JUN/15	11,8	15,9	23,3	85,2	123,8	162,7
JUL/15	12,8	16,4	22,1	88,6	172,4	119,0
AGO/15	15,2	20,0	27,6	80,9	45,4	182,9
SET/15	14,6	18,0	23,4	86,6	291,5	114,0
OUT/15	16,1	19,5	23,9	86,1	269,3	67,3
NOV/15	17,9	21,5	26,0	83,2	156,6	87,6
DEZ/15	20,5	24,4	29,8	84,0	214,1	115,6
JAN/16	20,7	24,7	30,3	81,5	74,6	180,1

Fonte: Produção da própria autora.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente às análises quimiométricas dos dados espectroscópicos das absorvâncias dos EA na região UV-vis ($\lambda = 200 - 800$ nm), estes foram submetidos à uma rotina de pré-processamento envolvendo a correção de linha de base, normalização e otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*). O conjunto de dados processados foi submetido à análise estatística multivariada, aplicando a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) e métodos de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *hierarchical clustering analysis*). Todas as análises foram apoiadas por *scripts* utilizando a linguagem R e o pacote *specmine*, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (COSTA; MARASCHIN; ROCHA, 2016), e algumas funções dos pacotes *Chemospec* (HANSON, 2015), *HyperSpec* (BELEITES, 2011) e *ggplot2*. Todos os *scripts* em R, os dados brutos e as análises

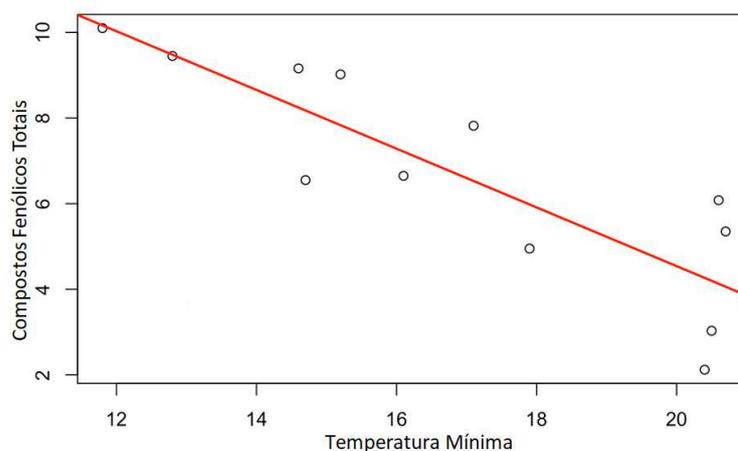
quimiométricas estão disponíveis em material suplementar, em <http://darwin.di.uminho.pt/pacbb2017/banana-peels>, bem como o relatório de análise de dados gerado automaticamente a partir dos *scripts* R usando os recursos fornecidos pela R Markdown (R CORE TEAME, 2019). Isso permite que qualquer interessado possa reproduzir e documentar os dados aqui demonstrados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando selecionar a melhor amostra para futuros ensaios biológicos, inicialmente ensaios espectrofotométricos medindo a absorbância dos EA em 280 nm foram realizados, seguido da determinação dos teores totais de compostos fenólicos e flavonoides, da capacidade antioxidante e dos perfis cromatográficos. Numa segunda abordagem, os dados bioquímicos foram analisados de forma integrada aos dados climáticos (metadados), via técnicas de estatística multivariada.

Modelos de regressão linear foram construídos considerando-se as variáveis de temperaturas mínima, média e máxima para cada momento amostral. Os resultados indicam que as temperaturas mais baixas contribuem ao aumento dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais. A tendência é mais clara para os fenólicos totais (Figura 9), onde para a temperatura mínima a variância explicada é superior a 70%, ($r^2 = 0,702$).

Figura 9 - Distribuição de pontos amostrais (amostra/mês) da variável compostos fenólicos totais (mg GAEq/g) vs. temperatura mínima (°C), consoante ao modelo de regressão linear ($r^2 = 0,702$).

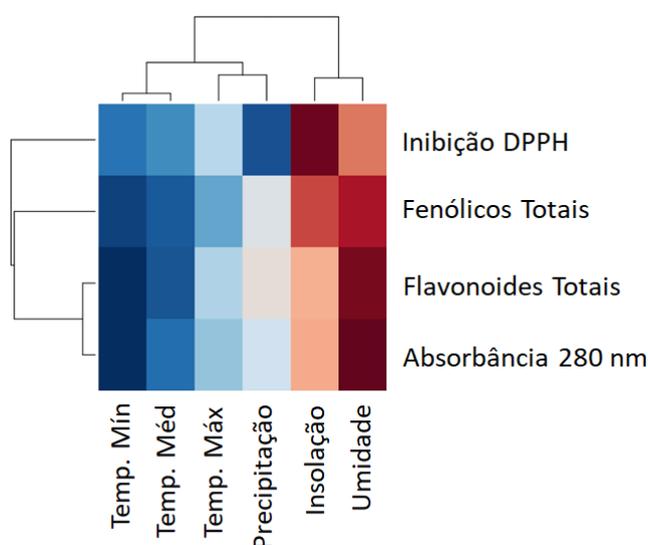


Fonte: Produção da própria autora.

De forma contrária, os modelos de regressão indicaram que as variáveis umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e insolação não mostraram qualquer relação significativa com os conteúdos dos metabólitos secundários em estudo.

Por fim, a correlação de Pearson, que mede o grau de correlação e a direção dessa correlação – se positiva ou negativa – de duas variáveis métricas, foi calculada. Os resultados apresentados na figura 10 corroboram os achados anteriores onde uma relação negativa/inversa ($r = - 0,854$) entre a temperatura mínima e os compostos fenólicos totais foi observada, ou seja, quanto menor a temperatura mínima, maior o teor de compostos fenólicos, demonstrado pela coloração azul escura.

Figura 10 - Correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas e climáticas. A correlação entre as variáveis é mais intensa na cor azul (correlação negativa), diminuindo em vermelho (correlação positiva).

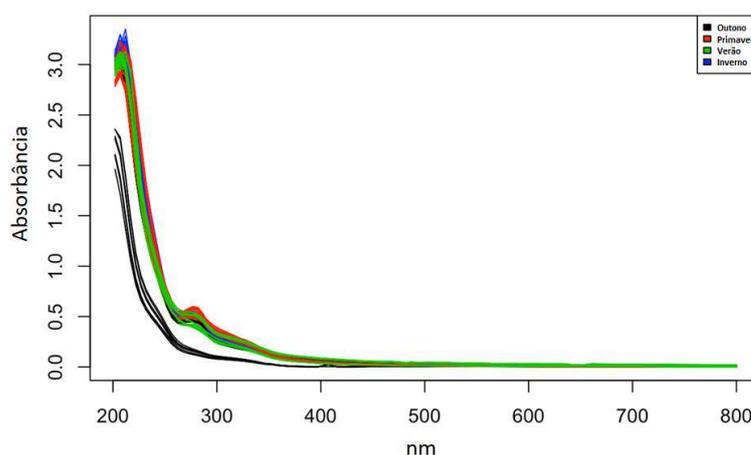


Fonte: Produção da própria autora.

Em uma segunda etapa, os dados de absorvâncias UV-vis na janela espectral de $\lambda = 200 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$ foram pré-processados, considerando a correção de desvios e a normalização dos espectros. A análise de variância (ANOVA) dos dados espectrais e metadados para as estações do ano revelou que as variáveis mais discriminantes dos perfis químicos dos EA estão na região de absorção máxima dos compostos fenólicos. Todos os perfis espectrais mostraram semelhança naquela região de *fringerprint* (aproximada de 280

nm), sugerindo uma composição química similar das amostras ao longo das estações, com alguma discrepância às amostras outonais, representadas pelas linhas pretas (Figura 11).

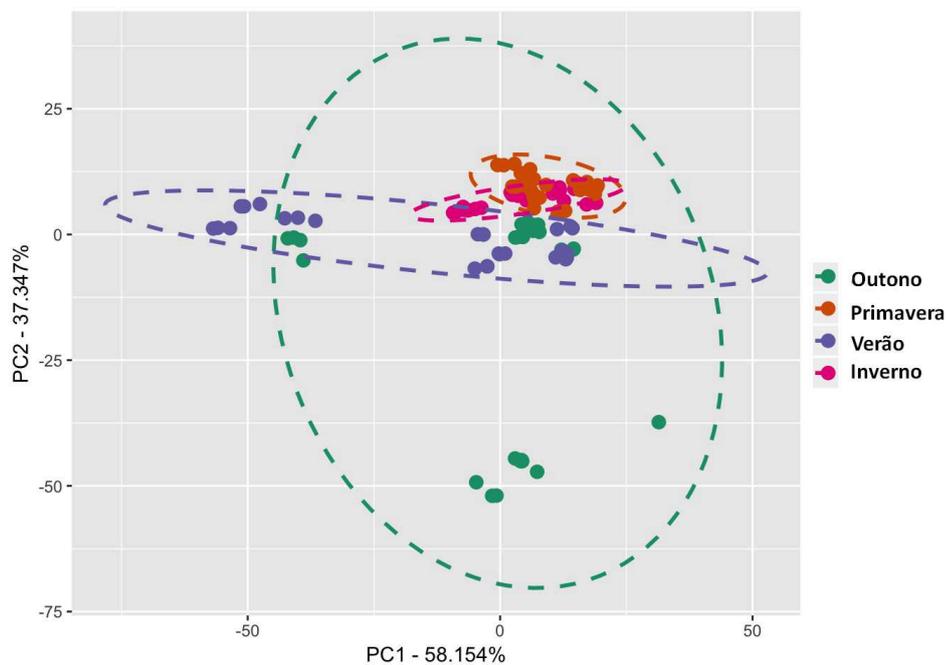
Figura 11 - Perfis espectrais de UV-vis ($\lambda = 200 - 800$ nm) de 12 amostras de extratos aquosos de cascas de banana, cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.



Fonte: Produção da própria autora.

Com o objetivo de identificar padrões de similaridade amostral em função da sazonalidade aplicou-se a análise de componentes principais ao conjunto de dados espectroscópicos de UV-vis. Um valor expressivo da variância de dados foi explicado pelos componentes principais 1 (PC1 = 58%) e 2 (PC2 = 37%), alcançando 95%. Os escores de dispersão observados (Figura 12) revelaram um efeito importante da sazonalidade com base no agrupamento das amostras. É possível observar um total agrupamento nas elipses rosa e laranja, correspondentes às estações de inverno e primavera, respectivamente. Ainda é possível observar que as amostras de outono (verde) apresentam discrepância às outras estações, conforme verificado anteriormente na análise de variância (Figura 11).

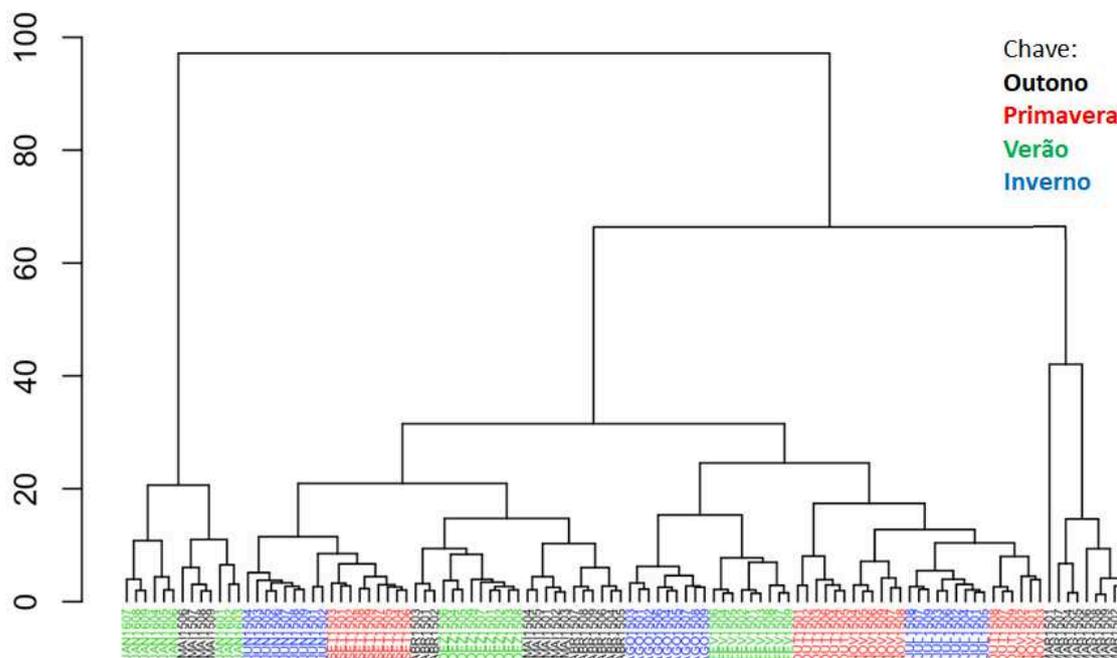
Figura 12 - Escores de dispersão dos dados espectrais UV-vis ($\lambda = 200 - 800 \text{ nm}$) nos eixos PC1 e PC2 de amostras ($n = 108$) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016. Cada conjunto de pontos envolvidos por uma elipse da mesma coloração representa uma estação.



Fonte: Produção da própria autora.

Em seguida, modelos de análise hierárquica foram construídos a partir dos dados espectrais, constatando-se uma discriminação semelhante ao observado na PCA, com o agrupamento dos dados em função da sazonalidade (Figura 13). Entretanto, este modelo não distribui as amostras de forma discriminada quanto ao modelo anterior.

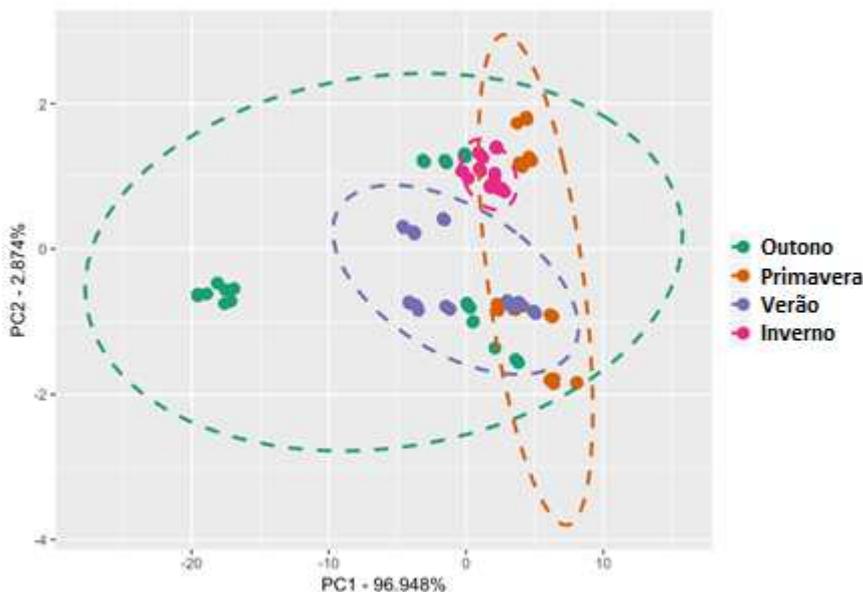
Figura 13 - Dendograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) das absorvâncias UV-vis ($\lambda = 200 - 800 \text{ nm}$) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.



Fonte: Produção da própria autora.

