

Avaliação dos efeitos antienvhecimento por métodos *in vitro* e *ex vivo* de produto cosmético multifuncional

Assessment of antiaging effects by *in vitro* and *ex vivo* methods of a multifunctional cosmetic product

DOI:10.34119/bjhrv5n3-010

Recebimento dos originais: 14/02/2022

Aceitação para publicação: 28/03/2022

Andréa Bauer Bannach

Graduação em Medicina

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: deabannach@yahoo.com.br

Karen Cristina Rangel

Doutorado em Ciências

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: karen.rangel@ache.com.br

Camila Sirieiro Abreu

Mestre em Pesquisa, Desenvolvimento e Gestão na Indústria Farmacêutica

Instituição: FIOCRUZ

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: camila.abreu@ache.com.br

Flávia Cardoso Malés

Graduação em Farmácia

Instituição: Faculdade Oswaldo Cruz

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: flavia.males@ache.com.br

Douglas Costa Moraes

Graduação em Farmácia-Bioquímica

Instituição: FCFRP-USP

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: douglas.morais@ache.com.br

Gabriela Pacheco de Oliveira

Graduação em Farmácia-Bioquímica

Instituição: Faculdades Oswaldo Cruz

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: gabriela.oliveira@ache.com.br

Stevin Parreira Zung

Doutorado em ciências

Instituição: Universidade de São Paulo - USP

Endereço: Rod. Pres. Dutra, Km 222,2 – Porto da Igreja, Guarulhos/SP, CEP: 07034-904

E-mail: stevinzung@gmail.com

RESUMO

O envelhecimento causa alterações na epiderme e derme, como a redução da taxa de renovação celular do estrato córneo e síntese de componentes da derme, que são responsáveis pelos sinais clínicos da pele envelhecida, como rugas, flacidez e pigmentação irregular. Os produtos cosméticos multifuncionais, contendo ativos que atuam em diferentes marcadores moleculares envolvidos no processo de envelhecimento da pele, têm sido utilizados no tratamento anti-envelhecimento. Portanto, neste trabalho foram avaliados os efeitos na síntese de colágeno, elastina, ácido hialurônico e fator de crescimento epidérmico (EGF), e o potencial antioxidante de creme multifuncional contendo niacinamida, fucogel, Brightnyl, nanovit C LV, retinopeptide 189 e hexilresorcionol. O creme multifuncional foi capaz de reduzir a produção de radical superóxido e estimular a síntese de colágeno tipo I, elastina, EGF e ácido hialurônico, podendo, portanto, ser utilizado para a prevenção e tratamento do envelhecimento da pele.

Palavras-chave: ácido hialurônico, colágeno tipo i, elastina, fator de crescimento epidérmico (egf), espécies reativas de oxigênio (EROs).

ABSTRACT

Aging causes changes in the epidermis and dermis, such as a reduction in the rate of cell renewal in the stratum corneum and synthesis of dermis components, which are responsible for clinical signs of aging skin, such as wrinkles, sagging and irregular pigmentation. Multifunctional cosmetic products containing actives are able to act on different molecular markers involved in the skin aging process have been used in antiaging treatment. Therefore, in this article, the effects on the synthesis of collagen type I, elastin, hyaluronic acid and epidermal growth factor (EGF), and the antioxidant potential of a multifunctional cream containing niacinamide, fucogel, Brightnyl, nanovit C LV, retinopeptide 189 and hexylresorcionol were evaluated. The multifunctional cream reduced the production of superoxide radicals and stimulated the synthesis of collagen I, elastin, EGF and hyaluronic acid, so it can be used for prevention and treatment of skin aging.

Keywords: Collagen type I, Epidermal growth factor (EGF), Elastin; Hyaluronic Acid, Reactive oxygen species (ROS)

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua como barreira de proteção contra patógenos, luz ultravioleta, produtos químicos e lesões mecânicas, além de ser responsável por regular a temperatura corporal e a quantidade de água liberada para o meio ambiente. A pele é constituída por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme (Yousef *et al.*, 2020).

A epiderme é a camada mais externa da pele, e as principais células presentes nesta camada são os queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. As células mais abundantes

na epiderme são os queratinócitos, que são gerados constantemente na camada basal e então passam pela maturação, diferenciação e migração para a superfície levando a formação das outras três camadas da epiderme: a camada espinhosa, a camada granulosa e o estrato córneo. Desta forma, o tempo de trânsito dos queratinócitos da camada basal até o estrato córneo representa o tempo de renovação do estrato córneo (Honari, 2017).

