UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CARDOSO TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DA AMORA PRETA XAVANTE E DE SUAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SÍNTESE DE MELANINA POR CULTIVO CELULAR

CURITIBA

2023

LUANA CARDOSO TEIXEIRA

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DA AMORA PRETA XAVANTE E DE SUAS NANOCÁPSULAS SOBRE A SÍNTESE DE MELANINA POR CULTIVO CELULAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof.(a). Dra. Daniela Florêncio Maluf

CURITIBA
2023

Dedico este trabalho aos meus pais, amigos e professores, que me deram todo o suporte necessário para que fosse possível realizá-lo com sucesso.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por ter me criado, me amado, me incentivado e me dado todo o suporte físico e emocional que eu precisasse ao longo do meu trajeto.

Ao meu pai, por acreditar em mim e me apoiar nos meus sonhos.

Aos meus tios e avós, por seu amor incondicional, apoio emocional e os conselhos sobre a vida, para que eu pudesse seguir em frente.

Aos meus amigos, que estiveram ali para me ouvir e me fazer sorrir.

Aos meus colegas, por sempre ajudarem nos estudos e por deixarem a rotina mais leve com sua companhia.

Às minhas colegas de pesquisa, que contribuíram imensamente para que tivéssemos sucesso.

À professora Dra. Daniela Florêncio Maluf, que me deu a oportunidade de participar do seu projeto de pesquisa, me transmitiu seu conhecimento e garantiu que eu tivesse sucesso neste trabalho.

Aos demais professores, que me ensinaram tanto e me fizeram desenvolver pessoalmente e profissionalmente.

E agradeço às demais pessoas que participaram desta jornada e que de alguma forma contribuíram para chegar até aqui.

RESUMO

A amora preta xavante (*Rubus* spp.) é uma fonte rica de bioativos como vitamina A e C e polifenóis, possuindo capacidade antioxidante e fator de proteção solar relevantes. A capacidade de reduzir ou aumentar a melanogênese é interessante em determinados cosméticos, e atualmente se tem uma tendência mundial na indústria cosmética e farmacêutica pela substituição de testes *in vivo* pelos *in vitro*, em virtude da demanda por produtos *cruelty-free*. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a segurança e eficácia do óleo de semente da amora preta xavante, utilizando metodologias *in vitro*. O teste escolhido para estudo foi a avaliação da síntese de melanina, onde testamos duas metodologias, sendo a segunda uma complementação da primeira. A primeira metodologia aplicada seguiu um método mais simples, baseado na quantificação pela leitura em espectrofotômetro do pellet resultante da centrifugação das células tratadas com o óleo de semente da amora preta xavante e suas nanocápsulas. Na segunda metodologia tratamos adicionalmente com tirosina estéril e utilizamos reveladores Bradford e Biureto para a leitura, além de ler tanto o conteúdo dos pellets, como dos sobrenadantes. A segunda metodologia não apresentou resultados coerentes e, portanto, foram considerados os resultados do primeiro método, onde o óleo de semente da amora preta xavante demonstrou um efeito significativo de aumento na síntese de melanina, de 44,9%. O resultado representa o potencial da semente de amora preta xavante como possível ingrediente cosméticos, que possuam o objetivo de amenizar ou tratar condições de hipopigmentação. É interessante a realização de novos estudos de maior complexidade para investigar sua eficácia mais profundamente.

Palavras-chave: amora preta xavante, melanogênese, melanina, avaliação da eficácia, teste *in vitro*.

ABSTRACT

The Xavante blackberry (*Rubus* spp.) is a rich source of bioactives such as vitamins A and C and polyphenols, with significant antioxidant capacity and sun protection factor. The ability to reduce or increase melanogenesis is of interest in certain cosmetics, and there is currently a global trend in the cosmetic and pharmaceutical industry to replace *in vivo* tests with *in vitro* tests due to the demand for cruelty-free products. In this context, the present study aims to assess the safety and efficacy of Xavante blackberry seed oil using *in vitro* methods. The chosen test for the study was the evaluation of melanin synthesis, where we tested two methodologies, with the second being a complement to the first. The first applied methodology followed a simpler method, based on quantification through reading in a spectrophotometer of the pellet resulting from the centrifugation of cells treated with black Xavante blackberry seed oil and its nanocapsules. In the second methodology, we additionally treated with sterile tyrosine and used Bradford and Biuret reagents for reading, as well as reading both the pellet contents and supernatants. The second methodology did not yield consistent results, so the results of the first method were considered. In the first method, Xavante blackberry seed oil demonstrated a significant effect, increasing melanin synthesis by 44.9%. This result indicates the potential of Xavante blackberry seed as a possible cosmetic ingredient aimed at alleviating or treating hypopigmentation conditions. Further, more complex studies are warranted to investigate its efficacy more deeply.