Em função dos resultados obtidos através dos modelos de descrição e classificação gerados a partir do conjunto total de dados espectrais ($\lambda = 280 - 800 \text{ nm}$), uma segunda análise buscando correlacionar o efeito da sazonalidade sobre os perfis espectrais da região de absorvâncias máximas dos compostos fenólicos foi realizada. Para tal, os componentes principais foram calculados a partir dos dados espectrais da janela de absorvância entre 280 e 320 nm (radiação UVB). PC1 (96,9%) e PC2 (2,8%) explicaram 99,7% da variação total do conjunto de dados na janela de interesse aos compostos fenólicos (Figura 14), não demonstrando uma discriminação significativa superior, comparativamente ao observado nos cálculos com o conjunto total de dados espectroscópicos ($\lambda = 200 - 800 \text{ nm}$). É possível observar que as amostras de inverno se agrupam totalmente na elipse, demonstrando similaridade entre os perfis.

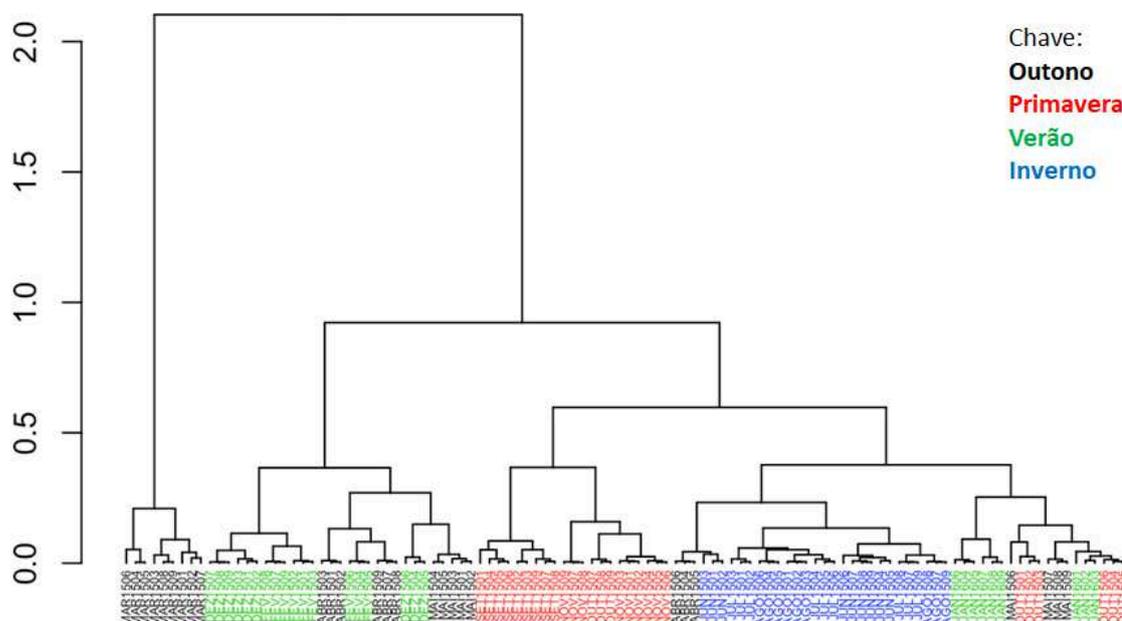
Figura 14 - Escores de dispersão dos dados espectrais UV-vis ($\lambda = 280 - 320$ nm) nos eixos PC1 e PC2 de amostras ($n = 108$) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016. Cada conjunto de pontos envolvidos por uma elipse da mesma coloração representa uma estação.



Fonte: Produção da própria autora.

Com o intuito de obter uma melhor compreensão destes dados, a HCA foi aplicada aos mesmos dados espectrais ($\lambda = 280 - 320$ nm), proporcionando uma melhor discriminação das amostras. Os *clusterings* descritos na figura 15, a partir da raiz, revelam uma primeira divisão para as amostras de março de 2015 (outono) em relação às demais. Estes resultados concordam com os ensaios bioquímicos, onde foram encontradas as menores quantidades de metabólitos secundários naquelas amostras outonais. No segundo ramo, observa-se as amostras reunidas por similaridade em 2 grupos majoritários, os quais contêm a maioria das amostras de inverno e primavera. De fato, as amostras de inverno são agrupadas integralmente em função da semelhança de perfis químicos dos EA das biomassas coletadas nos meses de junho, julho e agosto de 2015 para a região espectral de interesse.

Figura 15 - Dendograma da análise de agrupamento hierárquico (HCA) das absorvâncias UV-vis ($\lambda = 280 - 320 \text{ nm}$) de extratos aquosos de cascas de banana cultivar Prata Anã, no ano de 2015 e verão de 2016.



Fonte: Produção da própria autora.

Por fim, as análises cromatográficas revelaram um maior teor de ácido gálico na amostra coletada em abril/2015, diferindo dos dados encontrados para os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais. Correlacionando os dados de concentração daquele ácido polifenólico e de atividade antioxidante, detectou-se um índice positivo e relevante ($r^2 = 0,865$) entre as variáveis.

A abordagem analítica empregada neste trabalho, apoiada por ferramentas de bioinformática, permitiu um melhor entendimento da variabilidade química das cascas de banana coletadas durante as estações associadas aos fatores climáticos. Baixas temperaturas tipicamente encontradas no inverno foram determinantes para modular o metabolismo da banana para a produção de maiores quantidades de compostos fenólicos, melhorando também a atividade antioxidante dos EAs. Assim, PCA e HCA demonstraram uma discriminação de amostras coletadas no inverno como promissoras para futuros estudos biológicos. Além disso, o HCA permitiu a identificação de amostras coletadas no outono, ou seja, MAR/2015, que apresentaram quantidades reduzidas de metabólitos secundários bioativos.

4 CONCLUSÃO

As análises quimiométricas demonstram que as amostras mais promissoras para futuros estudos de atividades biológicas são aquelas coletadas no inverno. Assim, selecionou-se a amostra de junho de 2015 para dar continuidade aos experimentos, considerando ainda os achados no Capítulo I.

CAPÍTULO III

A frase mais empolgante de ouvir em ciência, a que precuncia novas descobertas, não é “Eureka!”, mas sim, “Isto é estranho...”.

(Isaac Asimov)

Estudo *in vitro* do efeito do extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (*Musa sp.*) em mecanismos celulares de fibroblastos envolvidos no processo de cicatrização cutânea

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais funções da pele é servir como uma barreira protetora contra a ação de fatores ambientais estressores. Quando ocorre uma lesão neste órgão, um processo complexo de cura, caracterizado em fases, é iniciado em resposta a uma lesão, restaurando a função e integridade dos tecidos danificados (AGARWAL et al., 2009). O processo de cicatrização pode ser dividido didaticamente em três fases que se sobrepõem: a inflamatória, a proliferativa e a remodeladora. Estas três fases envolvem eventos complexos de interação célula-célula e célula-matriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; THAKUR et al., 2011). Ademais, estas fases exigem a integração de eventos biológicos e moleculares como a proliferação celular, migração, secreção de citocinas e fatores de crescimento, diferenciação celular e produção de matriz extracelular (WOJTOWICZ et al., 2014).

Os fibroblastos são o tipo celular predominante da derme e sua proliferação está envolvida na restauração da estrutura e função no local da lesão (MUHAMMAD et al., 2013). Durante a fase proliferativa, os fibroblastos e as fibras de colágeno estão ativamente envolvidos no processo de restauração da pele (HOSKIN et al., 2019).

Ensaio *in vitro* de biologia celular são usados para estudar as propriedades dos diferentes mecanismos de reparo de lesões cutâneas, bem como para a descoberta de compostos líder potenciais (MATSIKA et al., 2018). Curiosamente, estima-se que 60% da população mundial utilizam produtos à base de plantas como medicamentos, com vários deles servindo para promover a cicatrização da pele (HOSKIN et al., 2019), onde o processo pode ser estimulado por princípios ativos que estão presentes em vários produtos naturais vegetais. Esses agentes influenciam em uma ou mais fases do processo (PADILLA-CAMBEROS et al., 2016). Segundo Tsala e colaboradores (2013), vários componentes fitoquímicos bioativos como alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, terpenoides e compostos fenólicos modulam uma ou mais fases do processo de cicatrização, atuando em múltiplos alvos celulares em decorrência de suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. De forma similar, ensaios *in vivo* e *in vitro* (com linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos, por exemplo)

demonstraram o potencial efeito desses compostos bioativos em eventos relacionados ao processo cicatricial (NIZAMUTDINOVA et al., 2009; XU et al., 2013). Como exemplo, estudos fitoquímicos e farmacológicos utilizando biomassas de bananas (e.g., polpa e casca) têm recebido atenção, uma vez que extratos de cascas desse fruto apresentam atividades regeneradora/cicatrizante *in vivo* atribuída aos seus constituintes fenólicos, carotenóidicos e aminas biogênicas (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Entretanto, há escasses de dados que demonstrem a ação de extratos obtidos de cascas de banana, ricos em compostos fenólicos, e seu efeito em fibroblastos.

A hipótese deste estudo fundamenta-se na ideia de que o extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (*Musa* sp.) influencia em mecanismos celulares de fibroblastos e, desta forma, modula eventos das fases inflamatória, proliferativa e remodeladora do processo de cicatrização cutânea. Neste contexto, foram conduzidos estudos *in vitro* para aferir a citotoxicidade do EA na linhagem de fibroblastos BALB/3T3 clone A31, seu efeito em processos proliferativo e migratório e seu potencial de indução de síntese de colágeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de fibroblastos (BALB/3T3 clone A31) (Figura 16) de camundongo (*Mus musculus*) foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco'S Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), 3,7g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e associação de antibióticos contendo penicilina/estreptomicina (10 mL/L). As células foram cultivadas em estufa incubadora, à temperatura de 37°C, 95% de umidade em ar atmosférico suplementado com 5% (v/v) de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultura foi substituído três vezes por semana e ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram inoculadas em placas de cultivo para as análises subsequentes. Foram utilizadas culturas entre as passagens 100 e 118.

Figura 16 - Linhagem celular de fibroblastos BALB/3T3 clone A31 sob cultivo em meio DMEM (200 ×). Escala = 100 μm.



Fonte: Produção da própria autora.

2.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR

2.2.1 Método MTT

Após atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas, neutralizadas com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), centrifugadas (2000 rpm – 3 min), ressuspensas em meio de cultura, coletadas e diluídas (1: 1) em solução corante Azul de Tripán (0,4 %) para contagem celular em câmara de Neubauer. Em placas de 96 poços, os fibroblatos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa incubadora (37 °C, 5% CO₂) por 24 h, possibilitando a adesão celular ao substrato. O meio de cultura foi substituído por outro contendo concentrações crescentes do EA - 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 μg/mL (peso seco) - além do grupo controle, que recebeu apenas meio de cultura. Transcorridas 24 h, ao meio de cultura contendo foram adicionados 10 μL de MTT (3-(4, 5 dimetil tiazole-2il)-2, 5 difenil tetrazólio brometo) (5 mg/mL em PBS (tampão fosfato salino), seguido de nova incubação por 3 h. Finalmente, o meio foi removido e os cristais de formazan solubilizados em 100 μL/poço de DMSO (dimetilsulfóxido). As placas foram mantidas em agitação por 20 min, na ausência de luz, à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas (UV-vis SpectraMax 190 Microplate

Reader). A partir do ensaio MTT, foram calculados os percentuais de viabilidade celular. Realizaram-se três experimentos independentes em sextuplicata (n = 18). Os valores de células viáveis foram obtidos de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{CONTROLE}}$$

2.2.2 Método do corante vermelho neutro

Fibroblastos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, em placas de 96 poços (100 μL /poço) e mantidos em estufa incubadora (37 °C, 5% CO_2) por 24 h. As células foram tratadas com concentrações crescentes do EA (0,1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), durante 24 h. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} , seguido da adição de 100 μL /poço de vermelho neutro (VN, 25 $\mu\text{g/mL}$), diluído em meio de cultura DMEM, contendo 10% SFB. O corante foi removido após 3 h de incubação em estufa (37 °C, 5% CO_2) e as células novamente lavadas com 150 μL de PBS contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} , adicionando-se 100 μL /poço da solução contendo água, etanol e ácido acético glacial (49: 50: 1, v/v/v) à dessorção do VN. As placas foram mantidas em agitador de microplacas durante 30 min, protegidas da luz. A absorbância foi determinada a $\lambda = 540$ nm em leitor de microplacas (Spectramax Paradigm Molecular Device – Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram calculados conforme descrito no item 2.2.1 a partir de dados oriundos de três experimentos independentes em sextuplicata (n = 18).

2.3 DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

O protocolo a seguir foi elaborado conforme indicações do fabricante do *Click-iT® Plus EdU* Alexa Flúor 488 (Merck Milipore, Germany). Fibroblastos 3T3 foram inoculados (5×10^4 células/poço) em meio de cultura DMEM, contendo 10% SFB, sobre lamínulas revestidas com polilisina para facilitar a adesão celular (10 μL /lamínula), em placas de 6 poços (1 mL/poço), seguido de incubação em estufa (37 °C, 5% CO_2) por 24 h. As células foram tratadas com concentrações crescentes do EA (0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Células do grupo controle receberam somente meio de cultura DMEM contendo 10% SFB. Em seguida aos tratamentos, procedeu-se à adição de EdU 10 μM (concentração final), incubando as

células por um período de 24 h em estufa (37 °C, 5% CO₂). Após o período de tratamento, conduziu-se a fixação das células com paraformaldeído (PFA) a 3,7% (v/v) em PBS (1 mL/poço), por 15 min, em temperatura ambiente. O fixador foi removido, seguido por 2 lavagens com BSA (albumina sérica bovina) 3% em PBS (1mL/poço). Seguiu-se a adição de Triton X-100 a 0,5% em PBS (1 mL/poço), por 20 min, em temperatura ambiente, para permeabilização. Transcorrido este tempo, os cultivos celulares foram lavados (2 ×) com solução de BSA 3% e adicionado a cada poço 100 µL do *click* Edu. Após 30 min de incubação em temperatura ambiente e na ausência de luz, os poços foram novamente lavados (3 ×) com BSA 3%. Prosseguiu-se à incubação e contra-coloração com DAPI em PBS (4'-6-diamino-2-fenilindol, 1: 1000, v/v) por 2 min, à temperatura ambiente, para marcação dos núcleos das células. A solução contendo DAPI foi removida e as lamínulas foram preparadas com solução de montagem para análise. As marcações fluorescentes foram observadas e fotografadas em microscópio confocal (Leica DMI6000 B) em magnificação de 40 ×. As imagens dos núcleos foram quantificadas utilizando o *software* Image J 1.50i (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA) e com auxílio do plugin “NII_Plugin” disponível em <http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>. Realizaram-se três experimentos independentes em duplicata (n = 6). Os dados foram expressos como percentual de células em proliferação, conforme equação a seguir:

$$\text{Proliferação celular (\%)} = \text{Núcleo}_{\text{Edu}} \times 100 / \text{Núcleo}_{\text{DAPI}}$$

2.4 DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

Fibroblastos da linhagem 3T3 foram inoculados (2×10^5 células/poço) em meio DMEM contendo 10% SBF, em placas de 24 poços, previamente revestidas com polilisina (200 µL/poço), por 30 min, antes da inoculação celular, e cultivada em estufa (37°C, 5% CO₂) até a confluência. O meio de cultura foi removido e substituído por solução de PBS contendo Ca⁺² e Mg⁺², seguido de uma raspagem linear realizada à monocamada celular com uma ponteira de micropipeta estéril (200 µL), com o intuito de induzir uma solução de continuidade. Para remoção de quaisquer resíduos celulares, a monocamada celular foi lavada com PBS contendo Ca⁺² e Mg⁺². Após a raspagem, as células receberam os tratamentos com

concentrações crescentes do EA (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL), por 24 h. Aos tratamentos foram adicionados 5 µL/poço de mitomicina C (2 mg/mL). Uma câmera fotográfica (Motic Images Plus 2.0) acoplada ao microscópio invertido (Olympus IX83) foi utilizada para capturar micrografias das células nos tempos 0 h (imediatamente após raspagem linear) e após as 24 h dos tratamentos. As micrografias foram realizadas na mesma região central de cada poço, tanto no tempo 0 h quanto no tempo 24 h, a fim de se observar a migração do mesmo grupo celular. As imagens foram analisadas com o auxílio do *software* ImageJ 1.50i (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA). Realizaram-se três experimentos independentes em triplicata (n = 9). Através da comparação de micrografias obtidas nos tempos 0 e 24 h foi calculado o percentual de fechamento da área lesionada através da seguinte equação (LEE et al., 2017):

$$\text{Oclusão da área (\%)} = (\text{Área PRÉ-MIGRAÇÃO} - \text{Área PÓS-MIGRAÇÃO}) \times 100 / \text{Área PRÉ-MIGRAÇÃO}$$

