

## **AValiação de Eficácia do Extrato Bruto de Uma Planta do Cerrado (EDP1) para uso Dermocosmético**

Larissa Cleres MOREIRA\*; Marize C. Valadares BOZINIS\*; Tatiana do N. PEDROSA\*\*; Émerson Silva LIMA\*\*

\*Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

\*\*Laboratório de Atividade Biológica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

*e-mail:* larissacleres@yahoo.com.br

Órgão Financiador: Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Palavras-chave: pele, colágeno, tirosina, elastina

### **INTRODUÇÃO**

A pele é composta pela epiderme, que é a camada epitelial mais externa da pele, composta por placas de proteína (queratina), sobrepostas e justapostas de modo a impedir a penetração de água e outras substâncias. A queratina é produzida pelos queratinócitos, que são o principal tipo celular da epiderme. A derme localiza-se abaixo da epiderme e é composta por tecido conjuntivo, contendo fibras de colágeno e elastina, além da presença de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos da pele, responsáveis pela defesa imunológica. A hipoderme localiza-se abaixo da derme, sendo composta em sua maior parte por tecido adiposo e está diretamente envolvida no isolamento térmico, no armazenamento de nutrientes e na absorção de choques (TORTORA, 2006; STEVENS e LOWE, 2001).

O envelhecimento da pele pode ocorrer devido a fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos são aqueles decorrentes do processo natural de envelhecimento do organismo, no qual ele perde gradualmente as suas funções vitais. No processo extrínseco observa-se a atuação de agentes exógenos na desorganização do funcionamento pleno desta estrutura. São exemplos: o sol, tabaco, álcool e poluição. Nestes processos verificam-se a diminuição da síntese de colágeno, elastina, menor regeneração celular, diminuição das defesas antioxidantes e outras alterações (GIANNOCARO, 2007; MAGALHÃES, 2000; ROBERT, 1994).

O fotoenvelhecimento é provocado pela exposição à radiação solar (raios UVA e UVB), que pode provocar queimaduras e favorecer, inclusive, o aparecimento de

tumores devido à exposição moderada por longos períodos. Intrinsecamente, também pode ocorrer o aumento de espécies reativas de oxigênio devido à perda da capacidade antioxidante natural do organismo, onde estruturas reativas podem atuar sobre lipídios das membranas celulares e proteínas. Este processo provoca danos às fibras de colágeno e elastina na epiderme, conduzindo a uma perda natural de sustentação da derme, de flexibilidade, elasticidade e firmeza naturais, originando rugas, manchas, pele seca, flacidez, etc. (BUCHLI, 2002; RIBEIRO, 2006).

Atualmente, a utilização de produtos de origem vegetal tem-se apresentado promissora devido à sua composição fitoquímica, que atua sobre compostos livres e reativos e previne sinais da pele. Diante da biodiversidade do cerrado e atendendo ao apelo de sustentabilidade ambiental, o trabalho teve como foco central a avaliação da eficácia, através de métodos *in vitro*, de extrato de uma planta do cerrado (EDP1) e apontar a sua viabilidade quanto ao uso em produtos cosméticos antienvhecimento.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O espécime foi coletado e processado sob a orientação do Professor José Realino no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da UFG. O extrato obtido foi concentrado numa solução-estoque de 250 mg/mL e armazenado a -20°C.

Preliminarmente, foram realizados três ensaios enzimáticos cujos procedimentos são similares, além da atividade antioxidante celular:

### **a) Atividade da Colagenase**

Em uma placa de 96 poços foram colocados 10 µL do solvente da amostra, da amostra diluída na concentração desejada e do padrão quercetina. Em seguida, foram adicionados 10 µL da enzima colagenase 10 mg/mL e 80 µL de tampão tricina 50 mM pH 7,5. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 min. e, 100 µL do substrato FALGPA 1,6 mM foram adicionados a ela. A leitura foi realizada de 10 em 10 minutos em 340 nm até o tempo de 60 minutos, à temperatura ambiente (WART, 1981).

### **b) Atividade da Elastase**

Em uma placa de 96 poços foram colocados 10 µL do solvente da amostra, da amostra diluída na concentração desejada, do padrão quercetina e do tampão tris-HCl 60 mM pH 7,5. Em seguida, foram adicionados 90 µL da enzima elastase pancreática

0,4 mg/mL e a placa foi incubada a 37°C, 15 min. Após esse período, 100 µL do substrato AAAPVN 1,6 mM foram adicionados à placa e a primeira leitura, a 405 nm foi realizada. As demais leituras ocorreram no intervalo de 5 min. até o tempo máximo de 50 min (KIM, 2004).

