

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JOSIÉLE DA SILVA PRADE

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIODA *ARNICA MONTANA* EM LESÕES
CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Itaqui

2017

JOSIÉLE DA SILVA PRADE

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA *ARNICA MONTANA* EM LESÕES
CUTÂNEAS INDUZIDAS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso
de Nutrição da Universidade
Federal do Pampa, como requisito
parcial para a obtenção do Título
de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Leandro
Cattelan Souza

Itaqui

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

P896e Prade, Josiéle da Silva
Efeito anti-inflamatório da Arnica montana em lesões
cutâneas induzidas por radiação UVB em camundongos / Josiéle
da Silva Prade.
22 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, NUTRIÇÃO, 2017.
"Orientação: Leandro Cattelan Souza".

1. Fitoterápicos. 2. Arnica montana. 3. Radiação UVB. 4.
Lesões cutâneas. 5. Inflamação. I. Título.

JOSIÉLE DA SILVA PRADE

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF ARNICA MONTANA IN CUTANEOUS
INJURIES INDUCED BY UVB RADIATION IN MICE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado na Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal
do Pampa como requisito básico
para a Conclusão do Curso de
Nutrição.

Trabalho de Conclusão de Curso defendida e aprovada em: 27 de novembro
de 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza
(Orientador)
Curso de Nutrição-UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Carla Pohl Sehn
Banca
Curso de Nutrição-UNIPAMPA

Prof. Dr. Carlos Borges Filho
Banca
Curso de Nutrição-UNIPAMPA

DEDICO

Dedico este trabalho a Deus, a minha filha E.H.S.P. meu esposo C.L.P. meus pais e meus sogros, por todo apoio para que esse sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

“A Deus acima de todas as coisas, por me iluminar e por sua presença constante em minha vida”.

A Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, por contribuir na minha formação profissional. Aos docentes pelo ensino, aprendizagem e pelos conhecimentos adquiridos e às grandes amizades aqui conquistadas.

Aos colegas do grupo de pesquisa Laftambio Pampa, pela colaboração e auxílio para a realização deste trabalho.

A minha querida Prof.^a e orientadora Silvana Peterini Boeira, obrigada, por desde o início ter acreditado em mim e encarado o desafio tanto com o projeto, como na construção do trabalho de conclusão de curso. Infelizmente, teve que se afastar para tratamento de saúde. Desejo que Deus conforte teu coração, pois tem situações que infelizmente temos que passar, mas que jamais perca a Fé, dias melhores virão. Desejo que volteo quanto antes para abrilhantar nossa faculdade com seus ensinamentos e conhecimentos. Meu profundo e sincero agradecimento, professora!

Ao Prof. e Diretor do Campus Itaqui (Unipampa) por compartilhar seu conhecimento e na construção deste trabalho. Muito obrigada, que Deus em sua infinita bondade o tragao quanto antes para junto de nós, para continuar enriquecendo nosso campus com seus ensinamentos e sabedoria, pois é um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Que Deus o abençoe!

Ao meu orientador Prof. Leandro Cattelan Souza pela iniciativa e disponibilidade em me orientar em meio atanta tristeza. Fica meu agradecimento pelos preciosos ensinamentos, pelo apoio, esforço e dedicação que tem demonstrado desde o início. MUITO OBRIGADA!

A todos os professores desta faculdade por serem tão prestativos e dedicados. Em especial aos membros desta banca Prof.^a Carla e Prof. Carlos pelas sugestões nesse trabalho.

A minha família por acreditarem em mim e por compreenderem minha ausência muitas vezes ao longo desses anos!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADA!

“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”.

Fernando Sabino

RESUMO

As radiações ultravioleta dos tipos A e B (UV) (315-400nm e 280-315nm respectivamente) são os principais componentes presentes na luz solar conhecidas por causar danos e lesões de pele. No entanto a radiação UVB é conhecida por causar queimaduras de pele, e até carcinogênese. A *Arnica montana* é uma planta que vem sendo amplamente estudada por conter propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e analgésicas capazes de prevenir ou amenizar lesões. Portanto, o presente estudo buscou investigar o efeito terapêutico da aplicação tópica de *Arnica Montana* (30gramas contendo 30% tintura de *Arnica montana*) sobre parâmetros como edema, estresse oxidativo e reação inflamatória na orelha de camundongos após uma exposição aguda à radiação UVB. Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento tópico com *Arnica montana* reduziu a resposta inflamatória induzida por UVB, como demonstrado pela redução do edema da orelha e a inibição da ativação da mieloperoxidase e do fator de transcrição gênica de moléculas inflamatórias (fator nuclear kappa B, NF- κ B), o que contribuiu para a redução das citocinas inflamatórias como, interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ). Além disso, o tratamento com *Arnica montana* amenizou os danos oxidativos mediados pela radiação UVB, como demonstrado pela redução da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e pela elevação das capacidades antioxidantes teciduais e do conteúdo de glutathione. Em conclusão, o presente estudo demonstrou a eficácia do tratamento homeopático com a pomada de *Arnica montana* em aliviar o processo inflamatório e os danos oxidativos induzidos pela radiação UVB aguda, sustentando o uso tradicional de *Arnica montana* para o tratamento de distúrbios da pele.

Palavras-chave

Radiação solar, inflamação, estresse oxidativo, fitoterápicos.

ABSTRACT

Ultraviolet radiation types A and B (UV) (315-400nm and 280-315nm respectively) are the main components present in sunlight known to cause damage and skin lesions. *Arnica montana* is a plant that has been widely studied for containing anti-inflammatory, healing and analgesic properties capable of preventing or ameliorating lesions. Therefore, the present study sought to investigate the therapeutic effect of topical application of *Arnica montana* (30 grams containing 30% *Arnica montana* dye) on parameters such as edema, oxidative stress and inflammatory reaction in the ear of mice after acute exposure to UVB radiation. The results of the present study showed that topical treatment with *Arnica montana* reduced the UVB-induced inflammatory response as demonstrated by the reduction of ear edema and the inhibition of myeloperoxidase activation and the gene transcription factor of inflammatory molecules (nuclear factor kappa B, NF- κ B), which contributed to the reduction of inflammatory cytokines such as interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ). In addition, *Arnica montana* treatment ameliorated oxidative damage mediated by UVB radiation, as demonstrated by the reduction of lipid peroxidation, protein oxidation and elevated tissue antioxidant and glutathione content. In conclusion, the present study demonstrated the efficacy of homeopathic treatment with *Arnica montana* ointment in alleviating the inflammatory process and oxidative damage induced by acute UVB radiation, sustaining the traditional use of *Arnica montana* for the treatment of skin disorders.

Keywords

Solar radiation, inflammation, oxidative stress, herbal medicines.