2.5 DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO

Fibroblastos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) em meio de cultura DMEM contendo 10% SFB, em placas de 96 poços e incubados em estufa (37 °C, 5% CO₂) até atingirem confluência. As células foram tratadas com concentrações crescentes do EA (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL), durante 72 h. A cada 24 h, o meio de cultura dos tratamentos foi substituído, mantendo-se os tratamentos com o EA. Ao final do período de incubação de 72 h, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS contendo Ca⁺² e Mg⁺² e fixadas com fluido de Bouin (15 mL solução aquosa saturada de ácido pícrico 1,3% - m/v, 5 mL formaldeído 35% -v/v, 1 mL ácido acético glacial), por 1 h. A solução fixadora foi removida e o excesso eliminado através de lavagem com água corrente (10 min). Subsequentemente, as células foram incubadas por 1 h na presença do corante *Sirius Red* (1 mg/mL), em solução saturada de ácido pícrico (1,3%), seguido de uma lavagem com solução de ácido clorídrico 0,01 M. O colágeno foi quantificado pela extração do corante com hidróxido de sódio 0,1 M e leitura de absorbância ($\lambda = 550$ nm) em leitor de microplacas (Spectramax Paradigm Molecular Device – Sunnyvale, CA, EUA) (TULLBERG-REINERT; JUNDT, 1999). Realizaram-se três experimentos independentes em quadruplicatas (n = 12) e os resultados foram expressos como percentual de incremento na produção de colágeno em relação ao controle conforme equação a seguir:

$$\text{Incremento da síntese de colágeno} = \text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} \times 100 / \text{Abs}_{\text{CONTROLE}}$$

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os dados foram coletados, sumarizados e avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de suas variâncias, seguido da análise de variância (ANOVA), complementada por teste de comparação múltipla de Dunnett ou Tukey, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, 5%. Os dados foram analisados com suporte do programa GraphPad InStat® 6 e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR PELOS MÉTODOS DO MTT E DO VERMELHO NEUTRO

Os resultados das análises fitoquímicas e quimiométricos descritos nos Capítulo I e II, respectivamente, apresentam dados interessantes sobre o perfil químico dos EAs. Neste cenário, as amostras de inverno indicam serem as mais promissoras, com destaque para o período amostral de junho de 2015. Sendo assim, ela foi selecionada para dar continuidade às análises de atividades biológicas.

Para avaliar a citotoxicidade através da viabilidade celular, fibroblastos 3T3 foram expostos ao EA em concentrações crescentes (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, por peso seco) durante 24 h. O período de tratamento de 24 h, a concentração máxima administrada do EA, bem como a densidade celular do inóculo, foram estabelecidas com base em protocolos estabelecidos por agências reguladoras, como OECD e ANVISA (OECD, 2004; ANVISA, 2012). Além disto, levando em consideração que o intuito é de que este princípio ativo possa ser um candidato às formulações cosméticas/farmacêuticos, o mesmo seria aplicado na pele em períodos diários, considerando também, a sua fotosensibilidade.

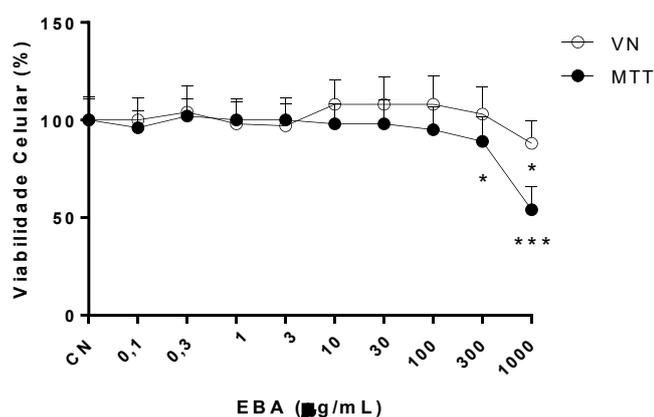
Após o período de tratamento, as células foram avaliadas com relação à sua viabilidade por dois ensaios distintos: (i) ensaio colorimétrico do MTT; (ii) incorporação do vermelho neutro (VN).

Segundo o Guia para Avaliação de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), alguns ensaios são propostos para a avaliação de segurança de produtos. Devido à evolução técnico-científica, na década de 80 iniciou-se o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, em substituição ao uso de animais de laboratório. Alguns métodos alternativos podem ser utilizados na total substituição em estudos com animais, enquanto outros podem complementar os dados obtidos, auxiliando na redução de utilização de animais empregados em todo projeto. Os métodos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade utilizando o MTT e o VN são aceitos e propostos para determinação da citotoxicidade ocular e sensibilização. No primeiro método, a citotoxicidade é medida com o auxílio de um corante vital que é metabolizado pelas mitocôndrias, enquanto que no método do VN, o corante é metabolizado pelos lisossomos. Em ambos os ensaios a captação dos corantes pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de viabilidade celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% da viabilidade celular).

Os resultados apresentados na figura 17 sugerem que o EA da amostra de junho apresenta efeito citotóxico apenas nas concentrações mais altas, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (método MTT), diminuindo a viabilidade celular em $11 \pm 12,8 \%$ e $46 \pm 11,6 \%$, respectivamente. No método com o corante VN, apenas a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou efeito citotóxico, diminuindo a viabilidade em $12 \pm 11,6 \%$. De acordo com estes achados, é possível indicar que ambos os métodos apresentam similaridade no que diz respeito ao efeito do EA na viabilidade celular, entretando, é possível sugerir uma maior sensibilidade/toxicidade do EA no metabolismo celular relacionado à função mitocondrial.

O valor de IC50, ou seja, a concentração que inibe 50% de uma população celular, não foi calculado neste experimento, pois as concentrações administradas não causaram redução maior que 50% da viabilidade celular.

Figura 17 - Efeito do EA (0,1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) de cascas de banana (amostra - junho de 2015) sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 h de tratamento, consoante aos métodos colorimétricos utilizados, MTT e o VN. Os resultados são expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolos indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. * indica $p < 0,05$, *** indica $p < 0,001$.



Fonte: Produção da própria autora.

Dados na literatura sugerem que os compostos fenólicos apresentam citotoxicidade, e comumente são relatados estudos utilizando extratos oriundos de diferentes espécies vegetais com ação em mecanismos antitumorais (TANG et al., 2013; LIU et al., 2012; LOPES, 2012). Entretanto, estas evidências experimentais mostram que as células tumorais são mais susceptíveis à morte celular em comparação às células normais. Desta forma, a toxicidade *in vitro* do EA parece resultar de seus conteúdos relevantes de compostos fenólicos. Diferentes mecanismos de ação dos constituintes do extrato e vários níveis de suscetibilidade da célula podem ser responsáveis pelos efeitos encontrados nos fibroblastos 3T3 expostos ao EA, sugerindo a existência de um efeito sinérgico.

Por conta da citotoxicidade apresentada nas concentrações de 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ com o método do MTT, foram selecionadas apenas as concentrações até 100 $\mu\text{g/mL}$ para dar continuidade às análises de atividades biológicas.

3.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

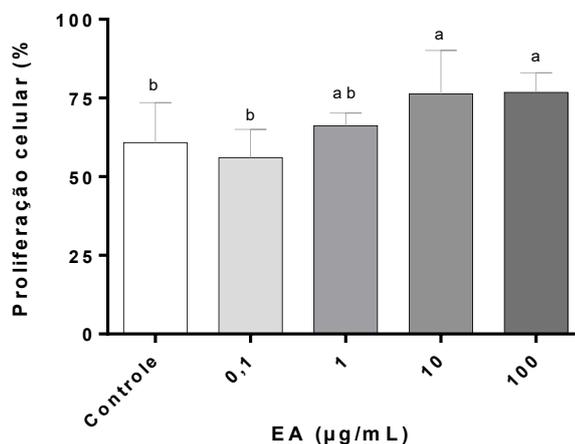
A cicatrização de feridas é caracterizada por uma série de eventos orquestrados, a saber: hemostasia, inflamação, formação de tecido de granulação e remodelação tissular. Durante a fase de formação de tecido de granulação, a população de fibroblastos é estimulada a proliferar e vários fatores de crescimento podem promover a divisão celular neste momento (SILVA et al., 2013). Assim, a ativação de mecanismos de proliferação celular é um efeito desejável dos compostos utilizados para promover a regeneração do tecido ou a cicatrização de feridas.

A proliferação celular é caracterizada pela síntese de DNA durante a fase S do ciclo celular. A abordagem tradicional para medir a síntese de DNA e a proliferação celular é determinar a incorporação de timidina à medida que as células entram na fase S. O uso de EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) (Merck Millipore) como um análogo de nucleosídeo de timidina é uma melhoria significativa em comparação com os ensaios clássicos de proliferação de células, como BrdU, por exemplo. Em contraste com os kits de ensaio BrdU, os ensaios de proliferação de células EdU não são baseados em anticorpos e, portanto, não requerem desnaturação de DNA para a detecção do nucleosídeo incorporado. Em vez disso, o ensaio de proliferação de células EdU utiliza-se de reação de *click* para detecção em uma variedade de leituras fluorescentes. Além disso, este método fornece detecção mais rápida além de ser compatível com citometria de fluxo e microscopia (MILIPORE, 2015).

Conforme já mencionado, a proliferação celular é um dos mecanismos celulares importantes para o sucesso da cicatrização cutânea. Sendo assim, para avaliação do efeito do EA neste mecanismo celular, fibroblastos 3T3 foram incubados com diferentes concentrações do EA por 24 h.

Os resultados demonstram que os tratamentos com EA apresentaram uma diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$ - Figura 18). A maior taxa proliferativa foi observada com o tratamento de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($76,3 \pm 13,8 \%$), seguido da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($75,8 \pm 6,2 \%$), porém sem diferença estatística. Células tratadas somente com meio de cultura (controle) apresentaram $60,8 \pm 12,7 \%$ de marcação positiva para o EdU.

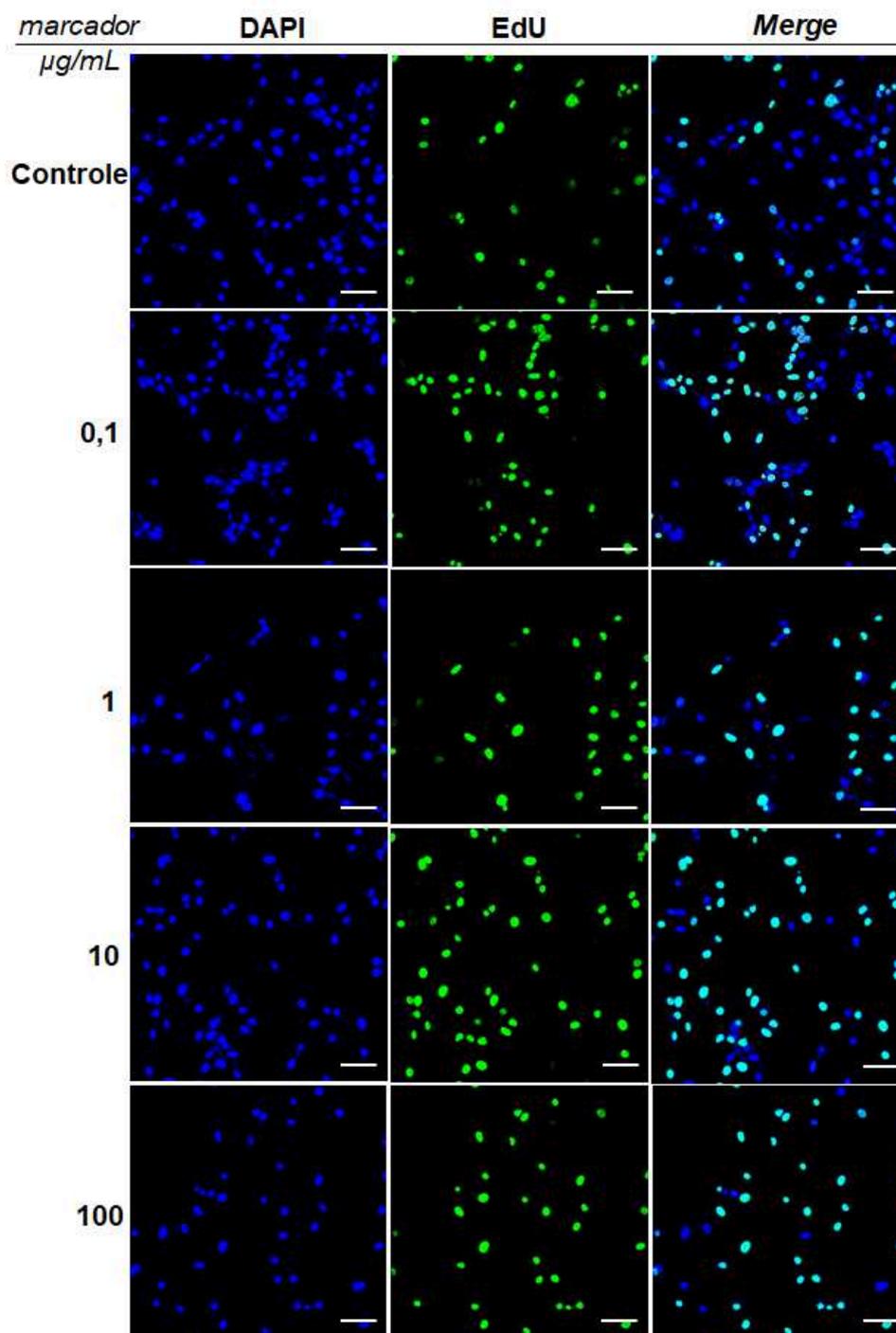
Figura 18 - Proliferação de fibroblastos 3T3 após tratamentos com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h através da técnica de imunofluorescência, utilizando-se *click* EdU como marcador. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Os resultados do ensaio do VN (item 3.1) revelaram um sutil aumento da viabilidade celular, quando da exposição ao EA na concentração de 10 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este aumento da viabilidade celular poderia estar relacionado ao aumento da proliferação das células. A marcação celular com EdU demonstra um aumento na proliferação celular. Desta forma, hipoteticamente, aquele aumento verificado no ensaio do VN poderia estar relacionado ao aumento da população celular. A figura 19 apresenta as imagens representativas deste ensaio com as marcações para DAPI e EdU, utilizadas para a análise quantitativa.

Figura 19 - Micrografias representativas (400 ×) da imunofluorescência após marcação com EdU e DAPI para avaliação da proliferação celular de fibroblastos 3T3, após 24 h de exposição aos tratamentos com EA (0,1 – 100 µg/mL). Núcleos azuis: núcleos totais marcadas com DAPI. Núcleos verdes: núcleos positivos para EdU (células em proliferação). *Merge* representa a sobreposição dos filtros para DAPI e EdU. Escala: barra = 50 µm.



Fonte: Produção da própria autora.