#### c) Atividade da Tirosinase

Em uma placa de 96 poços, foram colocados 20 µL do solvente da amostra, da amostra diluída na concentração desejada e do tampão fosfato 10 mM pH 6,5. Em seguida foram adicionados 80 µL da enzima tirosinase, a placa foi incubada a 37°C, 5 min., e a primeira leitura foi realizada em 492 nm. Foram adicionados 100 µL do reagente de cor L-DOPA 1 mM e as demais leituras foram realizadas a cada 5 min. até o tempo máximo de 15 min., a 37°C (HEARING, 1987).

Os cálculos da atividade inibitória da substância-teste foram feitos segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{\text{Abs. final}_{\text{Am}} - \text{Abs. inicial}_{\text{Am}}}{\text{Abs. final}_{\text{cont}} - \text{Abs. inicial}_{\text{cont}}} \right) \times 100$$

#### d) Atividade Antioxidante celular

As células NIH3T3 foram plaqueadas em uma concentração de 10<sup>4</sup> cel/100 µL em placa de 96 poços e incubadas por 24h. Após esse período, as células foram expostas à 100 µL da substância teste [2x] e 100 µL de diclorofluoresceína 97% a 25 µM foram adicionados a todos os poços. A placa foi incubada por 1h a 37°C e atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, a placa foi lavada com PBSA. Nos poços “branco” foram deixados 200 µL de PBSA e, nos demais foram colocados 200 µL de Azobis 97% 600 µM para a realização da primeira leitura a 570 nm. As leituras seguintes foram feitas a cada 5 min. até o tempo máximo de 60 min. (WOLFE, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes enzimáticos, pôde-se verificar que o extrato EPD1 foi capaz de inibir em 50% a ação da colagenase na concentração de ±70 µg/mL, chegando à inibição de quase 96% desta enzima na concentração de 500 µg/mL (Figura 1a). O colágeno tem meia-vida de 15 a 18 anos e sofre pouquíssima degradação até 30 anos, no caso da pele humana. A partir desta etapa ou quando a pele torna-se doente, é possível observar uma maior expressão de uma metaloproteinase, especificamente a colagenase que degrada o colágeno e é praticamente inexistente na pele jovem e

saudável. Os fragmentos originados formam uma gelatina que continuam a ser clivados pela gelatinase, provocando a desestruturação da rede de fibras de colágeno e o aparecimento de marcas (BHATTACHARYYA, 2009).

Em relação à ação da elastase, o extrato apresentou uma  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50%) a uma concentração menor que a menor concentração testada (31,25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 1a). Nesta concentração, o extrato foi capaz de inibir 66 % da ação desta enzima, sendo que se observou um platô de inibição a partir 250  $\mu\text{g/mL}$ , onde foi possível verificar que a atividade inibitória fica em torno de 87%. Como o colágeno, com o envelhecimento a síntese de elastina pelos fibroblastos também é diminuída. As proteinases clivam a elastina, cujos fragmentos são solúveis e desaparecem. Como resultado tem-se uma pele mais enrijecida.

No teste de atividade de tirosinase foi observado que o extrato EPD1 apresentou  $CI_{50}$  em torno de 600  $\mu\text{g/mL}$  e a máxima concentração testada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) conseguiu inibir 57,6 % (Figura 1a). A tirosinase é uma enzima diretamente envolvida na produção de melanina, através da conversão de tirosina em L-DOPA. Existem dois tipos de melanina: a eumelanina (tons entre marrom e preto) e feomelanina (tons entre amarelo e vermelho). Enquanto a eumelanina protege as células da radiação UV nociva, as feomelaninas são fotolábeis e seus produtos de fotólise geram espécies reativas de oxigênio (HARRIS, 2005).