**Este trabalho está na forma de artigo científico seguindo as normas da
revista**

Revista de nutrição/ Brazilian Journal of Nutrition

Efeito anti-inflamatório da *Arnica montana* em lesões cutâneas induzidas por
radiação UVB em camundongos

Categorias:

Bioquímica nutricional e nutricosméticos

Autores:

Josiéle da Silva Prade, Leandro Cattelan Souza¹

1. Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às
Moléculas Bioativas, Universidade Federal do Pampa, Itaqui, CEP 97650-000,
RS, Brasil.

Correspondência pode ser enviada para:

Leandro Cattelan Souza

Número de telefone: 55 3432-1853

E-mail: leandrocattelan@hotmail.com

SUMÁRIO

1. Introdução-----	01
2. Materiais e Métodos-----	03
2.1 Animais-----	03
2.2 Pomada de <i>Arnica montana</i> -----	03
2.3 Delineamento Experimental-----	03
2.4 Modelo radiação UVB-----	04
2.5 Mensuração do edema na orelha-----	05
2.5.1 Edema da orelha-----	05
2.5.2 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)-----	05
2.6 Marcadores estresse oxidativo-----	05
2.6.1 Peroxidação lipídica-----	05
2.6.2 Potencial Antioxidante Total (TRAP)-----	06
2.6.3 Reatividade Antioxidante Total (TAR)-----	06
2.6.4 Níveis de Glutathione (GSH)-----	07
2.6.5 Níveis de Proteína Carbonilada (PC)-----	07
2.7 Níveis de marcadores inflamatórios-----	08
2.8 Análises Estatísticas-----	08
3. Resultados-----	08
3.1 Efeito da <i>Arnica montana</i> sobre o edema da orelha e infiltração leucocitária induzidos pela radiação UVB-----	08
3.2 Efeito da <i>Arnica montana</i> sobre o estresse oxidativo induzido por UVB-----	09
3.2.1 Avaliação do Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)-----	09
3.2.2 Níveis de glutathione reduzida (GSH)-----	10
3.2.3 Níveis de proteínas carboniladas-----	10
3.2.4 Proteção à lipoperoxidação de membrana -----	10
3.3 Efeito da <i>Arnica montana</i> sobre a inflamação induzida por UVB -----	12
4. Discussão-----	15
5. Conclusão-----	16
6. Referências-----	16

1. Introdução

A pele humana é o órgão mais externo do corpo, que tem como função primordial a defesa do organismo contra danos causados por agentes estressores, como por exemplo, meio ambiente, poluição, penetração de micro-organismos na pele, incluindo a exposição à luz solar [1,2].

As radiações UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) e o UVC (100-280nm) são os principais componentes presentes na luz solar, e são conhecidos por causarem danos e lesões de pele, sobretudo às radiações UVA e UVB [3]. Quando a pele fica exposta em longo prazo aos raios UVA e UVB, estes são capazes de atravessar a epiderme e alcançar a derme da pele, causando inflamação e aumento do estresse oxidativo [4]. Nesse sentido, o estresse oxidativo, causará danos aos componentes celulares, podendo resultar em envelhecimento e carcinogênese [5]. Em resposta, são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) como forma de eliminar agentes agressores, na forma de fagocitose, pois desempenham importante função fisiológica [6,7,8].

O excesso de exposição à radiação ultravioleta (UV) ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) como via de sinalização celular em resposta ao processo inflamatório da pele e também no processo de envelhecimento [9]. Os danos mediados por UVB faz com que os leucócitos circulantes na corrente sanguínea, neutrófilos, monócitos e linfócitos migrem rapidamente para a área afetada [10,11], promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as interleucinas 1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), todas reguladas pelo NF- κ B [11,12].

O organismo humano possui sistemas antioxidantes, que exercem papel fundamental na proteção ao estresse oxidativo e na detoxificação de drogas [13,14]. Tendo assim, a glutatona como um componente protetor celular, que desempenha papel fundamental na manutenção e no equilíbrio normal entre espécies oxidantes e antioxidantes, regulando muitas funções vitais da célula, como síntese e reparação do DNA, síntese de reparação de proteínas e ativação e regulação de enzimas [15,16]. A superprodução de EROS geram morte celular por necrose ou apoptose, através de interações com moléculas de lipídeos, proteínas e com o ácido desoxirribonucleico (DNA) [8].

O desequilíbrio fisiológico gerado dentro da célula ou tecido/órgão, provoca desordens entre os níveis de radicais livres produzidos e suas defesas antioxidantes [8,17].

Diante a essas problemáticas a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incluído o uso de plantas medicinais *in natura* ou de produtos que as contenham no contexto da medicina tradicional [18]. De modo que promova a saúde, estes medicamentos são de baixo custo, fácil aquisição e que vem sendo muito utilizados na forma de tratamento de diversas patologias [19]. Além disso, podem influenciar na minimização de interações medicamentosas e na redução da polifarmácia. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação da produção e comercialização dos medicamentos fitoterápicos. A ANVISA define como fitoterápico “o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais” [20].

Dentre as diversas plantas que desempenham papel terapêutico, em razão de suas propriedades funcionais, podemos destacar a *Arnica montana*, pertencente à família *compositae*, com mais de 1.530 gêneros e mais de 20.000 espécies, considerada a maior família do reino vegetal [21]. A *Arnica montana* é uma planta que se apresenta como um arbusto perene, podendo atingir entre 20 a 60 cm de comprimento. Ela produz flores amarelas que desprendem um aroma agradável, as quais juntamente com as raízes, são utilizadas na fabricação de medicamentos [22]. Embora seja oriunda de regiões montanhosas da Europa e América do Norte, a *Arnica montana* parece estar bem aclimatada no Brasil, sobretudo nas regiões montanhosas de Minas Gerais e da região Sul [23].

Os primeiros registros sobre os efeitos farmacológicos da *Arnica montana* se deram na Alemanha do século XII, quando a mesma era utilizada para curar as feridas dos soldados durante a segunda guerra mundial [24]. Desde a sua descoberta até os dias de hoje, esta planta vem sendo utilizada em ensaios pré-clínicos e clínicos com ação anti-inflamatória e antioxidante comprovada [25], também como cicatrizante, antisséptica, analgésica e para o tratamento de condições pós-reumáticas e pós-operatórias que ocasionam dor tecidual e edema [26].

Nesse sentido, a fim de ampliar os usos terapêuticos da *Arnica montana* e elucidar ainda mais a sua ação anti-inflamatória e antioxidante, este estudo buscou verificar a ação desse fitoterápico em um modelo de lesão cutânea por radiação UVB em camundongos. Para tanto, foi investigado o efeito terapêutico da aplicação tópica de *Arnica montana* sobre parâmetros como edema, estresse oxidativo e reação inflamatória na orelha de modelo animal de exposição (camundongos) expostos à uma irradiação aguda de UVB.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 25 camundongos *Swiss* jovens (90 dias de idade) machos, pesando entre 40-50 g, obtidos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foram mantidos em caixas de polipropileno sob condições controladas de luz, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso a alimento e água. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de cuidados e uso de animais experimentais, sendo a pesquisa aprovada pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (Unipampa).