O estudo anterior conduzido por Pereira (2014) no LMBV avaliou a ação do extrato bruto aquoso (EBA) de cascas de banana em modelo de lesão por excisão em camundongos. Foi verificado que o EBA estimulou a maior redução de área lesionada, quando comparado a outros tratamentos ($98,72 \pm 0,01$ %). Além disso, foi observada uma cicatrização mais uniforme, finalizando com o crescimento de pelo em toda área lesionada. Ainda segundo a autora, a contração do tecido é um mecanismo que ocorre imediatamente após a lesão, culminando em um conjunto de atividades celulares, entre as quais podemos citar a proliferação celular e a migração de fibroblastos para o leito da lesão. Associando aqueles resultados aos do presente estudo, infere-se que os metabólitos presentes do EA estimulam um comportamento proliferativo nos fibroblastos 3T3 e que os compostos fenólicos podem ser determinantes neste mecanismo. Conforme relatado no estudo de Thakur e colaboradores (2011), os polifenóis são responsáveis pela cicatrização de feridas devido à atividade antioxidante e de eliminação de radicais livres, que são conhecidas por reduzir a peroxidação lipídica.

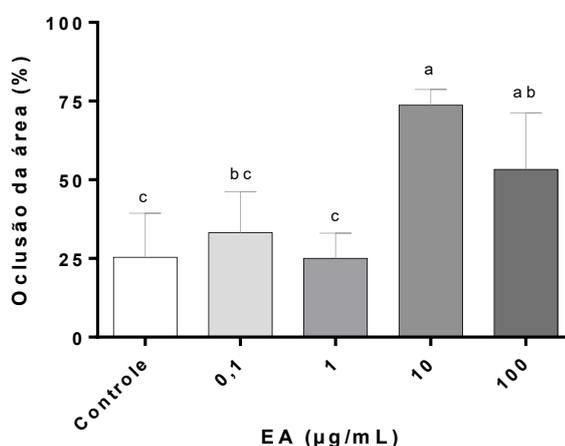
3.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular é um mecanismo essencial para vários processos de organismos unicelulares e multicelulares. Exemplos de tais processos incluem cicatrização de feridas, respostas imunes e a formação de tecidos (GLAß et al., 2012). O ensaio de indução de ranhura em monocamada celular coalescida (*scratch assay*) tem sido o método *in vitro* mais comum à análise de compostos com propriedades anti- e pró-migração, devido ao seu baixo custo e simplicidade (VANG MOURITZEN; JENSSEN, 2018). Resumidamente, este ensaio é uma técnica *in vitro* padrão para sondar a migração celular coletiva em duas dimensões: uma área livre de células é criada em uma monocamada confluyente por exclusão física, ou pela remoção das células da área através de danos mecânicos. A exposição à área livre induz as células a migrarem (JONKMAN et al., 2015). Deste modo, a fim de investigar a ocorrência de processos concomitantes à proliferação celular, foi utilizado o ensaio do *scratch* para avaliar o efeito do EA sobre o mecanismo de migração de fibroblastos 3T3.

Para garantir a detecção verdadeira da migração, pré-tratamento com mitomicina-C, um inibidor da síntese de DNA, foi adicionado ao protocolo (JONKMAN et al., 2015).

De acordo com os dados da oclusão da área de intervalo em relação às concentrações administradas do EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$), o tratamento com EA a 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentou o melhor efeito pró-migração ($73,7 \pm 5,9 \%$), quando comparado ao controle ($24,4 \pm 14,7$, $p < 0,0001$). Este tratamento não diferiu estatisticamente da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($56,3 \pm 18,2\%$) que também diferiu significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle (Figura 20).

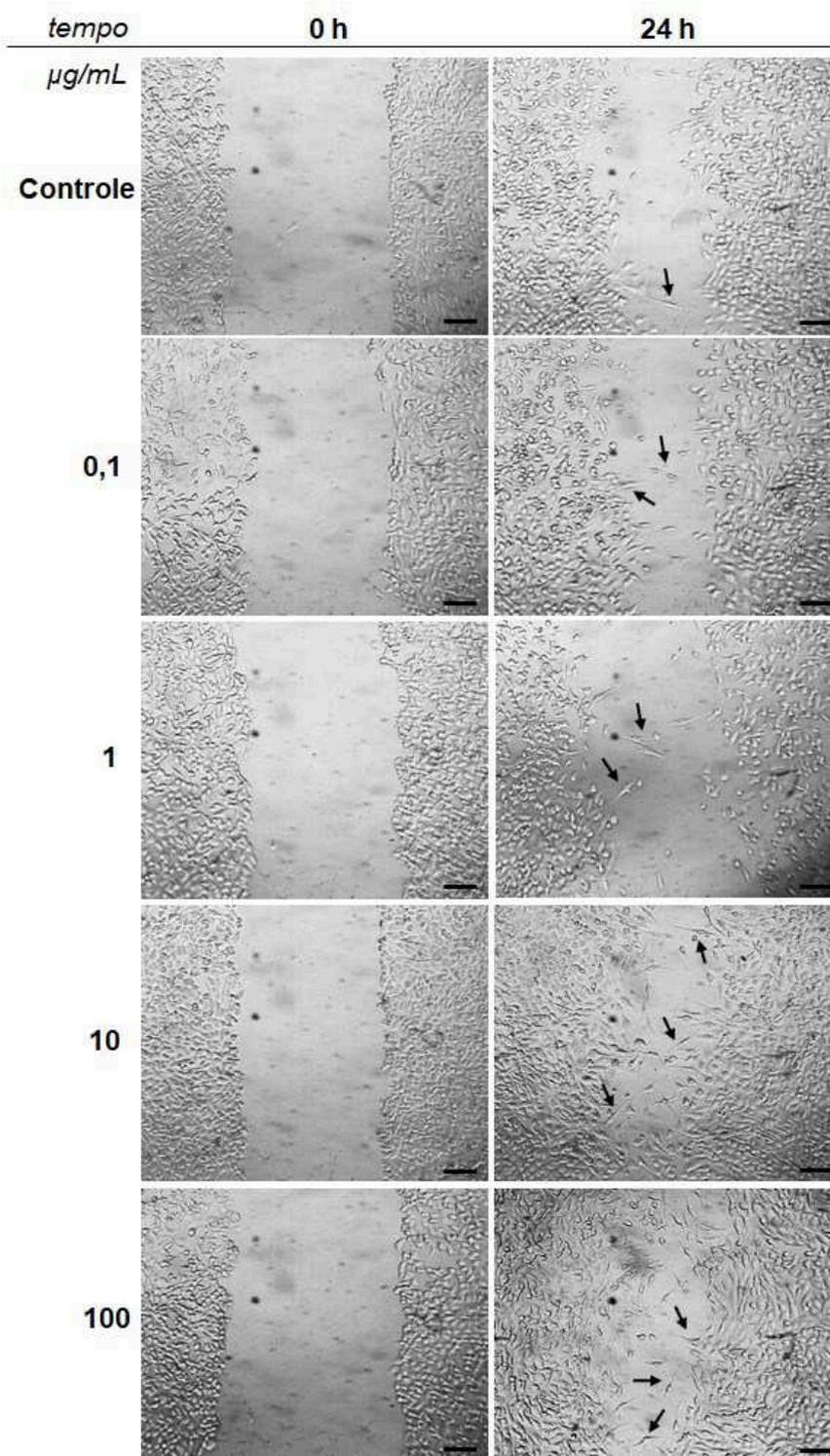
Figura 20 - Oclusão (%) da área correspondente à migração de fibroblastos 3T3 após a indução da solução de continuidade à monocamada celular e adição dos tratamentos com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$), por 24 h. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Em uma comparação visual das imagens referentes à figura 21, verifica-se que o EA possui um potencial pró-migração de fibroblastos 3T3, comparativamente ao controle, sendo tal efeito mais proeminente nos tratamentos de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 21 - Micrografias representativas do ensaio de migração celular (*scratch assay*) de fibroblastos 3T3 expostos à diferentes concentrações do EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$), nos tempos 0 h e 24 h após a indução da solução de continuidade à monocamada celular (250 \times). Escala: barra = 100 μm . Setas indicam células fusiformes, característica que sugere o processo migratório.



Fonte: Produção da própria autora.

Em geral, a taxa na qual uma população celular se dispersa é impulsionada pelos efeitos combinados da migração e da proliferação celular (MATSIKA et al., 2018). Utilizando a mitomicina-C como inibidor de síntese de DNA e, conseqüente, de proliferação celular, o ensaio do *scratch* demonstra efetivamente o efeito indutor de migração celular do EA. Conforme verificado anteriormente no ensaio de proliferação celular (item 3.2), o EA estimula a proliferação de fibroblastos 3T3 nas concentrações mais altas (10 e 100 µg/mL). É possível verificar (Figura 21) naquelas concentrações que, após 24 h, as células migrantes apresentaram uma morfologia fusiforme (indicadas por setas). Esta condição pode ser associada à migração celular, que requer um movimento sustentado para frente da membrana plasmática na borda anterior da célula, onde quatro diferentes protrusões da membrana plasmática podem ser encontradas: lamelipódios, filopódios, *blebs* e invasopódios. Esses diferentes tipos de saliências são impulsionados pela polimerização de actina espacialmente e temporariamente regulada por fatores de nucleação de actina (TASHIRO; IMOTO, 2016).

Realizou-se um estudo piloto avaliando o efeito do EA no processo de migração celular, nas mesmas condições, entretanto, sem a adição da mitomicina-C (dados não apresentados). Verificou-se que a oclusão da área de intervalo com a administração de 0,1 - 100 µg/mL do EA foram de 63 até 85%, onde o controle apresentou 60%. Estes dados sustentam a suposição de que ocorra, além do efeito pró-migratório, o proliferativo. Complementarmente, foram realizados testes de segurança para avaliar a concentração de mitomicina-C segura a fim de inibir a proliferação dos fibroblastos 3T3, sem causar toxicidade (dados não apresentados).

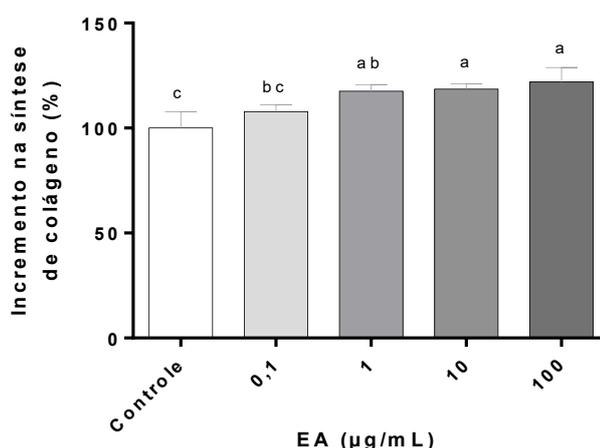
3.4 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO

No processo de cicatrização, a fase proliferativa em particular, envolve a deposição de novas proteínas para a oclusão da lesão, restabelecimento da integridade do tecido e para substituir proteínas que foram danificadas. Grande parte das novas proteínas depositadas durante a cicatrização de lesões é composta por colágeno, o principal componente proteico do tecido conjuntivo (ZHOU et al., 2013).

O conteúdo de hidroxiprolina, um aminoácido essencial à síntese das fibras de colágeno, foi avaliado nos estudos conduzidos por Pereira (2014) em tecidos de camundongos em processo de cicatrização tratados com EBA oriundos de cascas de banana. Foi verificado um aumento da concentração deste aminoácido nos grupos tratados com o EBA, onde a

principal diferença estatística foi observada aos três dias do período experimental ($p < 0,001$). Com bases nestes achados e, aliado aos resultados do efeito positivo do EA nos mecanismos de proliferação e migração de fibroblastos 3T3 do presente estudo, a síntese de colágeno também foi analisada. Para tal, estas células foram expostas a diferentes concentrações do EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$), por 72 h. A eficácia de indução do EA na síntese de colágeno foi avaliada pela coloração com *Sirius red*, que se destina a marcação de fibras colágenas. Os dados desta análise demonstram que o EA estimulou a síntese de colágeno conforme exposto na figura 22.

Figura 22 - Incremento na síntese de colágeno avaliado com o corante *Sirius red* por fibroblastos 3T3 após tratamentos com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

O incremento significativo na síntese de colágeno é observado a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, que apresentou um aumento de $17,6 \pm 3,1$ % quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). Os dados mais relevantes estão relacionados ao aumento significativo de $21,9 \pm 6,8$ % alcançados com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ do EA em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Apesar disto, os tratamentos dos fibroblastos com EA nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentam diferenças significativas.

O fibroblasto é um dos principais tipos celulares que responde à fase inflamatória no processo de reparação/regeneração cutânea. Sinais inflamatórios ativam a proliferação e

maturação destas células (XU et al., 2013). Desta forma, estudos que determinem o comportamento deste tipo celular são relevantes para demonstrar a eficácia das amostras testes candidatas a indutora daqueles processos em lesões.

O uso de produtos naturais provenientes de plantas para tratamento de feridas tem sido praticado desde a antiguidade. Os polifenóis têm sido amplamente utilizados em medicamentos tradicionais para tratar várias doenças crônicas da pele, além de serem conhecidos pelos seus benefícios na cicatrização e efeitos anti-inflamatórios quando aplicados topicamente (YANG et al., 2016) .

Em referência aos constituintes do EA, os compostos bioativos podem de maneira rápida e condicional, modular as funções biológicas das células (TASHIRO; IMOTO, 2016). No tocante à classe de compostos fenólicos, estudos anteriores demonstram que eles exercem efeitos benéficos sobre a migração de células da pele e, conseqüentemente, da cicatrização de lesões (HOSKIN et al., 2019). De acordo com Xu e colaboradores (2013), um agente terapêutico selecionado para o tratamento de lesões deve, idealmente, melhorar uma ou mais fases do processo de cura, sem produzir efeitos colaterais deletérios. Mediante aos dados expostos, pode-se concluir que o EA estimula a produção de colágeno, devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos, e este evento poderia estar relacionado, ou até mesmo ser determinante, para o efeito positivo encontrado também nas taxas de proliferação e da migração celular. Segundo Castillo-Briceño e colaboradores (2011), a interação de fibroblastos com uma superfície colagenosa modula sua ligação, morfologia, taxa de proliferação e migração. A adesão de fibroblastos ao colágeno e a outros componentes estruturais da matriz extracelular tem sido amplamente descrita, sendo considerada importante na morfogênese, remodelação tecidual e nos processos de cicatrização cutânea.

No que se refere ao composto majoritário identificado no EA, ácido gálico (Capítulo I), apesar de promover benefícios à saúde, os papéis fisiológicos deste composto polifenólico na pele permanecem ilucidados. A este respeito, Yang e colaboradores (2016) mostraram que o AG é um potencial antioxidante que regula diretamente a expressão de genes antioxidantes. Além disso, nos estudos deste autor, o AG acelerou a migração celular de queratinócitos e fibroblastos em condições normais e hiperglicídicas.

Devido ao seu conteúdo em compostos fenólicos, apresentados no Capítulo I, o EA das cascas de banana pode ser considerado como uma fração ativa que potencialmente melhora a cicatrização cutânea devido a sua capacidade de estimular a produção de colágeno

e influenciar nos mecanismos de proliferação e migração celular, eventos estes que estão diretamente relacionados ao sucesso da cicatrização da pele.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os dados expostos sobre o efeito do EA em fibroblastos 3T3, assume-se que o EA:

- Não apresenta citotoxicidade em concentrações de até 100 µg/mL;
- Estimula a proliferação e migração celular a partir de 10 µg/mL;
- Potencializa a produção de colágeno a partir de 1 µg/mL;
- É um candidato a formulações de produtos farmacêuticos/cosméticos para o reparo e cicatrização de lesões cutâneas.