A derme é composta principalmente pela matriz extracelular (MEC) e por fibroblastos. A MEC é constituída pela rede de fibras de colágeno (aproximadamente 80% colágeno tipo I) e fibras elásticas, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) e água. Os GAGs são polissacarídeos lineares e existem seis tipos de GAGs, incluindo ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, sulfato de queratana, sulfato de heparana e heparina. O ácido hialurônico presente na derme faz ligações cruzadas com outras proteínas do MEC, como o colágeno, conferindo maior estruturação ao tecido, além de exercer funções de preenchimento de espaço e absorção de impactos (Haydont *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2019).

No processo de envelhecimento ocorrem mudanças significativas na epiderme e derme. Na epiderme uma importante alteração é a diminuição da taxa de renovação do estrato córneo, sendo que esta mudança resulta no desenvolvimento de pilhas irregulares de corneócitos tornando a superfície da pele áspera e sem brilho. Na derme ocorre a diminuição da quantidade de colágeno, que é resultante do aumento da atividade das metaloproteinases da matriz e da deficiência da sinalização do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, também há uma redução na quantidade de outros componentes funcionais da MEC, incluindo fibras elásticas, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs). As alterações nos componentes dérmicos funcionais resultam no surgimento das características clínicas do envelhecimento, como rugas e redução da elasticidade (Baumann, 2007; Shin *et al.*, 2019).

A produção excessiva de EROs por fatores externos, como radiação UV e poluentes, não consegue ser completamente neutralizada pelas células através de antioxidantes endógenos levando, assim, ao processo de estresse oxidativo, que causa danos a várias macromoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (Lü *et al.*, 2010; Matsui, 2016). Os EROs produzidos pelas mitocôndrias contribuem para o processo de envelhecimento, pois a disfunção mitocondrial causada pelo estresse oxidativo é considerada um dos contribuintes para o envelhecimento (Warraich *et al.* 2020).

Desta forma, produtos cosméticos contendo ingredientes ativos capazes de aumentar a renovação celular e a expressão de componentes da derme, ou reduzir a produção de ROS atuam como produtos antienvhecimento. No presente estudo foi desenvolvido um creme

multifuncional contendo niacinamida, Brightnyl, fucogel, nanovit C LV, retinopeptide 189 e hexilresorcionol. A niacinamida (vitamina B3) é um antioxidante capaz de promover melhora no componente lipídico da barreira epidérmica reduzindo a perda de água transepidérmica; atua como um inibidor de transferência de melanossoma, melhorando a hiperpigmentação; e têm também demonstrado capacidade de reduzir significativamente linhas finas e rugas (Ramos-e-Silva *et al.*, 2013). O Brightenyl® é um alfa-glicosídeo estável e após convertido parcialmente em THBA pela camada do estrato microbiano atua na captura de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidos por radiação UV; evita danos ao DNA induzidos por UV; e bloqueia a síntese de melanina (Induchem, 2021). O Nanovit C é uma vitamina C nanoencapsulada, que é conhecida por estimular a síntese de colágeno melhorando a firmeza da pele, prevenir a lipoperoxidação da membrana e atuar como inibidor da melanogênese uniformizando o tom de pele (Enescu *et al.*, 2021). O retinopeptide 189 é capaz de aumentar a renovação celular e promover a síntese de colágeno, desta forma contribui para a melhorada aparência de linhas finas e rugas (Prospector, 2021). O Hexilresorcinol demonstrou ter influência em uma variedade de processos envolvidos no envelhecimento e danos da pele, incluindo oxidação, inflamação e glicação (Chaudhuri, 2015). Portanto, no presente trabalho avaliou-se os efeitos do creme multifuncional na: (1) produção do radical superóxido mitocondrial; (2) produção de colágeno tipo I, fator de crescimento epidérmico (EGF), elastina e ácido hialurônico.

2 MÉTODOS

2.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA O RADICAL SUPERÓXIDO MITOCONDRIAL EM QUERATINÓCITOS HUMANOS IMORTALIZADOS (HACAT)

Os queratinócitos humanos expandidos, HaCaT (Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ) foram cultivados em atmosfera úmida, a 37 °C, CO₂ 5%.