2.2 Pomada de *Arnica montana*

A pomada de uso tópico de *Arnica montana* (25 gramas) foi manipulada na farmácia local, contendo 30% da tintura da *Arnica montana*. E, a pomada de Dexametasona (15 gramas) para fins de controle positivo foi adquirida comercialmente da marca Teuto. Após 20 horas da aplicação das pomadas, todos os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram as orelhas removidas para as análises bioquímicas (**Fig. 1**).

2.3 Delineamento Experimental

O experimento ocorreu com 25 camundongos foram divididos em 5 grupos (n=5): (1) *naive*; (2) veículo; (3) UVB/veículo; (4) UVB *Arnica montana*; e (5) UVB dexametasona. Os animais do grupo 1 (*naive*) não receberam irradiação e nenhuma formulação tópica (grupo controle). Os animais do grupo 2 não receberam irradiação e foram tratados com uma pomada sem princípio ativo (veículo). Os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram expostos à radiação UVB em um

período de 3 horas. Após uma hora do término da radiação, os animais do grupo 3 foram tratados com uma pomada sem princípio ativo (controle negativo), os animais do grupo 4 foram tratados com a pomada de *Arnica montana* e nos animais do grupo 5 foi aplicada a pomada de dexametasona (controle positivo). Antes e 20 horas após a irradiação UVB, foi avaliado o edema da orelha dos animais através da mensuração de suas espessuras. Com o auxílio de uma espátula, aplicou-se a pomada de *Arnica Montana* (30/g contendo 30% tintura de *Arnica montana*) e a pomada de dexametasona (15/g com concentração de 1mg/g) até que toda a orelha fosse coberta pelas pomadas.

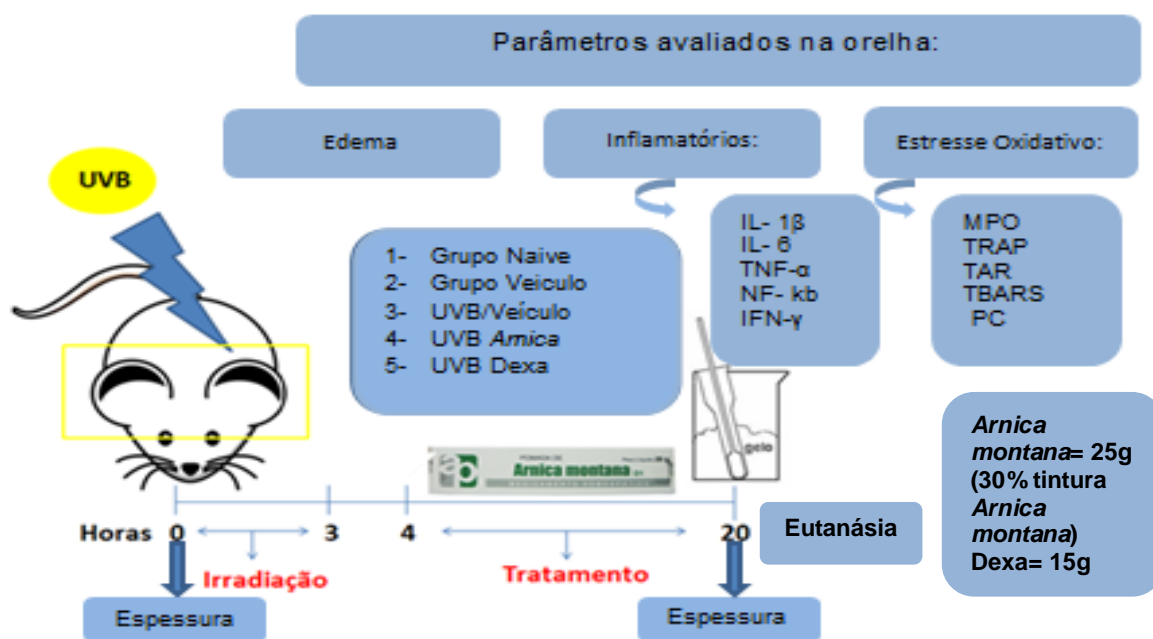


Figura 1. Procedimentos experimentais: Raios ultravioleta B, UVB; dexametasona, Dexa; interleucina-1beta IL-1 β ; interleucina-6, IL-6; fator de necrose tumoral alfa, TNF- α ; fator nuclear Kappa B, NF- κ B; interferon-gama, IFN- γ ; mieloperoxidase, MPO; potencial reativo antioxidante total, TRAP; reatividade antioxidante total, TAR; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); Proteína carbonilada, PC.

2.4 Modelo de radiação UVB

A fonte de irradiação UVB consistiu em uma lâmpada Philips TL40W / 12 RS (Medical-Eindhoven, Holanda) montada a 20 cm acima de onde os camundongos foram colocados e que emitiram um espectro de luz contínua entre 270 e 400 nm com pico de emissão a 313 nm [27]. No tempo de 20h após a aplicação das pomadas, todos os animais foram submetidos à eutanásia

através de uma dose de pentobarbital (180 mg/kg; intraperitoneal). As orelhas dos animais foram removidas e homogeneizadas em tampão Tris 50 mM (pH 7,4), centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante (S₁) foi removido e as amostras imediatamente congeladas a -20°C para os ensaios bioquímicos.

2.5 Mensuração do edema na orelha e migração de leucócitos

2.5.1 Edema da orelha

As lesões fotodinâmicas da pele foram induzidas por irradiação UVB e o processo inflamatório foi avaliado através da formação de edema na orelha. O edema foi medido pelo aumento da espessura da orelha após a irradiação UVB. A espessura da orelha foi avaliada antes e 20h após a irradiação UVB usando um micrômetro digital (Digimes) em animais anestesiados com pentobarbital. O micrômetro foi aplicado perto da ponta da orelha apenas distal aos cumes cartilagosos. A espessura foi expressa em mm. Para minimizar a variação, um único investigador realizou as medições ao longo de cada experimento, no início da radiação e ao final de 20 horas do tratamento em uma única vez.

2.5.2 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A migração de leucócitos induzida por irradiação UVB na pele da orelha foi avaliada usando o ensaio da atividade da enzima MPO. Para a sua avaliação, a amostra foi incubada com tampão de acetato e solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (18,4 mM) a 37°C. A reação foi interrompida no gelo pela adição de ácido acético. A cor formada foi analisada por um espectrofotômetro a 630nm [28].