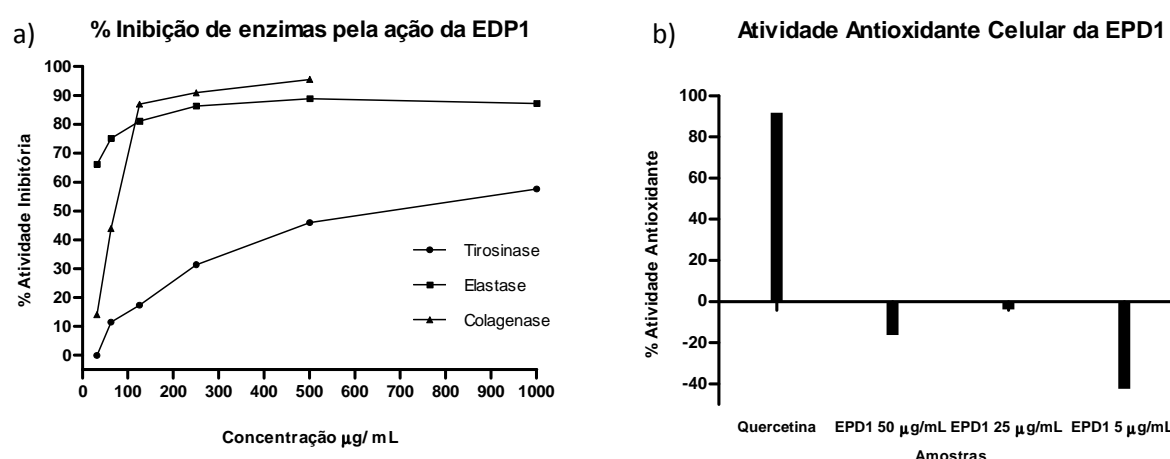


Figura 1. a) Inibição das enzimas tirosina, elastase e colagenase em células 3T3 tratadas com diferentes concentrações do extrato em estudo. b) Atividade antioxidante *in vitro* do extrato. A quercetina foi usada como controle positivo de atividade antioxidante.

Quanto à atividade antioxidante celular, verificou-se que o extrato não apresenta atividade nas concentrações testadas (5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 1b).

Segundo Harris (2005), as substâncias antioxidantes atuam doando elétrons para radicais livres, impedindo sua reação com metabólitos celulares. Deste modo, inativa as espécies reativas. Atualmente, não há pesquisas que comprovem que a diminuição do estresse oxidativo provocado pelo aumento de espécies reativas promova juventude. No entanto, os estudos têm conseguido correlacionar o consumo de antioxidantes naturais com a prevenção de doenças crônicas e degenerativas da idade.

## **CONCLUSÃO**

A partir da análise dos dados, é possível sugerir que o extrato tem ótima ação inibitória para colagenase e elastase e significativa atividade contra tirosinase. O resultado obtido para ação antioxidante requer novos ensaios em concentrações variadas e amplas, visto que os valores obtidos são apenas preliminares. De um modo geral, estes resultados corroboram os objetivos do projeto em tornar este extrato um candidato a produto dermocosmético antienvhecimento.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BHATTACHARYYA, T. K. et al. Profilometric and morphometric response of murine skin to cosmeceutical agents. *Arch Facial Plast Surg*, 2009, 11(5): 332-337
- BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics & Toiletries*. Ed. Port 14(2):54-57, 2002.
- GIANNOCARO, F. B.; FILHO, A. G.; FERREIRA, L. M. Cultivo de fibroblastos humanos com DMAE. *Cosmetics & Toiletries*. V. 19, jan.-fev. 2007.
- HARRIS, Maria Inês N. de Camargo. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. Ed. Baueri, SP, SENAC, 2005.
- HEARING, V. J. Jr. Mammalian monophenol monooxygenase (tirosinase) purification, properties and reactions catalyzed. *Methods enzymol*, 1987, 142: 154-65.
- KIM Y.; UYAMA H.; KOBAYASHI S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320:256-261
- MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: *Cosmetologia, com questões de avaliação*. Rio de Janeiro, Rubio, p.33-42, 61-145, 2000.
- RIBEIRO, Cláudio. *Cosmetologia aplicada à dermocosmética*. Pharmabooks, São Paulo, 2006.
- ROBERT, L. O envelhecimento. Lisboa, Instituto Piaget, p.21-330, 1994.
- STEVENS, Alan. LOWE, James S., *Histologia Humana*, 2ª edição, Ed. Manole. São Paulo, 2001.
- TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. *Corpo humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia*, 6ª edição, Artmed, Porto Alegre:, 2006.
- WART, H. E. Van; STEINBRINK, R. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal Biochem*, 1981, 113:356-365
- WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of agriculture and food chemistry*, vol. 56, nº 22, 2007.