Key words: Xavante blackberry, melanogenesis, melanin, efficacy evaluation, *in vitro* assay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 OBJETIVOS 2
1.1.1 Objetivo Geral 2
1.1.2 Objetivos Específicos 2
2 REFERENCIAL TEÓRICO 3
2.1 NANOTECNOLOGIA E NANOCÁPSULAS 3
2.2 A PELE 8
2.3 CULTIVO CELULAR 13
2.4 ENSAIOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA 16
2.4.1 Síntese de Melanina 19
2.5 AMORA PRETA XAVANTE 20
3 MATERIAIS E MÉTODOS 22
3.1 PRIMEIRO MÉTODO 22
3.2 SEGUNDO MÉTODO 23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
5 CONCLUSÕES 29
REFERÊNCIAS 30

1 INTRODUÇÃO

A melanina é uma proteína naturalmente presente no organismo, responsável pela pigmentação da pele, cabelo e olhos, e que, em condições fisiológicas normais, apresenta o benefício de fotoproteção contra raios ultravioletas (UV), além de atuação no cérebro, ação antioxidante e outras funções. Entretanto, em condições de excesso de melanina no corpo há a hiperpigmentação e doenças de pele relacionadas, como sardas, manchas da idade, melasma e melanoma (câncer), além de photoaging e outras consequências. E no caso de hipopigmentação, pode resultar de doenças como o Vitiligo, uma condição de despigmentação crônica da pele, causada pela destruição seletiva de melanócitos, ou condições agudas, por exemplo após uma lesão na pele. Neste contexto, há o interesse da indústria cosmética pela busca de potenciais produtos que interfiram na síntese de melanina (melanogênese), seja para reduzir ou aumentar a sua síntese. [12-19]

Há uma demanda contínua por produtos de origem natural, decorrente do aumento do interesse da população em produtos que não prejudiquem o meio ambiente e ao mesmo tempo proporcionem diferentes propriedades benéficas para a saúde ou estética. Neste contexto, é interessante a exploração de ingredientes naturais para se utilizar como ativos em produtos cosméticos, visando obter benefícios estéticos e para a saúde. Para este trabalho, a amora preta xavante (*Rubus spp*. L., Rosaceae) foi o objeto de estudo, que é um fruto de baixo custo de implantação, manutenção do pomar e não requer tanto uso de defensivos agrícolas como outros, e por isso é considerada bem promissora. Para a indústria cosmética, é interessante por ser rica em compostos bioativos, como vitaminas e polifenois, possuindo alta atividade antioxidante, demonstrada in vitro e in vivo. Além disso, seu extrato pode apresentar atividade fotoprotetora devido à presença de cromóforos. [1-3] Com a nanotecnologia, muitas vezes é possível obter características vantajosas como solubilidade, maior absorção pelo organismo, aderência prolongada à pele, liberação controlada, maior biodisponibilidade e biocompatibilidade, e proteção do ativo contra degradação, especialmente por oxidação, que é um obstáculo no uso de óleos como matéria-prima. Somando esses fatores é possível melhorar a eficácia do produto, o que justifica a avaliação concomitante com as nanocápsulas do ativo neste trabalho. [4-11]

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo analisar o efeito do óleo de amora preta xavante bruto e encapsulado sobre a síntese de melanina, para utilização em produtos cosméticos.