2. 6 Marcadores de estresse oxidativo

2.6.1 Peroxidação lipídica

Uma alíquota de 200/μl de enxofre (S₁) a partir de tecido da orelha dos camundongos pertencentes aos grupos experimentais foram adicionadas à mistura reacional contendo 500/μl de ácido tiobarbitúrico a 0,8%, 200/μl de dodecilsulfato de sódio a 8,1% e 500/μl de ácido acético (pH 3,4), e foram incubadas a 95°C durante 2h. As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

(TBARS) foram determinadas conforme descrito por [29]. O malondialdeído (MDA), formado como um produto final de peroxidação lipídica, serviu como índice da intensidade do estresse oxidativo. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico para gerar um produto colorido que pode ser medido opticamente a 532 nm. A peroxidação lipídica foi expressa como nanomoles de equivalentes de MDA por mg de tecido.

2.6.2 Potencial Antioxidante Total (TRAP)

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido foi realizada segundo o método de [30]. Esta determinação é dada pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelos radicais peróxila gerados através da decomposição térmica do 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10mM, luminol 4 mM e Trolox 80/ μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Para a contagem basal (120 segundos), foram adicionados 4 ml de solução de ABAP 10 mM ao vial. A seguir 10/ μ L da solução de luminol foram acrescentados e lidos por mais 120 segundos. Essa medida foi considerada o valor inicial. Foram colocados então, 10/ μ l da solução de Trolox 80/ μ M, o qual diminuiu essa luminescência por determinado tempo até os valores iniciais. Para a medida das amostras, adicionou-se 10/ μ l de homogeneizado previamente incubado com o referido ácido nas concentrações testadas. O tempo necessário para que a luminescência retornasse ao valor inicial foi considerado o tempo de indução. O tempo de indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido comparado com o tempo de indução do Trolox. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

2.6.3 Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A medida da reatividade antioxidante total (TAR) representa a qualidade dos antioxidantes de um determinado tecido ou órgão. A TAR é determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida

pelo 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente [31]. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10/mM, luminol 4/mM e Trolox 80/ μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Inicialmente, a quimiluminescência basal é medida em cintilador através da adição de 4/ml de ABAP 2,0/mM em um tubo no escuro. Em seguida 15/ μ l de luminol foram adicionados ao vial e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor inicial. 10/ μ l de Trolox 10-100/ μ M (curva de calibração) ou amostras foram então adicionados a quimiluminescência foi medida durante 60 seg. O Trolox ou a amostra reduz a quimiluminescência inicial e essa rápida redução na intensidade gerada pelo luminol é considerada uma medida da TAR. A medida da TAR foi expressa como nmol de Trolox/mg de proteína.

2.6.4 Níveis de Glutationa (GSH)

Os níveis de GSH da pele da orelha foram determinados usando o teste de fluorescência [32]. A fluorescência foi determinada após 15 min (λ_{exc} = 350/nm; λ_{em} = 420/nm) e os valores referidos em uma curva padrão preparada com 0-40/ μ M de GSH. Os resultados são apresentados como μ M de GSH/mg/tecido.

2.6.5 Níveis de Proteína Carbonilada (PC)

O teor de carbonilo foi ensaiado por um método baseado na reação de carbonilos de proteína com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) formando dinitrofenil-hidrazona, um composto amarelo, medido por espectrofotometria a 370 nm [33]. O homogeneizado (sem centrifugação) foi diluído com tampão Tris-HCl, pH 7,4, numa proporção de 1: 8 (p / v). Três tubos contendo alíquotas de 01 ml do homogeneizado diluído foram incubados a 37 graus durante 2 horas. Um volume de 200 μ l de DNPH 10 mM dissolvido em HCl 2,0 M foi adicionado a dois tubos (duplicado). No terceiro tubo, adicionou-se 200 μ l de solução de HCl 2,0 M (em branco). Após a incubação, à temperatura ambiente, durante 1 h numa atmosfera escura, 500 μ l de tampão de desnaturação (tampão de fosfato de sódio 150 mM, pH 6,8, contendo 3% de

dodecilsulfato de sódio), 1,5 ml de heptano (99,5%) e 1,5 ml de etanol (99,8%) foram adicionados sequencialmente. Os tubos foram agitados com um misturador de vórtice durante 40 s e centrifugados durante 15 min. Em seguida, a proteína isolada da interface foi lavada duas vezes com 01 ml de acetato de etilo / etanol 1: 1 (v / v) e suspensa em 1 ml de tampão de desnaturação. A carbonilação total foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar de 22,000 M⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos como conteúdo de carbonilo (μM/mg de proteína).

2.7 Níveis de marcadores inflamatórios

Foram medidos os níveis de TNF-α, IL-1β, IL-6, INF-γ e NF-κB no tecido da orelha usando alíquotas de amostra de 100μl e kits ELISA RatCytokineDuoSet de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (intervalo de proteína 31.25-2000pg). O nível de citocina foi estimado por interpolação a partir de uma curva padrão por medidas colorimétricas a 450nm (comprimento de onda de correção 540nm) em um leitor de placas ELISA (Berthold Technologies-Apollo 8-LB 912, KG, Alemanha). Os resultados estão expressos em pg/mg de tecido da pele da orelha.

2.8 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram analisadas por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* de Newman-Keuls. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo. Todos os testes foram realizados utilizando o software Graph Pad Prism 5.0.

3. Resultados

3.1 Efeito da *Arnica montana* sobre o edema da orelha e infiltração leucocitária induzidos pela radiação UVB

A exposição aos raios UVB causaram edema significativo na orelha dos camundongos ($p < 0.001$). O tratamento com *Arnica montana*, por sua vez, reduziu o edema induzido por UVB ($p < 0.05$), de modo bastante parecido com o tratamento com dexametasona ($p < 0.05$; controle positivo) (**Fig.2A**).

A MPO desempenha um importante papel no sistema imune inato por ser considerado um marcador bioquímico da infiltração de células inflamatórias em tecidos danificados. Como evidenciado pela **figura 2B**, observou-se aumento significativo da enzima MPO após a exposição à radiação UVB ($p < 0,001$). O tratamento com a pomada de *Arnica montana*, reduziu parcialmente o processo inflamatório, de modo semelhante ao grupo dexametasona ($p < 0,05$).