A viabilidade celular foi determinada por método colorimétrico com o corante XTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) após tratamento com o creme multifuncional (Concentração: 33,3 a 0,00025% p/v) por um período de 48 horas;

A formação do radical Superóxido Mitocondrial foi avaliada por imunofluorescência através de cultura de queratinócitos utilizando o kit MitoSOX™ RED *mitochondrial superoxide indicator*, Molecular Probes. As células foram incubadas com 3 concentrações não-citotóxicas do produto: 0,0325; 0,0163 e 0,0081% (p/v).

O radical foi marcado com corante fluorogênico MitoSOX™ RED exibindo fluorescência vermelha. Foi utilizado microscópio de fluorescência (DM6000 B, Leica) e Software LAS (Leica Application Suite) para que, através das imagens, fosse avaliada a intensidade da fluorescência emitida.

2.2 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO I, EGF, ELASTINA E ÁCIDO HIALURÔNICO EM PELE *EX VIVO* POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

O Colágeno I, EGF, Elastina e Ácido Hialurônico foram avaliados por imunofluorescência utilizando fragmentos de pele de pálpebra *ex-vivo* provenientes de cirurgia plástica oftalmológica. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Oftalmológico de Sorocaba do Banco de Olhos de Sorocaba (HOS-BOS) através do parecer de número 3.065.484.

As amostras de tecido foram armazenadas em solução salina e foram descontaminadas antes de seu uso. Foi aplicado 12 mg/cm² do produto sobre o tecido. Um corte de tecido foi mantido como controle, sem aplicação de produto.

O produto ficou em contato com o tecido por 72 horas, em seguida o tecido foi fixado e cortado em lâminas de 10 µm. As lâminas foram tratadas com anticorpos e foram analisadas em Microscópio de Fluorescência Óptica (Leica – DM 6000 B) com auxílio do Software LAS (Leica Application Suite v.4.12). Através das imagens foram avaliados a fluorescência emitida pela marcação com o anticorpo específico.

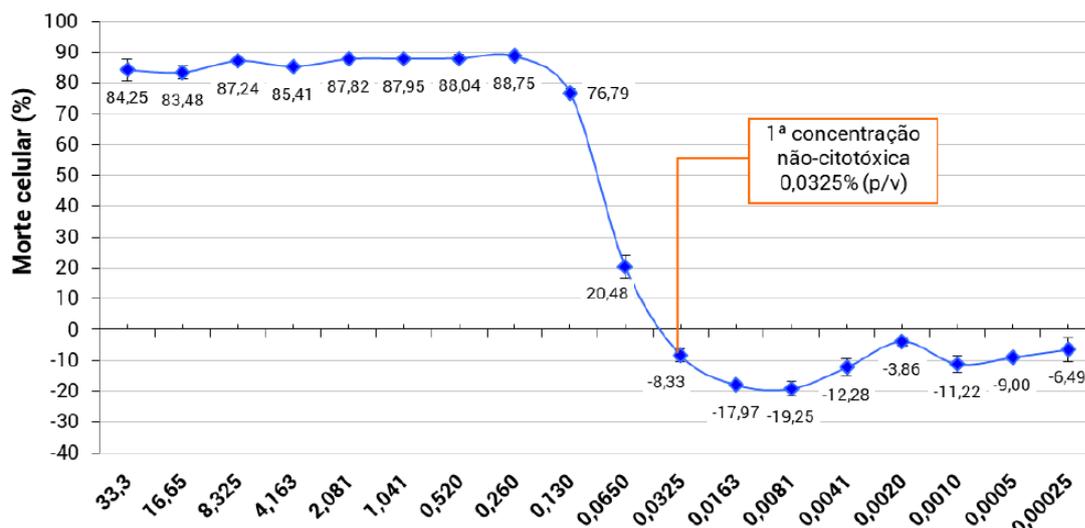
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado ANOVA para a análise de Variância. Quando a variância demonstrava diferenças significativas entre os grupos utilizou-se o teste de Dunnet para o marcador MitoSOX e o teste-T para os demais marcadores. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados das análises que indicavam valores de p inferiores a 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