1.1.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar o efeito do óleo de amora preta xavante bruto e encapsulado sobre a síntese de melanina;
b) Comparar os efeitos produzidos pelo óleo bruto e pelo óleo encapsulado;
c) Analisar o potencial uso do óleo de amora preta xavante como ativo em produtos cosméticos, de acordo com os resultados obtidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 NANOTECNOLOGIA E NANOCÁPSULAS

A nanotecnologia é um ramo interdisciplinar que trata da obtenção, manipulação e estudo de materiais a nanoescala, entre 1 e 100 nm, escala de átomos e moléculas. Para a União Europeia, nanopartículas também podem ser consideradas como “uma partícula insolúvel ou biopersistente e fabricada de forma voluntária, com uma ou mais estruturas externas, ou com uma dimensão interna”. É uma área em constante crescimento, inclusive sendo mencionada como a “moda” tecnológica do século 21. Surgiu em 1960, sendo mais desenvolvida a partir de 1980. Sua aplicação se dá em diferentes áreas da indústria, como agricultura, diagnósticos, medicamentos, cosméticos, alimentos, tintas, fibra óptica, eletrônicos, biomarcação, entre outras [4-7,9,20-26]. No Brasil, a área é regulamentada pela ANVISA, especificamente pelo Comitê Interno de Nanotecnologia.

As vantagens da nanotecnologia envolvem as propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais desses materiais, que proporcionam diferentes possibilidades as quais não são alcançadas com materiais maiores [27]. As características desejáveis desses componentes incluem solubilidade, maior absorção pelo organismo, aderência prolongada à pele, liberação controlada, proteção do ativo contra degradação (por oxidação, por exemplo), melhor eficácia, maior biodisponibilidade, biocompatibilidade. Tais fatores permitem inclusive utilizar menores concentrações dos ativos para produzir seus efeitos. Dependendo da área de aplicação também há outras características, como a possibilidade de direcionar um fármaco ou cosmético para tecidos alvos específicos (o que reduz efeitos secundários adicionalmente), modificações estéticas mais atraentes em alimentos, modificação sensorial de cosméticos e assim por diante [4-11,26,28].

Embora sejam diversas as vantagens fornecidas pela nanotecnologia, como já mencionado, a comunidade científica mantém preocupações acerca de seu potencial tóxico a longo prazo, seja para os seres vivos ou para o meio ambiente. Tal preocupação se dá especialmente pela capacidade das nanopartículas de gerar espécies reativos de oxigênio (EROs), as quais causam diversos efeitos tóxicos, como citotoxicidade, genotoxicidade, efeitos

imunológicos, entre outros [7,20,21,29]. A exposição pode ser pelas vias inalatória, oral e dérmica, e sua fácil absorção é o principal fator para seu risco, não só no que tange a entrada da substância no organismo, mas também a sua distribuição pelos diferentes tecidos do nosso corpo após a entrada, incluindo o sistema nervoso. Além de que, há a exposição acidental por trabalhadores ou poluição do ar, não havendo muitas vezes um controle do nível de exposição [4,8,20]. Sua toxicidade foi demonstrada como dose-dependente e ainda estão sendo pesquisados os riscos e sua probabilidade de ocorrência [20,21]. DeLouise (2012) demonstra em seu trabalho que, em condições normais de uso em uma pele saudável, a penetração das nanopartículas de ZnO (óxido de zinco) e TiO_2 (dióxido de titânio), que são nanopartículas empregadas em cosméticos e protetores solares para proteção contra a radiação ultravioleta (UV) não são relevantes. Já em uma revisão recente realizada por Balkrischna et al. (2021), os autores reúnem evidências desses danos ao organismo pelas nanopartículas, incluindo ZnO, TiO_2 e Ag. Porém, conforme surgem novos estudos essas visões podem mudar, como no caso do TiO_2, onde foi constatado pelo Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) da Comissão Europeia que é improvável que esta nanopartícula realmente cause os efeitos relatados [30]. E vale destacar, que a toxicidade irá depender do tipo de material que está trabalhando e o tipo de nanopartícula.