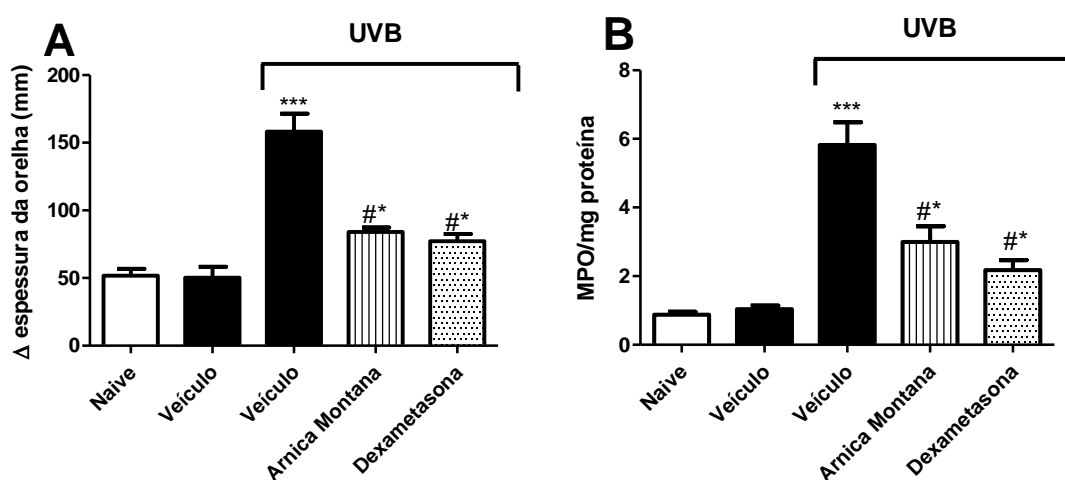


Figura 2. Efeito tópico da pomada de *Arnica montana* e dexametasona em lesões cutâneas induzidas por irradiação UVB em camundongos. Edema da orelha (A) e atividade da mieloperoxidase (B) no tecido das orelhas dos camundongos. Os valores são expressos em média \pm S.E.M. ($n = 5$ por grupo). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ e ***: $p < 0,001$ quando comparado com o grupo naive; #: $p < 0,05$ quando comparado com o veículo/UVB (uma ANOVA seguida do teste de comparação múltipla post hoc Newman-Keuls).

3.2 Efeito da *Arnica montana* sobre o estresse oxidativo induzido por UVB

3.2.1 Avaliação do Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR)

Em relação ao potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) demonstrados nas **figuras 3A e 3B**, foi possível observar uma diminuição significativa nos níveis de potencial antioxidantes nos tecidos das orelhas dos camundongos em ambos os grupos expostos à

radiação UVB ($p < 0,001$). Ao receberem o tratamento tópico com a pomada de *Arnica montanae* dexametasona, esses potenciais antioxidantes aumentaram ($p < 0,05$), mostrando que o tratamento com *Arnica Montana* foi tão eficaz quanto o tratamento com Dexametasona/controle positivo.

3.2.2 Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) é um dos principais componentes não enzimáticos de defesa antioxidante do nosso organismo e a sua redução é indicativo de estresse oxidativo. Quando o tecido das orelhas dos camundongos foi exposto à radiação UVB, esse componente reduziu seu conteúdo significativamente ($p < 0,001$). Por outro lado, o tratamento com *Arnica montana* reverteu parcialmente à diminuição dos níveis de GSH induzidas por UVB ($p < 0,01$), sendo este resultado mostrando-se superior ao tratamento com dexametasona ($p < 0,05$)(**Figura3C**).

3.2.3 Níveis de proteínas carboniladas

Os resultados obtidos de proteína carbonilada (PC) demonstraram aumento significativo de oxidação proteica, através da exposição ao UVB ($p < 0,01$). Nota-se que com o tratamento das pomadas de *Arnica montana* e dexametasona, os camundongos tiveram ação protetora contra ação oxidativa das espécies reativas sobre as proteínas. É importante ressaltar que o tratamento da *Arnica montana* reduziu a oxidação de proteínas induzidas por UVB de maneira mais significativa ($p < 0,01$) em relação ao tratamento com dexametasona ($p < 0,05$; **Fig.3D**).

3.2.4 Proteção à lipoperoxidação de membrana

Foi relatado que a radiação UVB gera produção de EROs, inflamação e danos na pele, promovendo aumento de todos os parâmetros de estresse oxidativo. A lipoperoxidação exerce um papel muito importante na proliferação celular, especialmente em células tumorais. No entanto, quando em excesso causa danos celulares, dependendo da quantidade de lipídeos que sofrem essa alteração [34].

Neste estudo a capacidade de proteção contra a lipoperoxidação de membrana demonstrou que o tratamento com a pomada de *Arnica montana*

obteve melhores resultados ($p < 0,01$) com relação ao controle positivo dexametasona ($p < 0,05$), conferindo proteção do tecido exposto à radiação UVB (Fig.3E).