CAPÍTULO IV

Antes feito do que perfeito,
mas nunca de qualquer jeito.
(Dito popular)

Estudo do efeito fotoprotetor do extrato aquoso de cascas de banana cultivar Prata Anã (*Musa sp.*) em fibroblastos expostos à radiação ultravioleta-B

1 INTRODUÇÃO

A pele é a cobertura externa e o maior órgão do corpo humano e, embora exerça numerosas funções fisiológicas, sua composição muda com a superexposição à poluição ambiental e à radiação solar (LOPES et al., 2017a). Acredita-se que a exposição excessiva ou repetida à irradiação UV, particularmente a UVB, seja responsável pela maioria das queimaduras solares e danos à pele (HWANG et al., 2013). Foi demonstrado que as radiações UVB e UVA produzem espécies reativas de oxigênio nas células da pele, causando danos no DNA, levando à mutações gênicas e à proliferação celular anormal (RYOO et al., 2001). Além disso, o estresse oxidativo resultante dessa exposição crônica acelera a atividade das metaloproteinases de matriz que degradam o colágeno na matriz extracelular (HWANG; PARK; SUN, 2014). O colágeno desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura da derme cutânea (SUN et al., 2016) e sua degradação é a principal causa do dano em tecido conjuntivo que ocorre no fotoenvelhecimento (BRAVO et al., 2017).

A fotoproteção associada aos produtos naturais representa uma estratégia importante na proteção da pele contra a radiação solar UV, especialmente a UVB (OLTEANU et al., 2014). Compostos polifenólicos antioxidantes de espécies vegetais podem prevenir a citotoxicidade induzida pela radiação UV, demonstrando a importância destes metabólitos para o desenvolvimento de terapias preventivas contra o fotoenvelhecimento (CHAN et al., 2014).

Nas últimas décadas, a banana (*Musa sp.*) tem sido avaliada por interesses científicos e medicinais como fonte importante de compostos bioativos, como flavonoides, antocianinas, taninos condensados e amins biogênicas (LOPES et al., 2017b). A casca de banana contém polifenóis com várias propriedades medicinais, em particular, a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (APRIASARI; SUHARTONO, 2014).

Muitas são as propriedades atribuídas aos compostos naturais devido à sua contribuição para a saúde humana e seus múltiplos efeitos biológicos. No entanto, não há dados disponíveis na literatura que demonstrem os efeitos fotoprotetores de compostos

bioativos extraídos da casca de bananas em fibroblastos expostos à radiação UV. Assim, neste estudo, avaliamos o efeito de fotoproteção do EA de cascas de banana cultivar Prata Anã (*Musa* sp.) contra danos causados pela radiação UVB em linhagem de fibroblastos de camundongo BALB/3T3 clone A31. Para tal, culturas celulares foram expostas a tratamentos com o EA, seguido da análise da viabilidade celular, morfologia nuclear e celular e síntese de colágeno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO EA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Para determinação do efeito do tempo de exposição sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3 utilizou-se o método colorimétrico do brometo de 3-[4, 5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma®) (MOSMANN, 1983). Após atingirem 80% de confluência, as células em cultivo foram tripsinizadas, neutralizadas com meio de cultura DMEM, centrifugadas (2.000 rpm - por 3 minutos), ressuspensas em meio de cultura, coletadas e diluídas (1: 1) em solução corante Azul de Tripán (0,4 % - m/v) para contagem em câmara de Neubauer. Em placas de 96 poços os fibroblastos 3T3 foram inoculados a uma densidade de 1×10^4 células/poço e mantidos em estufa incubadora (37 °C, 5% CO₂) por 24 h, possibilitando a adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi substituído por outro, contendo concentrações crescentes do EA (0,1, 1, 10 e 100 µg/mL, peso seco). As células foram tratadas com EA ao longo de 1, 12 e 24 h em estufa incubadora (37 °C, 5% CO₂). Transcorridos os tempos de incubação, foram adicionados 10 µL/poço de MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de re-incubação (37 °C, 5% CO₂) das células por 3 h. Finalmente, o meio de cultura contendo o MTT foi retirado e os cristais de formazan solubilizados em 100 µL/poço de DMSO. As placas foram mantidas em agitação por 20 min, protegidas da luz, à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas (UV-vis SpectraMax 190 Microplate Reader). Realizaram-se três experimentos independentes em quadruplicatas (n = 12). A partir do ensaio do MTT, foram obtidos os percentuais de viabilidade celular de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{CONTROLE}}$$

2.2 IRRADIAÇÃO UVB

Como fonte de radiação UVB, utilizou-se um simulador solar (Analítica), com pico máximo de radiação UVB em 302 nm, fixado a 25 cm de distância da placa de cultura. Adicionalmente, um radiômetro (Medidor de UV Tecsisel) equipado com sensor para detectar a radiação UVB foi acoplado ao sistema experimental.

Os fibroblastos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, em placas de 96 poços (100 μ L por poço) e incubados em estufa (37 °C, 5% CO₂). Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e adicionaram-se 100 μ L de PBS contendo Ca⁺² e Mg⁺². As placas foram expostas às doses de radiação UVB (40, 80, 160 e 320 mJ/cm²), enquanto as culturas celulares controles permaneceram protegidas de radiação. Após a irradiação, adicionou-se meio de cultura e as placas foram novamente incubadas. Vinte quatro horas após, procedeu-se a avaliação da viabilidade celular, através do método colorimétrico do MTT, conforme item 2.1. A dose de radiação UVB que causou um decréscimo de 50% na viabilidade celular foi selecionada para avaliar o potencial fotoprotetor do EA (OLIVEIRA et al., 2018). Os valores foram expressos pela média de cada grupo \pm desvio padrão, em percentual de células viáveis. Realizaram-se três experimentos independentes em quadruplicatas (n = 12).

2.3 DETERMINAÇÃO DO EFEITO FOTOCITOPROTETOR

Em quatro placas de 96 poços, fibroblastos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) e mantidos em estufa incubadora por 24 h (37 °C, 5% CO₂). Após o período de adesão, as células foram submetidas a dois tipos de protocolos para a avaliação do potencial fotoprotetor do EA:

- *Pré-tratamento*: em 2 placas as células foram tratadas com concentrações crescentes do EA (0,1 – 100 μ g/mL) em meio DMEM contendo 10 % de SFB por 1 h. O meio foi substituído por PBS contendo Ca⁺² e Mg⁺² e uma das placas foi exposta à irradiação (160 mJ/cm²), correspondente à 28 segundos de exposição;

- *Pós-tratamento*: em 2 placas o meio foi substituído por PBS contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} e uma das placas foi exposta à irradiação (160 mJ/cm^2). Após, as células foram tratadas com concentrações crescentes do EA ($0,1 - 100 \text{ }\mu\text{g/mL}$) em meio DMEM contendo 10% de SFB por 1 h.

As células foram mantidas em estufa incubadora ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) e após 24 h procedeu-se à avaliação da viabilidade celular, através do método do MTT, conforme item 2.1. Os valores foram expressos pela média de cada grupo \pm desvio padrão, em percentual de células viáveis. Realizaram-se três experimentos independentes em quadruplicatas ($n = 12$). Considerou-se o controle positivo CP = EA (-) UVB (-); e controle negativo CN = EA (-) UVB (+).

2.4 DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO

Fibroblastos 3T3 foram inoculados (1×10^4 células/poço) em meio de cultura DMEM contendo 10% SFB, em 2 placas de 96 poços ($100 \text{ }\mu\text{L}$ por poço) e incubados em estufa ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) até atingirem a confluência. O meio foi removido, os poços lavados com PBS contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} e adicionou-se novamente $100 \text{ }\mu\text{L}$ deste PBS. Uma das placas foi irradiada com UVB (160 mJ/cm^2), enquanto a outra permaneceu protegida da luz. Após, procedeu-se os tratamentos com concentrações crescentes do EA ($0,1, 1, 10$ e $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$), durante 72 h, conforme descrito no Capítulo III, item 2.4. Realizaram-se três experimentos independentes em quadruplicatas ($n = 12$) e os resultados foram expressos como percentual de incremento na produção de colágeno em relação ao controle (\pm desvio padrão), conforme equação:

$$\text{Incremento da síntese de colágeno} = \text{Abs}_{\text{AMOSTRA}} \times 100 / \text{Abs}_{\text{CONTROLE}}$$

Considerou-se o controle positivo CP = EA (-) UVB (-); e controle negativo CN = EA (-) UVB (+).

2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR

Para avaliar as alterações morfológicas nucleares, os fibroblastos 3T3 foram inoculados (5×10^4) em lamínulas de 2×2 mm - pré-revestidas com 10 μ L de solução de Polilisina para facilitar a adesão celular, em placas de 6 poços. Após o período de adesão celular, procedeu-se ao pré-tratamento, conforme descrito item 2.3. Após 24 h de incubação, as células foram fixadas com PFA a 4% em PBS (m/v), durante 2 h, seguida da marcação nuclear com DAPI em PBS (1: 1000, v/v) por 2 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. As amostras foram analisadas por microscopia confocal (Leica DMI6000 B).

As análises morfométricas dos núcleos foram realizadas de acordo com Filippi-Chiella e colaboradores (2012) e os protocolos estão disponíveis no website <http://www.ufrgs.br/labsinal/nma/>. Foram obtidas, no mínimo, 4 imagens de cada tratamento. Foram analisados, no mínimo, 400 núcleos por tratamento. As análises foram realizadas após instalação do plugin NMA no software Image J 1.50i (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA). Os núcleos que estavam sobrepostos ou muito próximos uns dos outros foram excluídos da análise. Os núcleos foram circulos para avaliação morfométrica dos dados, tais como: área, aspecto, razão radial e circularidade. Durante a análise, os núcleos foram classificados como: normais, irregulares, pequenos e regulares. Os dados foram apresentados como um gráfico da Área versus Índice de Irregularidade Nuclear (NII), que separa os núcleos considerando seu fenótipo morfométrico. As porcentagens de núcleos normais, pequenos regulares, grandes e regulares ou irregulares foram determinadas conforme descrito por Filippi-Chiella e colaboradores (2015). Realizaram-se três experimentos independentes em triplicata (n = 9).

Considerou-se o controle positivo CP = EA (-) UVB (-); e controle negativo CN = EA (-) UVB (+).

2.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Para avaliar as alterações morfológicas celulares, os fibroblastos 3T3 foram inoculados (5×10^4) em lamínulas de 2×2 mm - pré-revestidas com 10 μ L de solução de polilisina para facilitar a adesão celular, em placas de 6 poços. Após o período de adesão

celular, procedeu-se ao pré-tratamento, conforme descrito item 2.3. Após 24 h de incubação, as células foram fixadas com solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, cacodilato de sódio 0,1 M e paraformaldeído 2%, v/v/v) por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (50, 70, 80, 90 e 100%), fixadas com fita de carbono em *stubs*, secas com hexametildisilazano (HMDS) seguido de deposição por *sputtering* com ouro. As amostras foram analisadas por um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV).

Considerou-se o controle positivo CP = EA (-) UVB (-); e controle negativo CN = EA (-) UVB (+).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os dados foram coletados, sumarizados e avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de suas variâncias, seguido da análise de variância (ANOVA), complementada por teste de comparação múltipla de Dunnett ou Tukey, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, 5%. Os dados foram analisados com suporte do programa GraphPad InStat® 6 e os resultados expressos como em média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

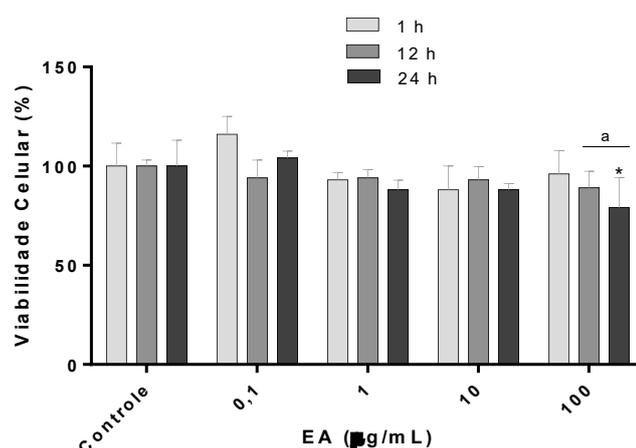
3.1 EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

De acordo com alguns protocolos encontrados na literatura, diferentes técnicas são empregadas para avaliar *in vitro* o efeito fotoprotetor de um composto. Estas diferenças estão relacionadas tanto ao método analítico (MTT, VN, entre outros) quanto ao tempo de exposição ao tratamento (1, 24, 48 h, por exemplo). Sendo assim, neste estudo optou-se pelo método do MTT por: (i) ser amplamente aceito por agências reguladoras em âmbito nacional e internacional e (ii) por ter apresentado uma sensibilidade maior nos ensaios de avaliação da citotoxicidade pela viabilidade celular, conforme descrito no Capítulo III (item 3.1).

Posto isto, os fibroblastos 3T3 foram expostos a concentrações não tóxicas 0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$ do EA, nos tempos de incubação de 1, 12 e 24 h. De acordo com esta avaliação, pode-se verificar na figura 23 que o EA não apresenta diferenças relevantes entre os tempos de

incubação. Apenas a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de incubação de 24 h, apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disto, a análise dos tratamentos de 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença significativa nos tempos de exposição ao EA de 12 e 24 h, mas diferem do tempo de 1 h, demonstrando que o EA em tempos de exposição superiores à 1 h, pode apresentar citotoxicidade e/ou que o mesmo pode ter seus efeitos benéficos nos primeiros instantes de exposição.

Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade pela viabilidade de fibroblastos 3T3 expostos ao EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de incubação de 1, 12 e 24 h, através do método MTT. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. O símbolo $*$ = $p < 0,0001$ demonstra diferença estatística entre o tratamento e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. Letra **a** significa diferença estatística entre os grupos tratados de 100 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Produção da própria autora.

Após a análise desses resultados, o tempo de exposição de 1 h foi selecionado para avaliar o efeito fotocitoprotetor em fibroblastos 3T3 expostos à radiação UVB.

3.2 IRRADIAÇÃO UVB

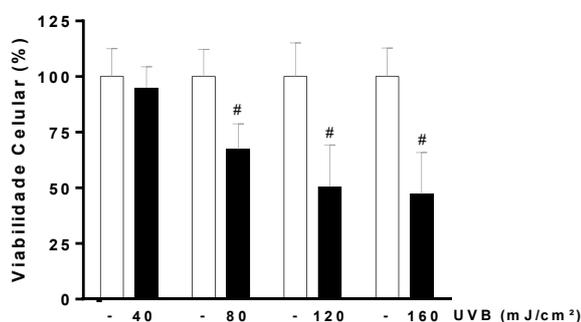
Seguindo a tendência da utilização de produtos naturais na produção de cosméticos, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de verificar a ação fotoprotetora de extratos e óleos vegetais que contêm em sua constituição flavonoides, taninos, alcaloides e os

polifenóis (FERRARI; ROCHA-FILHO; NAKATO, 2007). Os polifenóis possuem uma importante propriedade no que diz respeito à forte neutralização de radicais livres e exibem a capacidade de modular múltiplas vias celulares. Recentemente, seus potenciais efeitos fotoprotetores da pele ganharam considerável atenção (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2016). Conforme demonstrado nas análises do Capítulo I, o perfil químico do EA apresenta características interessantes como fonte de compostos bioativos de interesse à análise do efeito fotoprotetor.

Inicialmente, buscou-se encontrar a dose de irradiação UVB necessária para inibir 50% da viabilidade celular. Para isto, os fibroblastos 3T3 foram expostos à doses crescentes de irradiação UVB (40 - 160 mJ/cm²).