Da união entre nanotecnologia e cosmetologia, nasceram os nanocosméticos, que podem ser definidos como “formulações cosméticas que envolvam tecnologias que veiculem ativos ou outros ingredientes nanoestruturados e que apresentem propriedades superiores quanto ao seu desempenho em comparação com produtos convencionais” [27,31]. Essa área dentro da indústria de cosméticos surge após o lançamento de um creme para o rosto da L’Oréal em 1993, o qual continha nanocápsulas que transportavam a vitamina E, com finalidade anti-aging. No Brasil, o primeiro nanocosmético foi desenvolvido em 2005 pela O Boticário, chamado Nanoserum, um creme anti-sinais [10,27]. Os nanocosméticos já são empregados em diferentes setores, como perfumes, shampoos, protetores solares, formulações anti-aging, cuidados capilares e hidratantes [4,8,32,33]. Um dos maiores interesses é nos produtos para pele facial e corporal, especialmente para as finalidades anti-aging e fotoproteção [10,31]. Devido às características das nanopartículas, como tamanho, formato, características de superfície, propriedades físico-químicas e

composição, elas possuem uma maior capacidade de penetração no estrato córneo da pele, o qual funciona como uma barreira cutânea altamente lipofílica, como é detalhado no próximo tópico. A nanoestruturação também permite o controle da liberação do ativo, a proteção contra degradação (especialmente a oxidação de compostos lipofílicos), estabilidade, distribuição otimizada, exige menores concentrações de ativo pela sua ampla absorção, redução da toxicidade (pela distribuição localizada e concentrações menores) entre outros fatores já mencionados anteriormente [4,5,8,10,27,31,32,34,33].

Há vários modelos de veículos nanoestruturados que podem ser utilizados, nanoemulsões, lipossomas, niossomas, nanoesferas, nanocápsulas, solid-lipid nanopartículas (SLNs), fulereno, cubosomos, entre outros, como ilustra a Figura 1 [4,5,6,8,9,11,30,32,34,35].

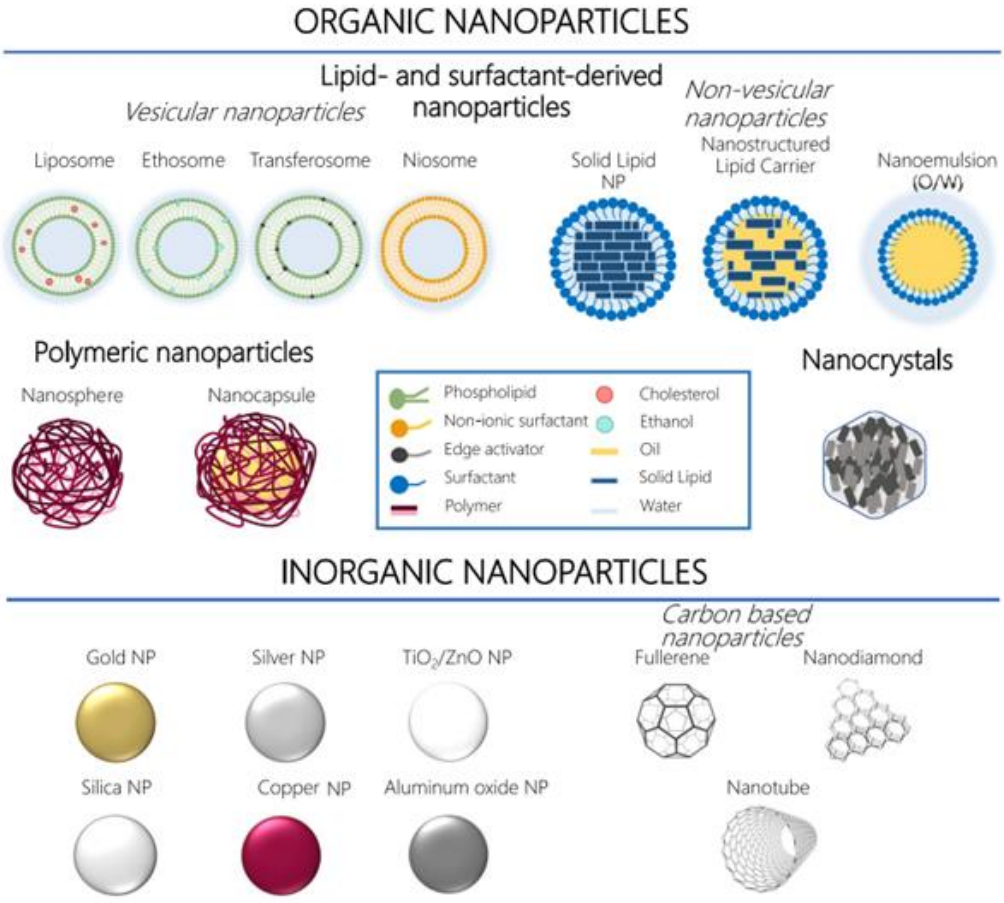


Figura 1: Representação gráfica dos tipos de nanopartículas e suas classificações. (Fonte: SALVIONI et al. 2021)