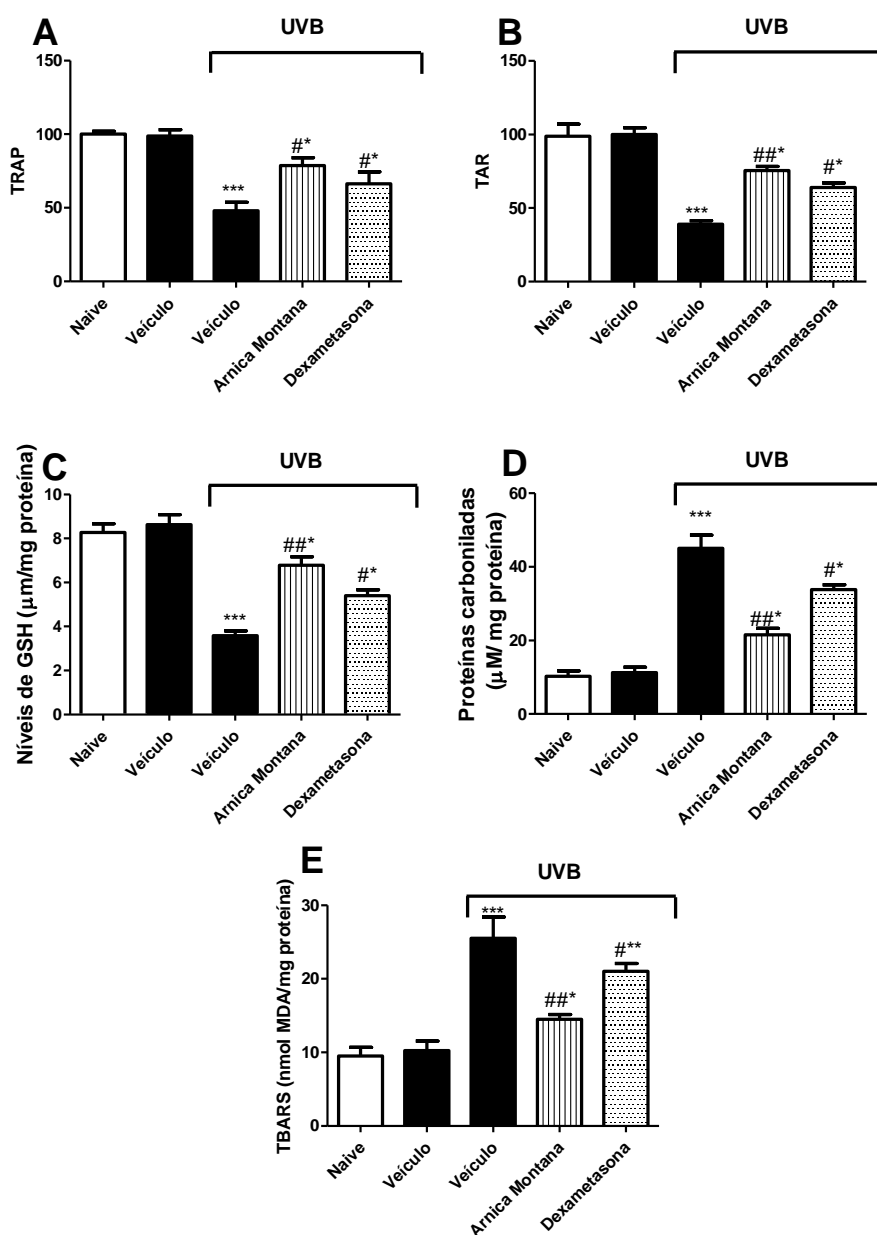


Figura 3. Efeito da ação antioxidante dapomada de *Arnica montana* e dexametasona no tecido da orelha de camundongos. TRAP (A), TAR (B), GSH (C), PC (D) e TBARS (E). Os valores são expressos em média \pm S.E.M. ($n = 5$ por grupo). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ e ***: $p < 0,001$ quando comparado com o gruponaive; #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$ quando comparado com o veículo/UVB (ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas *post hoc* Newman-Keuls).

3.3 Efeito da *Arnica montana* sobre a inflamação induzida por UVB

De modo geral, os resultados demonstraram que a radiação UVB induziu um aumento expressivo na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ ($p < 0.001$) e um aumento bastante pronunciado nos níveis do fator de transcrição de citocinas NF- κ B ($p < 0.001$) nos tecidos das orelhas dos camundongos (**Fig. 4A, 4B, 4C e 4D**, respectivamente). Em contraste, o tratamento com *Arnica montana* e Dexametasona reduziu de maneira significativa o aumento nos níveis de marcadores inflamatórios induzidos por UVB nos tecidos das orelhas dos camundongos ($p < 0.01$; **Fig.4**).

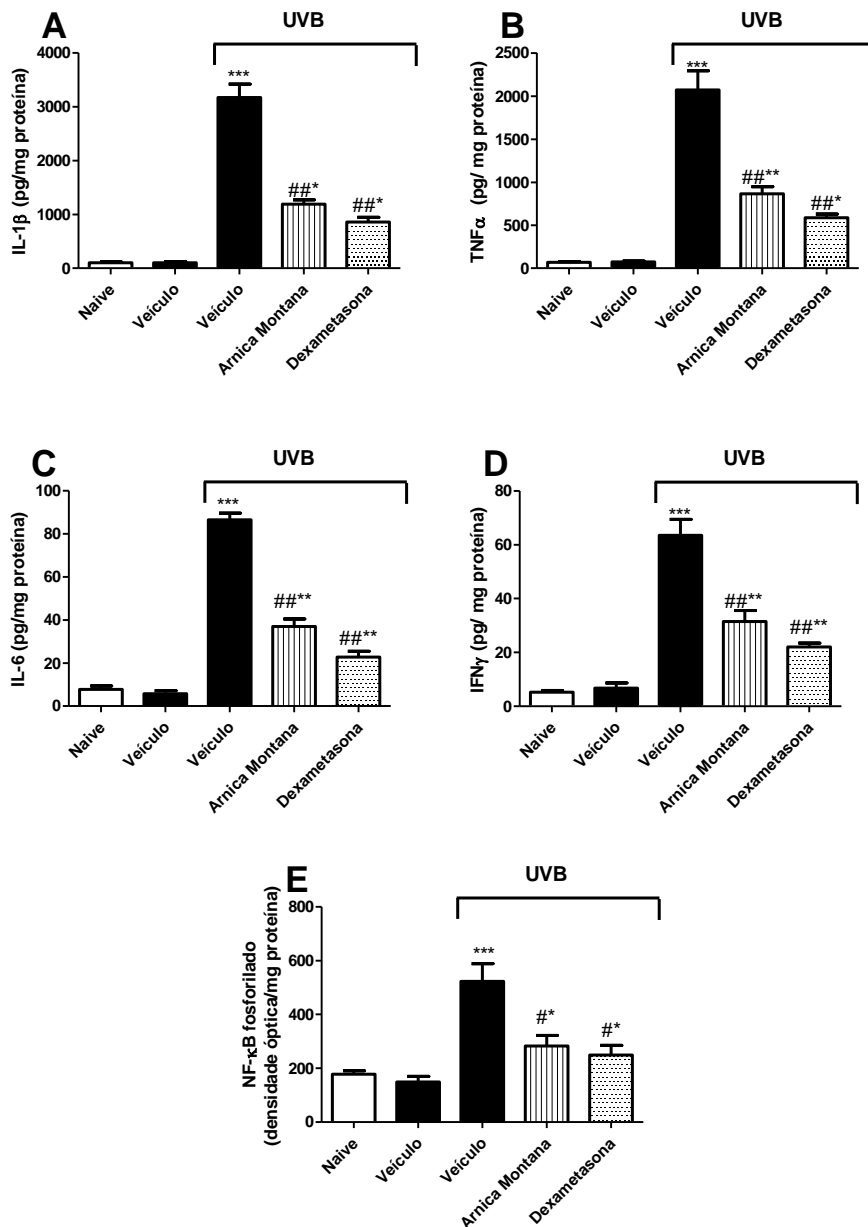


Figura 4. Efeito do tratamento com *Arnica montana* em marcadores pró-inflamatórios induzidos por radiação UVB em camundongos: IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IFN- γ (D), NF- κ B (E). Os valores são expressos em média \pm S.E.M. (n = 5 por grupo). *: p <0,05, **: p <0,01 e ***: p <0,001 quando comparado com o grupo naïve; #: p <0,05, ##: p<0,01 quando comparado com o veículo/UVB (ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas *post hoc* Newman-Keuls).

4. Discussão

Neste estudo foi possível verificar a ação tópica da pomada de *Arnica Montana* em modelo de inflamação aguda na orelha de camundongos. Foi avaliado o seu efeito terapêutico através da modulação de marcadores inflamatórios e oxidativos após a exposição aguda à radiação UVB. Com a absorção e retenção tópica da pomada de *Arnica montana*, alguns parâmetros nocivos foram reduzidos, e outros aumentaram suas propriedades protetoras.

O dano induzido por UVB é geralmente associado à superprodução de espécies reativas (RS) e aos danos nos mecanismos de defesa antioxidante [35]. A radiação ultravioleta (UV) é absorvida por diversos cromóforos na pele, tais como: melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano, ácido urocânico, entre outros [35,36]. Essa absorção da radiação UV gera reações fotoquímicas diferentes e interações secundárias, envolvendo espécies reativas do oxigênio, resultando em efeitos prejudiciais quando a exposição ocorre em excesso [35,36]. Além disso, a exposição crônica ao UVB pode levar à carcinogênese cutânea e ao envelhecimento precoce da pele [37]. Nesse sentido, a radiação UVB apresenta amplos efeitos biológicos na pele, levando a uma variedade de reações cutâneas adversas, incluindo eritema, edema, queimaduras, hiperplasia, inflamação e imunossupressão [38,39].