É possível verificar na figura 24 um decréscimo significativo na viabilidade celular ($p < 0,001$), de maneira dose dependente, a partir da exposição das células a irradiação de 80 mJ/cm². A dose de 120 mJ/cm² apresentou uma diminuição da viabilidade celular de $49,5 \pm 18,7$ %, quando comparada ao controle ($p < 0,001$). Entretanto, para garantir que os ensaios futuros obtivessem uma diminuição da população celular de 50%, a dose de 160 mJ/cm² foi selecionada ($57,7 \pm 18,6$ %).

Figura 24 - Efeito dose-resposta de irradiação UVB sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, determinado via ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolo # corresponde à diferença estatística ($p < 0,001$) entre os tratamentos e o grupo controle por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett. Colunas brancas representam os grupos celulares que não foram irradiados (controle) para cada dose de radiação. Colunas pretas representam os grupos irradiados com doses crescentes de radiação UVB.



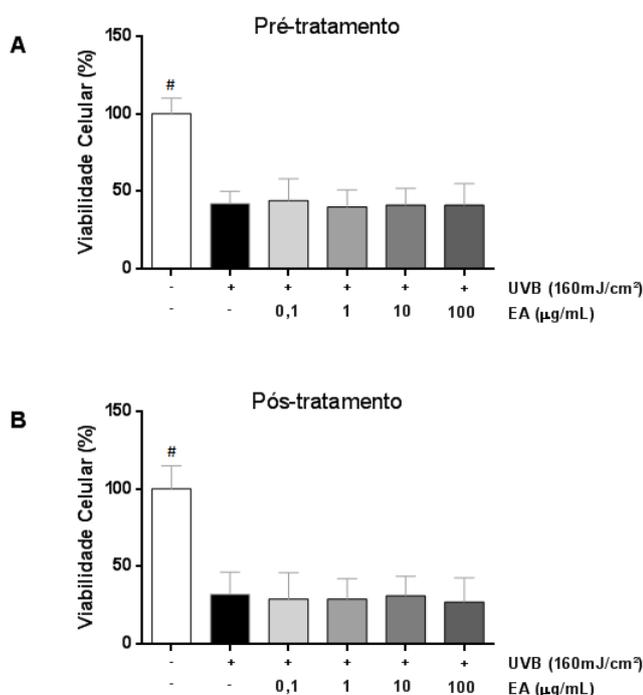
Fonte: Produção da própria autora.

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOCITOPROTETOR

Os fibroblastos são os principais componentes celulares na derme e as fibras de colágeno, fibras elásticas e componentes da matriz secretados por eles formam o corpo principal deste estrato (XIAO et al., 2018). Neste cenário, a prevenção e a proteção de fibroblastos aos danos fotoinduzidos são de fundamental importância. Para avaliar o potencial fotocitoprotetor, as concentrações e o tempo de exposição do EA que não apresentaram citotoxicidade (item 3.1) foram selecionados para dar continuidade aos estudos.

A figura 25 revela que a diminuição da viabilidade celular dos fibroblatos 3T3 induzida por UVB não foi inibida com a administração do EA, tanto no pré (A) quanto no pós-tratamento (B).

Figura 25 - Efeito dose-resposta de irradiação UVB sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3, determinado via ensaio de citotoxicidade. (A) Pré-tratamento: as células foram tratadas por 1 h com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) e posteriormente irradiados com UVB (160 mJ/cm^2). (B) Pós-tratamento: as células foram irradiados com UVB (160 mJ/cm^2) e posteriormente tratados por 1 h com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$). Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Símbolo # corresponde à diferença estatística ($p < 0,001$) entre o controle positivo e os demais grupos por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett.



Fonte: Produção da própria autora.

Apesar do EA não apresentar um efeito fotocitoprotetor em fibroblastos 3T3 contra radiação UVB no que diz respeito à conservação da viabilidade celular, os experimentos seguintes avaliaram sua influência com relação à morfologia e função celular.

3.4 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE COLÁGENO

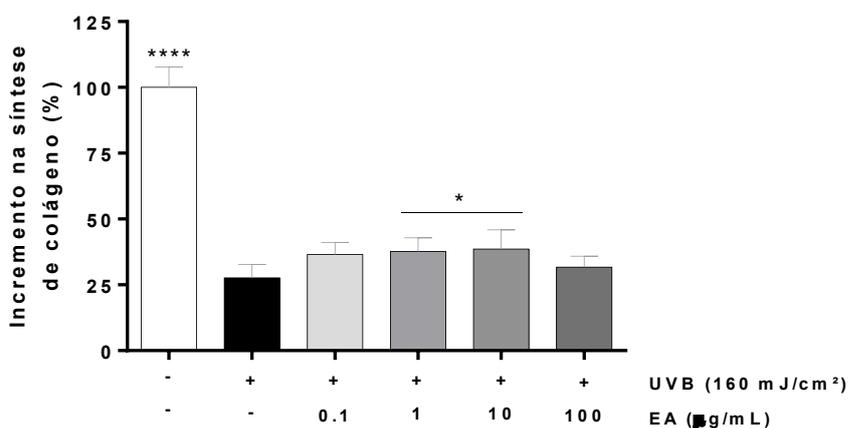
Fibroblastos produzem componentes de matriz extracelular da derme, como colágeno e elastina, que são indispensáveis para preservar a força e a elasticidade, características importantes para manutenção de uma pele saudável. A luz UV pode promover danos à estas células, como consequente supressão da produção de pró-colágeno e degradação de fibras na derme, levando a alterações presentes no fotoenvelhecimento (OLIVEIRA et al., 2018). Veirificou-se anteriormente que não há metabólitos no EA em estudo com possível ação fotocitoprotetora, pelo menos no tocante aos eventos de conservação da viabilidade de fibroblastos 3T3. Não obstante, procurou-se avaliar se o EA pode influenciar na proteção da síntese de colágeno.

Conforme observado no Capítulo III (item 3.4), o EA propiciou um efeito significativo importante ao estímulo da síntese de colágeno. Aqui, nós avaliamos a sua influência na síntese de colágeno em fibroblastos anteriormente irradiados por UVB (160 mJ/cm²).

Inicialmente, avaliou-se a diferença na síntese de colágeno entre os grupos do CP e CN. Observou-se que a população celular irradiada apresentou expressiva redução da síntese de colágeno ($27,7 \pm 5\%$), quando comparada ao CP ($p < 0,001$), corroborando dados da literatura sobre as perturbações celulares que ocorrem devido à radiação ultravioleta (Figura 26).

Com relação ao efeito do EA, após 72 h de tratamento, observa-se na figura 26 aumento significativo de $37,65 \pm 5,25\%$ e $38,62 \pm 7,29\%$ no incremento da síntese de colágeno com 1 e 10 µg/mL ($p < 0,05$) do EA, respectivamente, em relação ao CN. Entretanto, a administração da concentração de 1 e 10 µg/mL não apresentaram diferença estatística.

Figura 26 - Incremento na síntese de colágeno por fibroblastos 3T3, avaliado com o corante *Sirius red*, após tratamentos com radiação UVB (160 mJ/cm^2) e tratamento por 72 h com o EA ($0,1 - 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Os símbolos representam diferente estatística entre o controle positivo e os demais grupos, # = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$ por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett e Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Ainda que não significativo, as menores concentrações de EA ($0,1$ e $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$) parecem intervir positivamente no incremento da biossíntese daquela macromolécula. Conclusivamente, propõem-se que o EA potencializa/protege a produção de colágeno em fibroblastos 3T3 irradiados com UVB.

3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA NUCLEAR

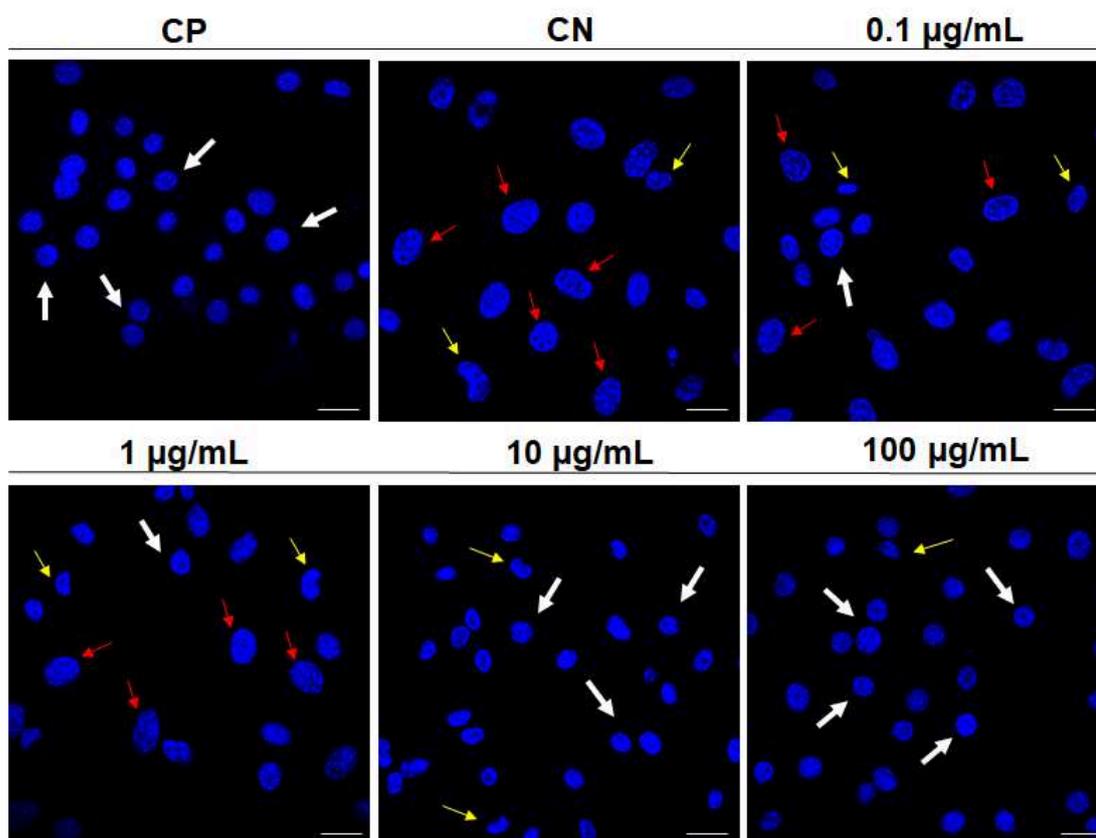
O aspecto morfológico de uma célula e sua fisiologia estão intimamente relacionados. De acordo com seu perfil genético, uma célula possui a sua forma relacionada com a função que desempenha. Em continuidade, avaliou-se a influência do EA na proteção da morfologia dos fibroblastos 3T3.

Inicialmente, fibroblastos 3T3 foram pré-tratados com EA ($0,1 - 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$) por 1 h e, em seguida, irradiados com UVB (160 mJ/cm^2) (pré-tratamento). Após 24 h de incubação, as células foram marcadas com DAPI e sua morfologia nuclear foi analisada por microscopia de fluorescência (Figura 27). Foram analisados pelo menos 400 núcleos por tratamento. As

imagens foram capturadas e analisadas por meio da Análise Morfométrica Nuclear (NMA), conforme proposto por Filippi-chiela e colaboradores (2012).

A avaliação consistiu em verificar o tamanho e as irregularidades dos núcleos das células aderentes em cultura. A partir de diversas medidas, um índice de irregularidade nuclear (em inglês, Nuclear Irregularity Index NII) foi criado. Núcleos normais (N) foram usados para definir os parâmetros para o tipo celular sob estudo (FILIPPI-CHIELA et al., 2012). Assim, de acordo com Filippi-Chiela (2015), núcleos pequenos e regulares (SR) são respectivos à núcleos apoptóticos; pequenos (S) à núcleos mitóticos; irregulares (I) e grandes e irregulares (LI) à núcleos em mitose castrófica; grandes e regulares (LR) à núcleos senescentes.

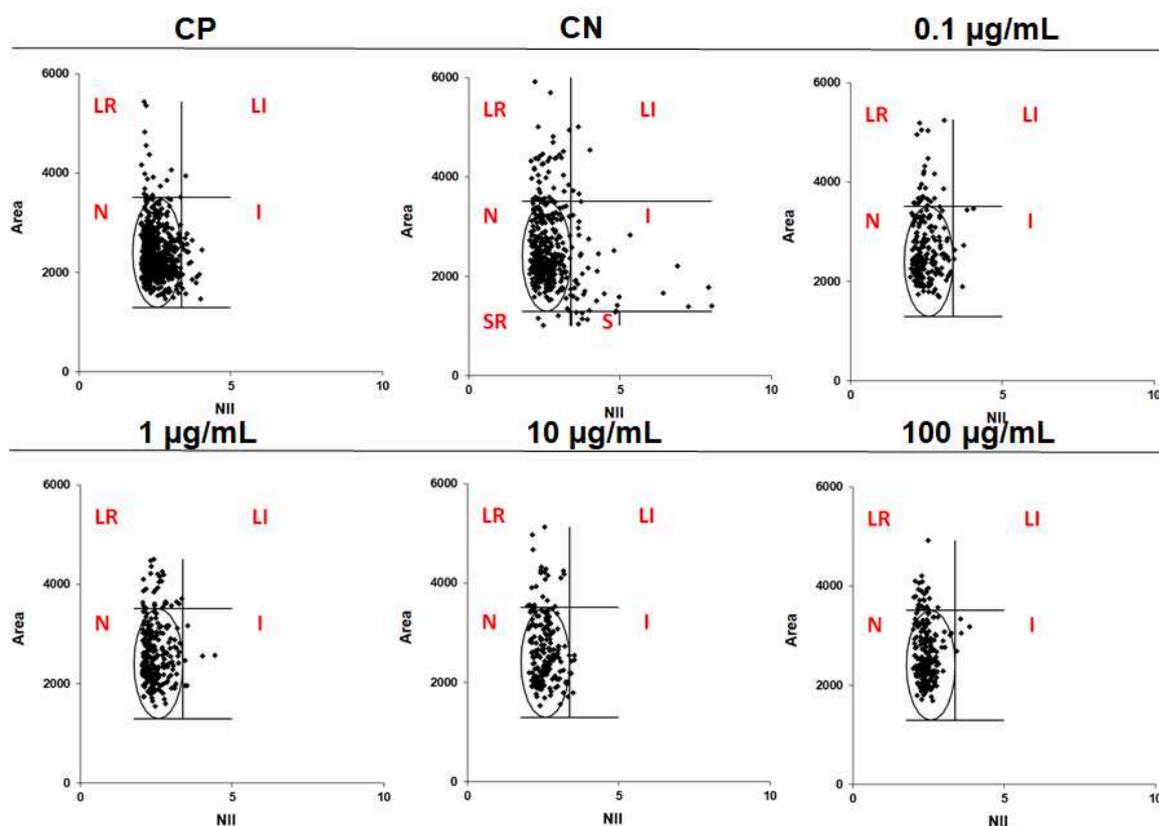
Figura 27 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h e irradiadas com UVB (160 mJ/cm^2). Núcleos de fibroblastos 3T3 marcados com DAPI para detectar a morfologia nuclear. Setas brancas indicam núcleos normais (N). Setas amarelas indicam núcleos irregulares (I). Setas vermelhas indicam núcleos grandes e regulares (LR) (630 \times), escala: barra = 25 μm .



Fonte: Produção da própria autora.

De forma ilustrativa, também são apresentados os gráficos de área X índice de irregularidade (Figura 28). Cada ponto preto nos gráficos representam um núcleo avaliado. Os núcleos normais (N) apresentam-se dentro da elipse no gráfico. Os núcleos menores e regulares (SR) ficam abaixo da elipse; os núcleos maiores e regulares (LR) ficam acima; e os núcleos irregulares (I) à direita da elipse.