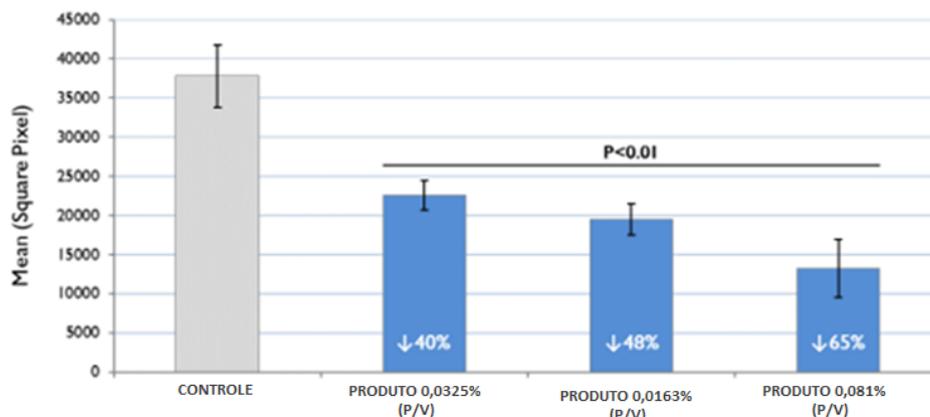
Os resultados da citotoxicidade HaCaT são apresentados na Figura 1. Na faixa de concentração de 0,0325% (p/v) até 0,00025% (p/v) o produto demonstrou não ser citotóxico, uma vez que a viabilidade celular foi similar ao do controle não tratado (100%). Desta forma, para realizar o ensaio de avaliação de potencial ação sobre a formação do radical superóxido mitocondrial via Mitosox™ Red Assay foram utilizadas concentrações menores que 0,0325% (p/v).

Figura 1. Viabilidade celular de HaCaT após tratamento por 48hrs com creme multifuncional na de concentração de 33,3 a 0,00025% (p/v).



O MitoSox é uma sonda carregada positivamente e se acumula rapidamente nas mitocôndrias, então pode ser usada para detectar a produção de EROs, especialmente o radical superóxido, dentro das mitocôndrias (Kauffman *et al.*, 2016). Portanto, foi realizada a avaliação da ação antioxidante do creme multifuncional na formação do radical superóxido mitocondrial pelo método de MitoSOX™ Red. A Figura 2 demonstra que o produto reduziu a formação de radical superóxido mitocondrial em 40%, 48% e 65%, nas concentrações de 0,0325, 0,0163 e 0,0081% (p/v), respectivamente. Desta forma, o creme multifuncional demonstrou ter ação antioxidante e reguladora do equilíbrio redox mitocondrial ($p < 0,01$), o que nos leva a concluir também que o produto preveniu os danos causados por EROs.

Figura 2. Efeitos do creme multifuncional sobre a atividade do radical superóxido mitocondrial em cultura de HaCaT. $P < 0,01$ estatisticamente diferente do controle não tratado (100%). A quantificação foi mensurada em square pixels.



Nas figuras 3 e 4 são apresentados os resultados da quantificação de colágeno tipo I e EGF. O produto aumentou significativamente a síntese de colágeno tipo I em até 116% ($p < 0,001$) e a síntese de EGF em até 53% ($p < 0,01$), em comparação com o controle não tratado. Na Figura 5 são apresentados os resultados da quantificação de elastina, na qual pode-se perceber que o produto gerou um aumento estatisticamente significativo na síntese de elastina em 93% ($p < 0,0001$), em comparação com o controle não tratado.

Figura 3. Quantificação das imagens representativas da síntese de Colágeno I em fragmentos de pele humana *ex vivo* após tratamento com o creme multifuncional por 72 horas, em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). A quantificação foi mensurada em square pixels.

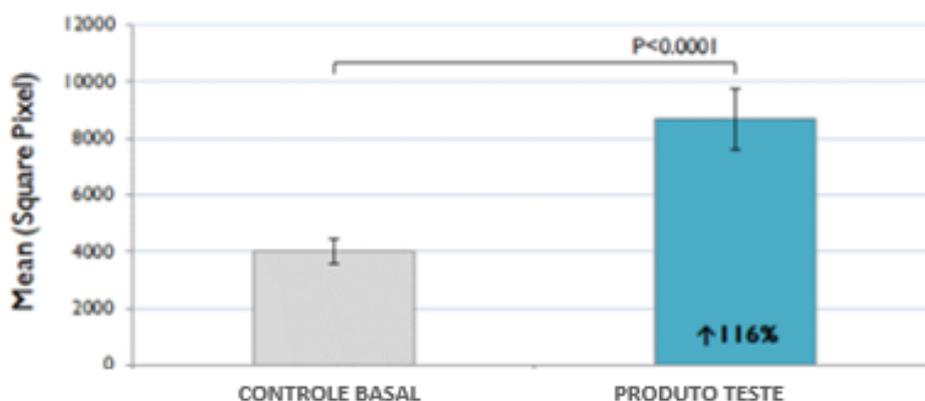


Figura 4. Quantificação das imagens representativas da síntese de EGF em fragmentos de pele humana *ex vivo* após tratamento com o creme multifuncional por 72 horas, em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). A quantificação foi mensurada em square pixels.