As nanocápsulas são nanopartículas poliméricas, assim como as nanoesferas. Segundo Vieira (2017), as nanocápsulas são “sistemas vesiculares em que a substância ativa é confinada em uma cavidade preenchida por um

núcleo geralmente oleoso, sendo este revestido por uma membrana polimérica". O ativo pode estar adsorvido na superfície ou dissolvido no núcleo e os polímeros podem ser sintéticos ou naturais. Características destacantes dessas estruturas são a biodegradabilidade e biocompatibilidade apresentada [11,26,30,35]. Polímeros biodegradáveis são preferíveis também pela capacidade de serem eliminados pelo organismo naturalmente, evitando acúmulo nos tecidos e citotoxicidade [30]. Diferentes polímeros podem ser empregados, sejam sintéticos ou naturais, sendo comumente empregado a família de poliésteres, que inclui o poli-ácido lático (PLA), a poli ε-caprolactona (PCL) e o poli-ácido lático-co-glicólico (PLGA), e alguns polímeros naturais estudados são a quitosana, o alginato e a gelatina [5,11,30]. Os sintéticos podem apresentar certas vantagens como alta pureza e reprodutibilidade [11], ao passo que os naturais são interessantes devido à segurança e eco-friendly [5]. Santos (2012) aponta como características e propriedades especiais a serem consideradas para escolha do polímero:

> "(i) capacidade de formar estruturas (matrizes ou membranas) microporosas semipermeáveis; (ii) intumescência (expansão) quando em contacto com a água; (iii) capacidade de complexação com os activos; (iv) bioadesão."

Para o preparo das nanocápsulas, o método escolhido irá depender do ativo utilizado, do polímero empregado, da finalidade e da duração terapêutica desejada, mas pode-se dividir simplificadamente os métodos em polimerização de monômeros ou no uso de polímeros pré-formados, também chamada de nanoprecipitação. A polimerização é menos utilizada devido aos seus riscos tóxicos por produção de resíduos e por poder gerar polímeros não biodegradáveis [11,23,32,35,36,37]. Entre os métodos utilizados estão: deposição interfacial do polímero pré-formado, emulsificação-difusão, dupla emulsificação, emulsificação-coacervação, revestimento de polímero e automontagem [11]. A deposição interfacial foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas, descrita por Fessi e colaboradores (1989), como cita a autora Vieira (2017), e é ainda uma das técnicas mais utilizadas para a nanoencapsulação. O método se baseia numa "emulsificação espontânea da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido na fase externa aquosa" [35]. A técnica consiste em misturar uma fase orgânica (oleosa) com uma fase aquosa, ocorrendo a precipitação do polímero na interface pela diminuição da solubilidade, ao passo que a energia no meio

favorece a formação de nanogotas de óleo, servindo de núcleo para a precipitação do polímero. O solvente é depois removido sobre pressão reduzida e a água evaporada. A fase orgânica contém um solvente orgânico, óleo, tensoativo hidrofóbico e polímeros insolúveis no óleo e na água. Já a fase aquosa contém tensoativos hidrofílicos [36]. Para a fase aquosa, são mencionados os tensoativos poloxamer 188 e o polissorbato 80 (Tween 80), já para a fase orgânica mencionam fosfolipídios, como as lecitinas, e os ésteres de sorbitano [11]. A nanoprecipitação gera nanocápsulas de tamanho em torno de 200 a 500 nm [23,37].