Figura 28 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) por 1 h e irradiadas com UVB (160 mJ/cm^2). Dados apresentados como um gráfico do Índice de Irregularidade de Área versus Nuclear (NII), que separa os núcleos considerando seus fenótipos morfométricos. As letras vermelhas representam núcleos normais (N), grandes e regulares (LR), grandes e irregulares (LI), mitóticos (S) pequenos e regulares (SR) e irregulares (I).

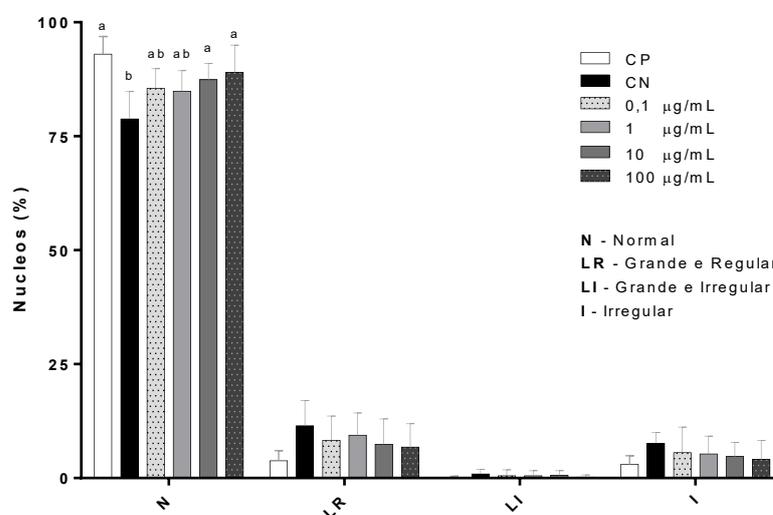


Fonte: Produção da própria autora.

A análise morfométrica do tamanho e irregularidade dos núcleos mostrou que o EA aumentou a porcentagem de núcleos normais (N) com o pré-tratamento, quando comparados ao CN (figura 29). Dos núcleos que permaneceram aderentes, $89 \pm 6\%$ apresentam morfologia normal com o tratamento de 100 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao grupo CN ($78,8 \pm 6\%$) ($p <$

0,05). Adicionalmente, esta concentração não diferiu estatisticamente do tratamento de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($87,4 \pm 3,6\%$). As células que apresentaram núcleos pequenos e regulares (SR) e mitóticos (S) no CN não são apresentadas na figura 29, pois compreenderam menos de 1%.

Figura 29 - Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h e irradiadas com UVB ($160 \text{ mJ}/\text{cm}^2$). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As letras correspondem às diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle negativo (CN) por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.



Fonte: Produção da própria autora.

Outra observação importante derivada deste estudo é em relação ao grupo de núcleos LR, característicos de células em senescência, embora não apresentem diferença significativa. Conforme demonstrado na figura 29, duas considerações são importantes: (i) há um aumento de núcleos senescentes (LR) no grupo CN, comparativamente ao grupo CP; (ii) há uma depleção dos núcleos senescentes (LR) quando administradas as concentrações crescentes do EA. A senescência é uma condição em que as células são incapazes de proliferar. Esta é uma resposta ao estresse e pode ser induzida por múltiplos mecanismos, incluindo encurtamento dos telômeros e danos no DNA (SCHNEIDER et al., 2018). Este pode ser um mecanismo que explique os resultados encontrados até o momento, pois, segundo Xiao e colaboradores (2018), os estímulos externos, i.e., luz ultravioleta, podem acelerar a senescência da pele. Logo, a senescência dos fibroblastos é a base da senescência da pele.

O EA interferiu de maneira positiva na manutenção da morfologia nuclear de fibroblastos 3T3 irradiados por UVB. Por suposição, este mecanismo pode relacionar-se ao

desbloqueio de inibidores de parada do ciclo celular curto, ou senescência em longo prazo (TAVANA et al., 2010).

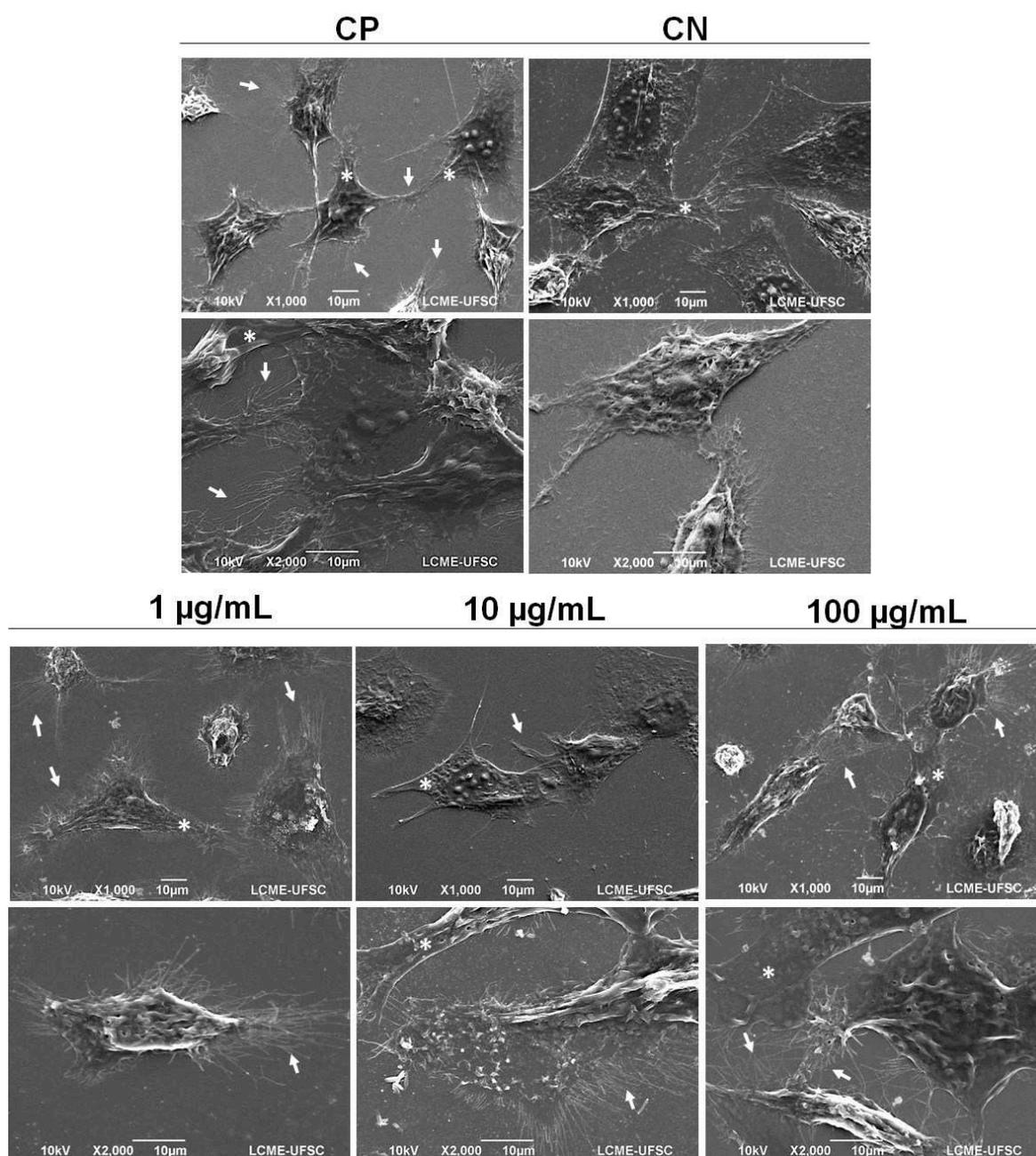
3.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Com o objetivo de complementar os estudos acerca da morfologia dos fibroblastos 3T3, estes foram pré-tratados com EA, irradiados com UVB (160 mJ/cm^2) e analisados por microscopia eletrônica de varredura.

Inicialmente, pode-se observar que há um contraste na morfologia dos fibroblastos 3T3 quando comparados os grupos CP e CN (Figura 30). É possível identificar um aumento no volume celular no CN. Esses dados corroboram com os achados no ensaio de morfologia nuclear, onde grandes núcleos regulares, possivelmente representados por células em estado de senescência, estão presentes. Além da morfologia típica fusiforme de fibroblastos, constatarem-se também no CP extensões citoplasmáticas compatíveis com o tipo celular em análise, como lamelipódios (asteriscos) e filopódios (setas). Estas protusões são características de células em processo de migração celular. Em contrapartida, verifica-se que no grupo CN estes fenótipos foram perturbados. Aparentemente, a radiação UVB interfere neste mecanismo. Até o momento, para o melhor de nosso conhecimento, diversos estudos tentaram revelar os mecanismos moleculares que regulam a migração celular; no entanto, eles permaneceram em grande parte incertos (TASHIRO; IMOTO, 2016).

Nos grupos onde houve administração do EA não se observaram mudanças expressivas na concentração de $0,1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ quando comparadas ao CN (micrografias não apresentadas). A partir da concentração de $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ do EA foi possível detectar pequenas alterações quanto à indução de filopódios, principalmente. Já nas concentrações de 10 e $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$, observou-se um volume celular compatível com células encontradas no CP, reforçando os resultados das análises da morfologia nuclear. Além disso, pode-se especular que, nestas doses, as comunicações celulares foram mais constantes, dada à maior formação de lamelipódios e filopódios.

Figura 30 - Análise morfológica celular. Fibroblastos 3T3 expostos ao pré-tratamento com EA (0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h e irradiados com UVB (160 mJ/cm^2) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (1000 e 2000 \times). Setas brancas indicam formação de filopódios. Símbolos * indicam formação de lamelipódios.



Fonte: Produção da própria autora.

De acordo com as análises das micrografias apresentadas, o EA interferiu de maneira positiva na manutenção da morfologia celular de fibroblastos 3T3 expostos à radiação UVB.

A radiação UVB provoca instabilidade celular, diminuindo a viabilidade de fibroblastos 3T3 e, de forma hipotética, consequentemente, sua proliferação. Esta

instabilidade pode estar relacionada à ação da radiação ultravioleta-B em mecanismos que controlam a parada do ciclo celular, ou senescência. A radiação UVB não apenas reduz a secreção de colágeno, mas também provoca degradação do colágeno extracelular pelo aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP1 e MMP 3. Estas alterações implicam na dinâmica celular, diminuindo sua aderência, haja vista que proteínas integrinas estão intimamente ligadas ao colágeno existente na matriz. De forma conclusiva, a migração celular foi inibida.

De acordo com os resultados, preconiza-se que o EA, administrado em fibroblastos 3T3 irradiados com UVB, atua na reprogramação de células normais, diminuindo o índice de células em senescência, aumentando a produção de colágeno e reativando os mecanismos de adesão e migração celular através de *crossstalk* celular.

Como perspectivas, novos ensaios são necessários para elucidar o mecanismo de ação do EA em fibroblastos 3T3 expostos à radiação UVB. Ensaios envolvendo análise do ciclo celular, bem como marcadores para senescência (β -galactosidase) e estudo de gerações celulares, através de ensaios de determinação de duplicação populacionais cumulativas (CPD) podem ser considerados. Também pode ser considerado analisar os teores de açúcares encontrados no EA, pois podem influenciar nos efeitos observados, inclusive, de maneira sinérgica aos metabólitos secundários.

Para o momento, o EA pode ser um candidato a futuras pesquisas sobre a prevenção e tratamento da senescência da pele, uma das principais causas do fotoenvelhecimento.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os dados expostos sobre o efeito fotocitoprotetor do EA em fibroblastos 3T3 expostos à radiação UVB, sugere-se que o EA:

- Não apresenta um efeito protetor no que diz respeito à viabilidade celular;
- Preserva a função dos fibroblastos em relação à produção de colágeno;
- Reestabelece a morfologia dos fibroblastos garantindo o desenvolvimento das suas funções;
- Pode estar ligado a possíveis mecanismos relacionados à inibição da senescência celular.

- É um candidato a formulações de produtos cosméticos ao combate do fotoenvelhecimento.

REFERÊNCIAS

- ABERA, B. Medicinal plants used in traditional medicine by Oromo people, Ghimbi District, Southwest Ethiopia. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 40, 2014.
- ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of "Prata" banana (*Musa acuminata* x *M. Balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 705-711, 2005.
- AGARWAL, P. K. et al. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 1, p. 32–40, 2009.
- ALMEIDA, I. F. et al. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 28–34, 2015.
- ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: [s.n.].
- ANYASI, T. A.; JIDEANI, A. I.; MCHAU, G. A. Morphological, physicochemical, and antioxidant profile of noncommercial banana cultivars. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 221–32, 2015.
- APRIASARI, M. L.; SUHARTONO, E. Bioactive Compound and Antioxidant Activity of Methanol Extract Mauli Bananas (*Musa* sp) Stem. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 4, n. 2, p. 110–115, 2014.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração

de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARTOŠ, J. et al. Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): Taxonomic implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1–3, p. 50–57, 2005.

BELEITES, C. Import and export of spectra files. **Vignette for the R package hyperSpec**, p. 1–20, 2011.

BRAVO, K. et al. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 168, p. 78–88, 2017.

BRITO, C. F. B. et al. Production, decomposition and chemical characteristics of banana litterfall. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 45–52, 2017.

CALHELHA, R. C. et al. Cytotoxicity of portuguese propolis: the proximity of the *in vitro* doses for tumor and normal cell lines. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

CARBONELL, C. I. et al. Cutaneous melanoma: some current considerations. **Medisan**, v. 23, n. 1, p. 146–164, 2019.

CASTILLO-BRICEÑO, P. et al. A role for specific collagen motifs during wound healing and inflammatory response of fibroblasts in the teleost fish gilthead seabream. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 6–7, p. 826–834, 2011.

CAVINATO, M.; JANSEN-DÜRR, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental Gerontology**, v. 94, p. 78–82, 2017.

CHAN, C. F. et al. Potent antioxidative and UVB protective effect of water extract of *Eclipta prostrata* L. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

CHANDRASEKAR, D. et al. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 460–464, 2006.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.

CHEUNG, F.; TOWN, C. D. A BAC end view of the *Musa acuminata* genome. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 1–7, 2007.

ČÍŽKOVÁ, J. et al. Molecular and cytogenetic characterization of wild *Musa*

species. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

COSTA, C.; MARASCHIN, M.; ROCHA, M. An R package for the integrated analysis of metabolomics and spectral data. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 129, p. 117–124, 2016.

CRESTE, S. et al. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 132, n. 3, p. 259–268, 2003.

CRESTE, S. et al. Genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian banana breeding program estimated by microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, n. 7, p. 723–733, 2004.

DARSINI, T. P. D. et al. *In vitro* antioxidant activity of banana (*Musa* spp. ABB cv. Pisang Awak). **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, n. 2, p. 124–129, 2012.

DE ANGELIS-PEREIRA, M. C. et al. Chemical composition of unripe banana peels and pulps flours and its effects on blood glucose of rats. **Nutrition and Food Science**, v. 46, n. 4, p. 504–516, 2016.

DE JESUS, O. N. et al. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in ex situ conservation. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

DE MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 540–548, 2012.

DE PAULA PEREIRA, N.; DOURADO, D. The profile of Brazilian agriculture as source of raw material to obtain organic cosmetics. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 3, p. 165–166, 2017.

DONG, C. et al. Metabolism of flavonoids in novel banana germplasm during fruit development. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. August, p. 1–10, 2016.

DU, G. et al. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in actinidia fruits. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 557–562, 2009.