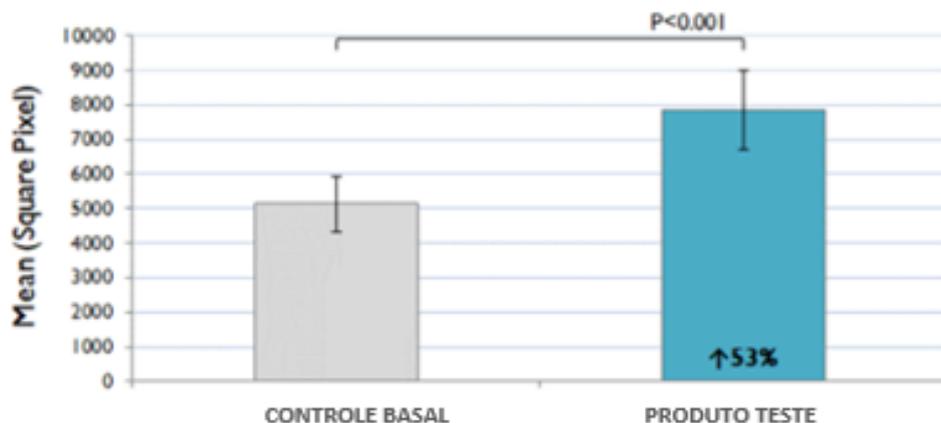
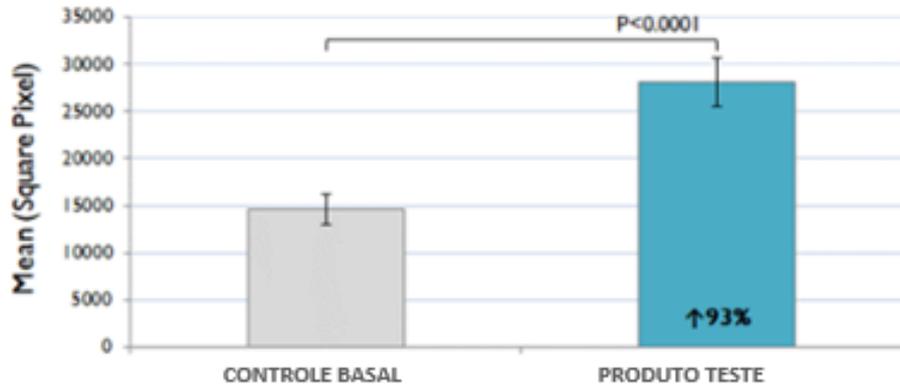
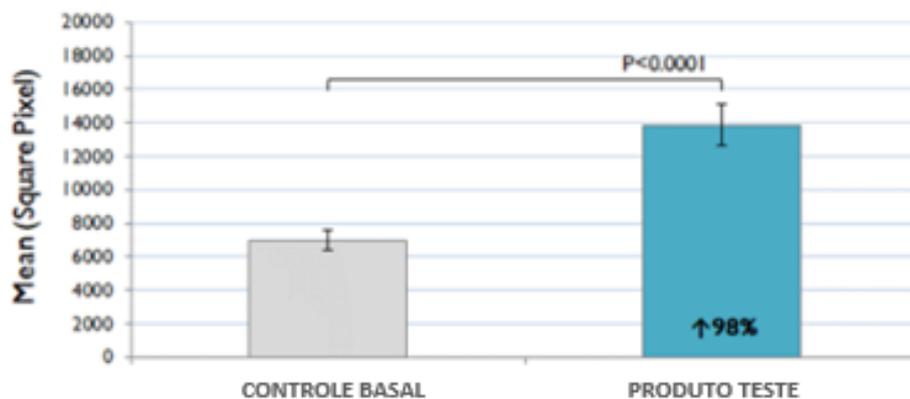


Figura 5. Quantificação das imagens representativas da síntese de elastina em fragmentos de pele humana *ex vivo* após tratamento com o creme multifuncional por 72 horas, em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). A quantificação foi mensurada em square pixels.