A radiação UVB pode afetar várias vias de sinalização celular responsáveis pela inflamação da pele [40] e aumentar a atividade da MPO. Foi sugerido que a MPO seja a responsável pelo desenvolvimento do edema e da inflamação da pele induzida por UVB, possivelmente por regular as citocinas expressas na pele [40]. A MPO é produzida por neutrófilos e tem sido amplamente utilizada para quantificar a inflamação e o influxo de neutrófilos

nos tecidos [41]. No presente estudo, a exposição à irradiação UVB causou um aumento significativo no edema da orelha juntamente com um aumento na atividade da MPO em comparação com o grupo *naïve*. Aplicação tópica com a pomada de *Arnica Montana* mitigou tanto o edema da orelha quanto a ativação da MPO induzida pela radiação UVB, evidenciando suas atividades anti-inflamatórias e fotoprotetoras. Portanto, este resultado está em linha com dado anterior [40], indicando que o tratamento tópico com *Arnica montana* pode ter bloqueado a produção de radicais livres e, conseqüentemente, causando uma inibição da atividade da MPO e uma redução de migração de neutrófilos para a área afetada, reduzindo o edema.

De acordo com Kawakami *et al.* [37] a *Arnica montana* é uma planta amplamente utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório. Foi reportado que o tratamento tópico com *Arnica montana* foi capaz de reduzir a inflamação da pata induzida por carragenina a 1% em ratos *Wistar* [37]. Ainda, foi demonstrada a ação anti-inflamatória do gel de *Arnica montana* em ratos com lesão muscular aguda [42]. O uso tópico da pomada de *Arnica montana* contém polifenóis com atividade antioxidante que pode efetivamente proteger a pele do dano oxidativo. A *Arnica montana* é constituída por lactonas sesquiterpênicas, além de óleos essenciais terpenóides que contém timol, flavonoides e compostos fenólicos, especialmente ácido clorogênico [33]. Acredita-se que sua eficiência no tratamento de ferimentos e hematomas deve-se a presença de uma substância antioxidante denominada quercetina, um flavonoide natural presente nas plantas, capaz de aumentar a resistência dos vasos e a irrigação sanguínea nesses locais, reduzindo assim o processo inflamatório [22].

No presente estudo alguns parâmetros de estresse oxidativo foram notavelmente modulados pelo tratamento da pomada de *Arnica montana*. Neste sentido, a *Arnica montana* conferiu um importante efeito antioxidante ao reduzir os níveis de peroxidação lipídica e os níveis de proteínas oxidadas no tecido da pele dos camundongos expostos à radiação UVB. Não obstante, o tratamento com a pomada de *Arnica montana* também amenizou a diminuição expressiva dos níveis de TRAP, TAR e GSH na pele da orelha dos camundongos, provocada pela radiação UVB. Aqui, nós sustentamos claramente a ação anti-inflamatória e antioxidante dos princípios ativos da

Arnica montana, como as lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e carotenóides, conferindo proteção à pele dos animais. Foi demonstrado que agindo através da penetração da barreira da pele, a *Arnica montana* é eficaz em conferir um importante efeito terapêutico [22]. O nosso trabalho também corroborados prévios da literatura que relataram o efeito antioxidante da *Arnica montana*, com proteção a danos mitocondriais e redução da peroxidação lipídica [25]. Portanto, a redução dos danos oxidativos e o aumento das defesas antioxidantes parecem ser os mecanismos biológicos pelos quais a *Arnica montana* exerce seu efeito terapêutico contra as injúrias cutâneas provocadas pela irradiação UVB na pele dos camundongos.

Além dos efeitos oxidativos diretos causados por UVB, o processo inflamatório gerado pela ação dos radicais livres UVB-induzidos pode aumentar a ativação do NF- κ B. Este fator de transcrição nuclear é responsável por aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, que são consideradas importantes mediadores da inflamação em queratinócitos epidérmicos [40,43,44,45]. No nosso estudo, a radiação UVB causou um aumento drástico nos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ no tecido das orelhas dos camundongos. Por outro lado, o tratamento tópico com a pomada de *Arnica Montana* diminuiu significativamente a produção destas citocinas pró-inflamatórias, sustentando seu efeito anti-inflamatório. A inibição da IL-1 β pode estar intimamente associada à inibição da atividade MPO, porque a IL-1 β é quimiotáxica para os neutrófilos [40,41], indicando que a inibição da produção de IL-1 β pode diminuir o recrutamento de neutrófilo e, portanto, a atividade MPO. Além disso, o tratamento com *Arnica montana* bloqueou a ativação do NF- κ B induzida por UVB, demonstrando claramente sua ação anti-inflamatória ao bloquear a transcrição gênica, através da inibição deste fator muito importante na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios.

É importante ressaltar que os efeitos terapêuticos demonstrados pela *Arnica montana* em nosso estudo foram bastante similares ou até mesmo superiores aos efeitos produzidos pela dexametasona, o qual é um anti-inflamatório amplamente utilizado na medicina. Considerados em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a ação tópica da *Arnica*

montana pode ser uma importante opção terapêutica para o tratamento de lesões de pele induzidas pela irradiação UVB aguda.

5. Conclusão

O presente estudo demonstrou a eficácia do tratamento homeopático com a pomada de *Arnica montana* em aliviar o processo inflamatório e os danos oxidativos induzidos pela irradiação UVB aguda. Os extratos de *Arnica montana* são ricos em flavonoides e ácidos fenólicos, demonstrando uma importante atividade antioxidante e anti-inflamatória no tecido das orelhas de camundongos. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem novas evidências e sustentam o uso tradicional de *Arnica montana* para o tratamento de distúrbios da pele.

6. Referências

- [1] Kim Y, Lee SK, Bae S, Kim H, Park Y, Chu NK, et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Immunology letters*. 2013; 149 (1): 110-118.
- [2] Cavinato M, Jansen-Durr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Experimental gerontology*. 2017; 94: 78-82.
- [3] Almeida RLD. Participação de frações do extrato hidroalcoólico de raiz de *Pothomorpheumbellata* isentas de 4-nerolidilcatecol na atividade antioxidante e inibitória de metaloproteinases 2 e 9 na pele [tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo; 2011.
- [4] Cavinato M, Waltenberger B, Baraldo G, Grade CVC, Stuppener H, Jansen-Durr P. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 2017; 1-18.