EDENTA, C.; OKODUWA, S.; OKPE, O. Effects of aqueous extract of three cultivars of banana (*Musa acuminata*) fruit peel on kidney and liver function indices in wistar rats. **Medicines**, v. 4, n. 4, p. 77, 2017.

EHIOWEMWENGUAN, G.; EMOGHENE; INETIANBOR, J. E. Antibacterial and

phytochemical analysis of banana fruit peel. **IOSR Journal Of Pharmacy**, v. 4, n. 8, p. 2250–3013, 2014.

EMBRAPA. **Fisiográfica em 2017**. [s.l: s.n.].

EPAGRI. **Projeto EPAGRI banana orgânica 2014 cnpq**, 2017.

EKESA, B. et al. Bioaccessibility of provitamin A carotenoid in bananas (*Musa* sp.) and derived dishes in African countries. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, 1471-1477, 2012.

FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P.; NAKATO, A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17 (4), n. December, p. 626–630, 2007.

FERRERA, T. S. et al. Substâncias fenólicas , flavonoides e capacidade antioxidante em ervaíras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 2, p. 588–596, 2016.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of apoptosis , mitosis , senescence and mitotic catastrophe. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–10, 2012.

FRANCO, C. F. et al. MMP-8 periodontal disease. **Revista Periodontal**, v. 19, n. 4, p. 51–60, 2009.

FRANZEN, L.; WINDBERGS, M. Applications of Raman spectroscopy in skin research - From skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 91–104, 2015.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, v. 161, p. 216–223, 2014.

GLASß, M. et al. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. **Pattern Recognition**, v. 45, p. 3154–3165, 2012.

HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809–813, 2013.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n 2, p. 312-322, 2006.

HAMILTON, A. C.; KARAMURA, D.; KAKUDIDI, E. History and conservation of wild and cultivated plant diversity in Uganda: Forest species and banana varieties as case studies. **Plant Diversity**, v. 38, n. 1, p. 23–44, 2016.

HANSON, B. ChemoSpec: An R Package for Chemometric Analysis of Spectroscopic Data (Package Version 4.1.15). p. 1–41, 2015.

HAPPI EMAGA, T. et al. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 590–600, 2007.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1073–1084, 2007.

HOSKIN, R. T. et al. Blueberry polyphenol-protein food ingredients: The impact of spray drying on the *in vitro* antioxidant activity, anti-inflammatory markers, glucose metabolism and fibroblast migration. **Food Chemistry**, v. 280, n. October 2018, p. 187–194, 2019.

HŘIBOVÁ, E. et al. Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 119, n. 3–4, p. 268–274, 2007.

HU, Y. et al. Protective effect of Cyanidin-3-O-glucoside against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 1–8, 2016.

HWANG, E. et al. A comparative study of baby immature and adult shoots of *Aloe vera* on UVB-induced skin photoaging *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 12, p. 1874–1882, 2013.

HWANG, E. et al. Enzyme-modified Panax ginseng inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type i and MMP-1 expression. **Food and Function**, v. 5, n. 2, p. 265–274, 2014.

HWANG, E.; PARK, S.; SUN, Z. The protective effects of fucosterol against skin damage in UVB-Irradiated human dermal fibroblasts. **Marine Biotechnology**, v. 16, p. 361–370, 2014.

INCA, 2018. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 1 de maio de 2019a.

INCA, 2018. **Câncer de pele não melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 1 de maio de 2019b.

ISAAC, C. et al. Physiological wound healing. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125–131, 2010.

ISIC, 2019. Instituto Schulman de Investigação Científica. **Tipos de pele**. Disponível em <<http://isic.net/artigo-65>>. Acesso em 30 de julho de 2019.

ISLAM, J. et al. Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in commons fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC. **Food Bioscience**, v. 13, p. 56-59, 2016.

JEONG, J. B. et al. Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale makino* and *Ligusticum chuanxiong* hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. **Cancer Epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 41–46, 2009.

JONKMAN, J. E. N. et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451, 2015.

KARIM, A. A. et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 381, 2014.

KHAN, T. K.; WENDER, P. A.; ALKON, D. L. Bryostatin and its synthetic analog, picolog rescue dermal fibroblasts from prolonged stress and contribute to survival and rejuvenation of human skin equivalents. **Journal of Cellular Physiology**, n. June, p. 1–12, 2017.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA. Acervo de lâminas histológicas do laboratório de histologia. Departamento de Ciências Morfológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

LEE, H. et al. Rice callus extracts for enhancing skin wound healing. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. July 2018, p. 352–358, 2017.

LEERACH, N. et al. Effect of Thai banana (*Musa AA* group) in reducing accumulation of oxidation end products in UVB-irradiated mouse skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 168, p. 50–58, 2017.

LEONTI, M. et al. Reverse ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n. December 2016, p. 417–431, 2017.

LIU, X. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 685–690, 2012.

LIVRAMENTO, G.; NEGREIROS, R. J. Z. **Banana Recomendações técnicas para**

o cultivo no litoral norte de Santa Catarina. [s.l: s.n.].

LOPES, M. B. et al. *In vivo* Confocal raman spectroscopic analysis of the effects of infrared radiation in the human skin dermis. **Photochemistry and Photobiology**, p. 613–618, 2017a.

LOPES, S. **Estudo *in vitro* de atividades biológicas dos extratos carotenoidicos e polifenólicos derivados das folhas de *Zea mays* em linhagens celulares neoplásicas.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

LOPES, S. et al. UV-vis spectrophotometry and chemometrics as tools for recognition of the biochemical profiles of organic banana peels (*Musa* sp.) according to the seasonality in southern Brazil. **International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics.** Conference Paper in Advances in Intelligent Systems and Computing. Anais. 2017b

MAGCWEBEBA, T. et al. Anti-inflammatory effects of *aspalathus linearis* and *Cyclopia* spp. extracts in a UVB/Keratinocyte (HaCaT) model utilising interleukin-1-Accumulation as biomarker. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–21, 2016.

MAHENDHIRAN, M. et al. Single nucleotide polymorphisms in partial sequences of the gene encoding the large sub-units of ADP-glucose pyrophosphorylase within a representative collection of 10 *Musa* genotypes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, 2014.

MANOSROI, A. et al. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the Galls of *Terminalia chebula*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1448–1463, 2013.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361–371, 2000.

MARTINS, Z. E.; PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, 2017.

MATSIKA, O. M. et al. Discrete and continuum approximations for collective cell migration in a scratch assay with cell size dynamics. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 80, n. 4, p. 738–757, 2018.

MILIPORE. **EdU Cell Proliferation Assay**, 2015.

MILLER, R. N. G. et al. Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminada* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4. **BMC Reserach Notes**, v. 3, n. 148, p. 1–6, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUHAMMAD, A. A. et al. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam . **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

NIZAMUTDINOVA, I. T. et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806–2812, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OLIVEIRA, M. M. DE et al. Photodamage attenuating potential of *Nectandra hihua* against UVB-induced oxidative stress in L929 fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 181, n. December 2017, p. 127–133, 2018.

OECD, Guideline for testing of chemicals n° 432. *In vitro* 3T3 NRU phtototoxicity test. 13 April 2004.

OLTEANU, D. et al. *In vitro* studies on the mechanisms involved in chemoprevention using *Calluna vulgaris* on vascular endothelial cells exposed to UVB. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 136, p. 54–61, 2014.

OMOLOLA, A. O.; JIDEANI, A. I. O.; KAPILA, P. F. Drying kinetics of banana peel. **Interciencia**, v. 6, n. 11, p. 374–380, 2015.

PADILLA-CAMBEROS, E. et al. Wound healing and antioxidant capacity of *Musa paradisiaca* Linn. peel extracts. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 5, p. 165–173, 2016.

PALACIOS, S. et al. Comparison of physicochemical pretreatments of banana peels for bioethanol production. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 993–1001, 2017.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 34, n. 1, p. 6–17, 2008.

PASSO TSAMO, C. V. et al. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain

cultivars (*Musa* sp.). **Food Chemistry**, v. 167, p. 197–204, 2015.

PEREIRA, A. **Determinação do perfil químico e da atividade cicatrizante de extratos de casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* sp.) e o desenvolvimento de um curativo para pequenas lesões.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

PEREIRA, A.; MARASCHIN, M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 149–163, 2015.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. **Journal of Dermatological Science**, v. 84, n. 2, p. 169–177, 2016.

PHUAKLEE, P.; RUANGNOO, S.; ITHARAT, A. Anti-inflammatory and antioxidant activities of extracts from *Musa sapientum* peel. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 95, n. 1, p. 142–146, 2012.

QAMAR, S.; SHAIKH, A. Therapeutic potentials and compositional changes of valuable compounds from banana- A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, n. June, p. 1–9, 2018.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1247–1256, 2002.

RIBEIRO, S. M. R. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 620–626, 2008.

RIEBELING, C.; LUCH, A.; TRALAU, T. Skin toxicology and 3Rs - Current challenges for public health protection. **Experimental Dermatology**, v. 27, p. 526–536, 2018.

RODRÍGUEZ-MORATÓ, J. et al. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4655–4680, 2015.

RYOO, Y. W. et al. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 27, n. 3, p. 162–169, 2001.

SALUCCI, S. et al. Antioxidants in the prevention of UVB-induced keratinocyte apoptosis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 1–9, 2014.

SARDOS, J. et al. DArT whole genome profiling provides insights on the evolution and taxonomy of edible Banana (*Musa* spp.). **Annals of Botany**, v. 118, n. 7, p. 1269–1278, 2016.

SCHIEBER, A; STINTZING, F.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 2001, p. 401–413, 2001.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 684–696, 2018.

SHENG, Z. et al. Phytosterols in banana (*Musa* sp.) flower inhibit α -glucosidase and α -amylase hydrolyses and glycation reaction. **Internacional Journal of food Science and Technonoly**, v. 52, n. 1, p. 171-179, 2019.

SHETTY, S. M. et al. Complete chloroplast genome sequence of corroborates structural heterogeneity of inverted repeats in wild progenitors of cultivated bananas and plantains. **The Plant Genome**, v. 9, n. 2, p. 0, 2016.

SHIAN, T. E. et al. Antioxidant properties of three banana cultivars (*Musa acuminata* “Berangan”, “Mas” and ‘Raja’) Extracts. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 3, p. 319–324, 2012.

SHIGA, T. M. et al. Two banana cultivars differ in composition of potentially immunomodulatory mannan and arabinogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 31–41, 2017.

SILVA, A. R. et al. *In vitro* evaluation of the efficacy of commercial green tea extracts in UV protection. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 1, p. 69–77, 2013.

SINGH, B. et al. Bioactive compounds in banana and their associated health benefits—A review. **Food Chemistry**, v. 206, p. 1–11, 2016.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUSA, S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. DE. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 03, p. 202–210, 2011.

SUN, Z. et al. *Angelica archangelia* Prevented collagen degradation by blocking production of matrix metalloproteinases in uvb-exposed dermal fibroblasts. **Photochemistry**

and Photobiology, v. 92, p. 604–610, 2016.

SUNDARAM, S. et al. Antioxidant activity and protective effect of banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1192–1206, 2011.

SURYONO et al. banana peel extract as adjuvant therapy for periodontitis: histometrical and morphometrical analysis in *Rattus norvegicus*. **International Journal of Medicine and Pharmacy**, v. 6, n. 2, 2019.

TANG, E. L. H. et al. Antioxidant activity of *Coriandrum sativum* and protection against DNA damage and cancer cell migration. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 347, p. 1–13, 2013.

TASHIRO, E.; IMOTO, M. Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 213–219, 2016.

TAVANA, O. et al. Absence of p53-dependent apoptosis leads to UV radiation hypersensitivity, enhanced immunosuppression and cellular senescence. **Cell Cycle**, v. 9, n. 16, p. 3328–3336, 2010.

THAKUR, R. et al. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–17, 2011.

TOH, P. Y. et al. Optimization of extraction parameters on the antioxidant properties of banana waste. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 1, p. 65–78, 2016.

TRABELSI, N. et al. The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limonium guyonianum*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 466–471, 2014.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAM, S. Natural wound healing and bioactive natural products. **Phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 532–560, 2013.

TSAMO, C. V. P. et al. Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.). **Food Chemistry**, v. 167, p. 197–204, 2015.

TULLBERG-REINERT, H.; JUNDT, G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: Effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 112, n.

4, p. 271–276, 1999.

VANG MOURITZEN, M.; JENSSEN, H. Optimized scratch assay for *in vitro* testing of cell migration with an automated optical camera. **Journal of Visualized Experiments**, v. 138, 2018.

VILELA, C. et al. Lipophilic phytochemicals from banana fruits of several *Musa* species. **Food Chemistry**, v. 162, p. 247–252, 2014.

VON ATZINGEN, D. A. N. C. et al. Gel from unripe *Musa sapientum* peel to repair surgical wounds in rats . **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 379–382, 2011.

VU, H. T.; SCARLETT, C. J.; VUONG, Q. V. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. February, p. 1–14, 2016.

WALL, M. M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 5, p. 434–445, 2006.

WEBER, O. B. et al. Performance of banana genotypes with resistance to black leaf streak disease in Northeastern Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 3, p. 161–169, 2017.

WEN, K. C. et al. Antioxidant Activity of *Ixora parviflora* in a Cell/Cell-Free System and in UV-Exposed Human Fibroblasts. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5735–5752, 2011a.

WEN, K. C. et al. Development of an assay method for natural products containing cosmetics (II)-licorice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, n. 2, p. 230–237, 2011b.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WOJTOWICZ, A. M. et al. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 22, n. 2, p. 246–255, 2014.

XIAO, X. et al. Research on the senescence of human skin fibroblasts induced by ultraviolet b and its mechanism. **Biomedical Research**, v. 29, n. 2, p. 313–316, 2018.

XU, L. et al. Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing. **Annals of Plastic Surgery**, v. 71, n. 4, p. 415–420, 2013.

YAKAEW, S. et al. Ethanol extract of *Terminalia chebula* fruit protects against

UVB-induced skin damage. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2701–2707, 2016.

YAMABA, H. et al. Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. May, p. 45–51, 2016.

YANG, D. J. et al. Gallic acid promotes wound healing in normal and hyperglucidic conditions. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1–15, 2016.

YOO, D. S. et al. Antiaging effects of *Musa sapientum* L. (Banana) leaf extract. v. 31, n. 2, p. 126–134, 2016.

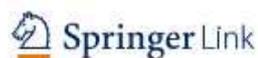
YUAN, Y. et al. Metabolomic analyses of banana during postharvest senescence by 1H-high resolution-NMR. **Food Chemistry**, v. 218, p. 406–412, 2017.

ZAWAWY, N. A. E. Antioxidant, antitumor, antimicrobial studies and quantitative phytochemical estimation of ethanolic extracts of selected fruit peels. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 298–309, 2015.

ZHOU, S. et al. Increased collagen synthesis rate during wound healing in muscle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 8–11, 2013.

APÊNDICE A – Publicação

28/05/2019 UV-Vis Spectrophotometry and Chemometrics as Tools for Recognition of the Biochemical Profiles of Organic Banana Peels (Mus...



UV-Vis Spectrophotometry and Chemometrics as Tools for Recognition of the Biochemical Profiles of Organic Banana Peels (*Musa* sp.) According to the Seasonality in Southern Brazil

International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics

PACBB 2017: 11th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics pp 289-296 | Cite as

- Susane Lopes (1) Email author (susane.lopes@ufsc.br)
- Rodolfo Moresco (1)
- Luiz Augusto Martins Peruch (2)
- Miguel Rocha (3)
- Marcelo Maraschin (1)

1. Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina, , Florianópolis, Brazil

2. Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina, , Criciúma, Brazil

3. School of Engineering, Centre Biological Engineering, University of Minho, , Braga, Portugal

Conference paper

First Online: 21 June 2017