A Figura 6 demonstra que o produto aumentou a síntese de ácido hialurônico em até 98%, tanto na derme quanto na epiderme.

Figura 6. Quantificação das imagens representativas da síntese de ácido hialurônico em fragmentos de pele humana *ex vivo* após tratamento com o creme multifuncional por 72 horas, em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). A quantificação foi mensurada em square pixels.



As fibras de colágeno e as fibras elásticas conferem resistência à tração e elasticidade a pele, respectivamente, mas durante o processo de envelhecimento ocorre a redução da quantidade de colágeno e elastina, bem como alterações estruturais (Shin *et al.*, 2017). O EGF, juntamente com muitos outros fatores de crescimento e citocinas, afeta diretamente a biossíntese de colágeno, elastina e matriz extracelular (ECM), mas sua ligação e sinalização são reduzidas com o envelhecimento (Eskens e Amin, 2020). O ácido hialurônico tem capacidade de reter moléculas de água, então está envolvido na manutenção da hidratação da pele. Durante o processo de envelhecimento está envolvido com a perda de umidade da pele (Papakonstantinou *et al.*, 2012).

O produto multifuncional aumentou a síntese de colágeno tipo 1, elastina, EGF, ácido hialurônico, fato que demonstra sua capacidade de melhorar a elasticidade e firmeza da pele, aumentar a taxa de renovação do estrato córneo, e atuar na hidratação profunda da pele. Portanto, uma vez que o produto multifuncional atua em marcadores moleculares e mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento, conclui-se que ele possui o potencial de atuação na prevenção e tratamento do envelhecimento.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores avaliados através dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* para o produto multifuncional estão relacionados à melhora da qualidade geral da pele, ao processo de regeneração celular e à redução dos danos oxidativos que contribuem para o envelhecimento. Dessa forma, o uso do produto tem potencial de melhorar aspectos cosméticos como maciez, elasticidade e hidratação do órgão, além de agir em diversos pilares do envelhecimento.

REFERÊNCIAS

Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211(2), 241-251.

Chaudhuri, R. K. (2015). Hexylresorcinol: Providing skin benefits by modulating multiple molecular targets. *Cosmeceuticals and Active Cosmetics; Sivamani, RK, Jagdeo, JR, Elsner, P., Maibach, HI, Eds*, 71-81.

Enescu, C. D., Bedford, L. M., Potts, G., & Fahs, F. (2021). A review of topical vitamin C derivatives and their efficacy. *Journal of Cosmetic Dermatology*.

Eskens, O., & Amin, S. (2021). Challenges and effective routes for formulating and delivery of epidermal growth factors in skin care. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(2), 123-130.

Haydont, V., Bernard, B. A., & Fortunel, N. O. (2019). Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 177, 150-156.

Honari, G. (2017). Skin structure and function. In *Sensitive Skin Syndrome* (pp. 16-22). CRC Press.

Hussain, F., & Kayani, H. U. R. (2020). Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6(5), e04107.

Induchem. BRIGHTENYL®. Disponível em: <http://www.nardev.com/UploadSection/ProdCat-272-1446453382.pdf> (Acessado: 13/12/2021)

Kauffman, M. E., Kauffman, M. K., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). MitoSOX-based flow cytometry for detecting mitochondrial ROS. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 2(5), 361.

Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.

Matsui, M. S. (2016). The role of topical antioxidants in photoprotection. In *Principles and Practice of Photoprotection* (pp. 361-375). Adis, Cham.

Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 253-258.

Prospector. RetinoPeptide 189 (Symrise). Disponível em: <https://www.ulprospector.com/pt/eu/PersonalCare/Detail/3029/1474901/RetinoPeptide-189> (Acessado: 13/12/2021)

Ramos-e-Silva, M., Celem, L. R., Ramos-e-Silva, S., & Fucci-da-Costa, A. P. (2013). Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 31(6), 750-758.

Shin, J. W., Kwon, S. H., Choi, J. Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., & Park, K. C. (2019). Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2126.

Solabia Group. O Fucogel® 1.5 P. Disponível em: https://www.solabia.com/br/Produto_1,1/Cosmetica/Fucogel-15P.html (Acessado: 13/12/2021)

Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2017). Anatomy, skin (integument), epidermis.