[5] Kong SZ, Shi XG, Feng XX, Li WJ, Liu WH, Chen ZW, *et al.* Inhibitory effect of hydroxysafflor yellow A on mouse skin photoaging induced by ultraviolet irradiation. *Rejuvenation research*. 2013; 16 (5): 404-413.

[6] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002; 82 (1): 47-95.

[7] Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nature immunology*. 2002; 3 (12): 1129-1134.

[8] Murta GL. Estudo dos efeitos oxidantes sobre a resposta inflamatória pulmonar em ratos expostos a diferentes concentrações de formaldeído [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de Ouro Preto, 2015.

[9] Zhan JYX, Wang XF, Liu YH, Zhang ZB, Wang L, Chen JN, *et al.* Andrographolide sodium bisulfate prevents UV-induced skin photoaging through inhibiting oxidative stress and inflammation. *Mediators of inflammation*. 2016 [citado 2017 novembro 10]; 12. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3271451>.

[10] Comim CM, Mathia GB, Hoepers A, Tuon L, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, *et al.* Neurotrophins, cytokines, oxidative parameters and functionality in progressive muscular dystrophies. *An Acad Bras Cienc*. 2015; 87(3):1809-18.

[11] Rodriguez-Cruz M, Cruz-Guzám ODR, Almeida-Becerril T, Solís-Serna AD, Atilano-Miguel S, Sanchez-Gonzalez JR, *et al.* Potential therapeutic impact of omega-3 long chain-polyunsaturated fatty acids on inflammation markers in Duchenne muscular dystrophy: a double-blind, controlled randomized trial. *Clinical Nutrition*. 2017; 1-12.

[12] Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in skeletal muscle regeneration: studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-)/LT- α (-/-) mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001; 49 (8): 989-1001.

[13]Kumaraguruparan R, Balachandran C, Manohar BM, Nagini S. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. *VeterinaryResearch Communications*. 2005; 29: 287-96.

[14] Silva CLD. Avaliação da glutathione e suas enzimas, e do estresse oxidativo como marcadores prognósticos e preditivos de neoplasia mamária em cadelas [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2012.

[15]Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importanceofglutathione in humandisease. *Biomedicine&Pharmacotherapy*. 2003; 57 (3): 145-155.

[16]Neto ASDSR. Glutathione [tese]. Porto: Universidade Fernando Pessoa Faculdade Ciências da Saúde.2010.

[17] Pradeep AR, Ramchandraprasad MV,Bajai P, Rao NS, Agarwal E. Protein carbonyl: An oxidative stress marker in gingival crevicular fluid in healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects. *ContempClin Dent*. 2013; 4 (1): 27-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703690>.

[18] Brasil. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

[19] Borsato AV, Feiden A. Biodiversidade Funcional e as Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. Embrapa Pantanal-Documents (INFOTECA-E). 2011; 119: 1-12.

[20] Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução no. 88 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

[21] Fontoura HDS. Influência das atividades anti-inflamatórias da arnica (*Lychnophoraericoides*) no tratamento de lesões musculares através do uso da fonoforese [tese]. Brasília: Universidade de Brasília, 2007.

[22] Marques MF. Estudo da resposta imunológica induzida por *Arnica montana* L. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista - Unesp Júlio de Mesquita Filho, 2006.

[23] Teske M, Trentini AMM. Compêndio de Fitoterapia. Herbarium. Compêndio de Fitoterapia: Herbarium Lab. Botânico, Curitiba: Paraná, 1994; 268.

[24] Yamada CSB. Fitoterapia: sua história e importância. Revista Racine. 1998; 43: 50-1.

[25] Camargo RAD, Costa EDD, Catisti R. Effect of the oral administration homeopathic *Arnica montana* on mitochondrial oxidative stress. Homeopathy. 2013; 102 (1): 49-53.

[26] Conforti A, Bellavite P, Bertani S, Chiarotti F, Menniti-Ippolito F, Raschetti R. Rat models of acute inflammation: a randomized controlled study on the effects of homeopathic remedies. Bio Med. Central. Complementary and Alternative Medicine. 2007; 7 (1): 1.

[27] Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Dorta DJ, Santos AC, Fonseca MJV. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2006; 84 (1): 21-27.

[28] Pegoraro NS, Barbieri AV, Camponogara C, Mattiazi J, Brum ES, Marchiori MCL, *et al.* Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017; 150: 32-40.

- [29]Ohakawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979; 95 (2): 351-358.
- [30]Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2, 2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free radical research communications*. 1992; 17 (5): 299-311.
- [31]Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995; 18 (2): 153-158.
- [32]Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem*. 1976; 74: 214-226.
- [33] Levine RL. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990; 186: 464-478.
- [34] Freitas BDJ. Possíveis marcadores de estresse oxidativo para câncer de pele não melanoma: efeito da suplementação de vitamina C, E e mineral zinco em indivíduos que tiveram câncer de pele não melanoma [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2014.
- [35] González S, Fernández-lorente M, Gilaberte-Calzada Y. The latestonskinphotoprotection. *ClinDermatol*. 2008; 26: 614-26.
- [36] Balogh TS, Velasco MVR, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011; 86 (4): 732-742.
- [37]Kawakami AP, Sato C, Cardoso TN, Bonamim LV. Inflammatory process modulation by homeopathic *Arnica montana* 6CH: The role of individual variation. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011; 12. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/917541>.

- [38]Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005; 571 (1): 153-173.
- [39] Kim SB, Kang OH, Joung DK, Mun SH, Seo YS, Cha MR. Anti-inflammatory effects of tectroside on UVB-induced HaCaT cells. *International journal of molecular medicine*. 2013; 31 (6): 1471-1476.
- [40] Souza ROD, Alves GDAD, Aguilera ALS, Rogez H, Fonseca MJV. Photochemoprotective effect of a fraction of a partially purified extract of *Byrsonimacrassifolia* leaves against UVB-induced oxidative stress in fibroblasts and hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017; 178: 53-60.
- [41]Campanini MZ, Pinho-Ribeiro FA, Ivan ALM, Ferreira VS, Vilela FMP, Vicentini FTMC, *et al.* Efficacy of topical formulations containing *Pimentapseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice, *J. Photochem. Photobiol.* 2013; 127:153–160.
- [42] Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS, João SMA, Casarotto RA. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. *Ultrasonics*. 2009; 49 (4): 466-471.
- [43]Karthikeyan R, Kanimozhi G, Prasad NR, Agilan B, Ganesan M, Mohana S, *et al.* 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF- κ B and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2016; 161 (2016): 170–176.
- [44] Pharm CP, Pharm AO, Pharm AS, Pharm DT, Pharm CV. Protective effect of red orange extract supplementation against UV-induced skin damages: photoaging and solar lentigines, *J. Cosmet. Dermatol.* 2014; 13 (2014): 151–157.

[45] Lim JY, Kim OK, Lee J, Lee MJ, Kang N, Hwang JK. Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice, *Nutr. Res. Pract.* 2014; 8 (2014): 398–403.