A caracterização das nanocápsulas é feita normalmente pela análise morfológica, distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta, pH, pela concentração de ativo associado e pela cinética de liberação do ativo [6,23,36]. Essas informações também podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade dos sistemas [6,37]. A análise morfológica é realizada por microscopia, mas devido ao seu tamanho e complexidade há certa dificuldade em avaliar detalhadamente [6]. A microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de força atômica (MFA) são técnicas amplamente empregadas para a análise morfológica [6,11,36]. A análise pode oferecer dados sobre a estrutura, espessura da parede e porosidade do polímero [6]. A distribuição do tamanho das partículas ou índice de polidispersão (IPD) demonstra a uniformidade das partículas em suspensão e é um parâmetro importante para analisar posteriormente a sedimentação (a fim de avaliar a estabilidade da composição) e pela sua relação com a biodistribuição e absorção pelo organismo [6,11,23,36]. Este parâmetro pode ser avaliado por diferentes métodos, sendo o mais comum a espectroscopia de correlação fotônica, também chamada de espalhamento de luz dinâmico [6,11,36]. Um IPD maior que 0.5 indica uma distribuição ampla de tamanho, enquanto que IPD entre 0.1 e 0.25 indica uma estreita distribuição, o que seria o desejável por garantir a homogeneidade do sistema [6,37]. O potencial zeta representa o potencial (carga) de superfície das nanocápsulas, o que é útil para avaliar a estabilidade da partícula e outros fatores dependendo da finalidade do composto. É influenciado pela composição da nanocápsulas e do meio de dispersão e pode ser mensurado por eletroforese, sendo que valores maiores que 30 mV e menores que -30 mV promovem maior estabilidade por apresentarem grandes forças repulsivas, evitando a agregação das partículas

[6,11,23,36]. O pH é relevante especialmente para estudar a estabilidade do sistema, considerando que alterações de pH podem indicar degradação do polímero [23]. A concentração do ativo encapsulado é demonstrada como porcentagem de eficiência de encapsulamento, calculada pela diferença entre o total de substância ativa utilizado e a quantidade livre na suspensão, determinada após separação de fases por ultrafiltração-centrifugação. Pode ainda ser determinada por cromatografia de exclusão por tamanho, filtração tangencial ou diálise [6,23,25].

2.2 A PELE

A pele, parte do sistema tegumentar, é reconhecida como o maior órgão do organismo humano, sendo uma estrutura complexa composta pelas camadas da epiderme (porção epitelial de origem ectodérmica), a derme (uma porção conjuntiva de origem mesodérmica) e a hipoderme, que não é exatamente parte da pele, mas na verdade um tecido conjuntivo frouxo que serve para unir a pele com os órgãos adjacentes. A pele ainda pode ser diferenciada em espessa, presente nas regiões da palma da mão, planta dos pés e algumas articulações, e a fina, que protege o restante do corpo [4,5,38].

Possui múltiplas funções, que incluem a proteção contra desidratação e atrito, comunicação com o sistema nervoso central através das terminações nervosas, termorregulação do corpo pela atuação de vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo, termorregulação e excreção de substâncias pelas glândulas sudoríparas, proteção contra os raios ultravioletas pela ação da melanina, formação de vitamina D3, proteção contra a invasão de microrganismos pela ação de células do sistema imune, além de ser a primeira barreira do organismo tanto contra microrganismos como contra agressões físicas e químicas [4,38]. Justamente por sua função de barreira, há a dificuldade de penetração de substâncias desejadas, como ativos cosméticos ou de finalidade terapêutica, justificando a relevância de se estudar novos veículos que possibilitem uma maior penetração de ativos nas camadas mais internas da pele [4,5].

A epiderme é a camada de maior interesse para ativos cosméticos usualmente. Ela é formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e é composta majoritariamente por queratinócitos, mas também apresenta melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Possui espessura e

estrutura variada, a depender da região corporal, fator que deve ser considerado na escolha da formulação cosmética/medicamentosa. A epiderme pode apresentar cinco camadas diferentes: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal se conecta com a membrana basal que separa a epiderme da derme e é composta por células prismáticas ou cuboides, basófilas, além de ser rica em células tronco. Pode ser denominada também como germinativa e apresenta intensa atividade mitótica, atuando na renovação da epiderme junto da camada espinhosa. A camada espinhosa se constitui de células cuboides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central e citoplasma com curtas expansões que contém feixes de filamentos de queratina. Também possui células-tronco de queratinócitos e é onde ocorre uma parte das mitoses. A camada granulosa possui de 3 a 5 fileiras de células poligonais achatadas, núcleo central e citoplasma cheio de grânulos basófilos denominados como grânulos de querato-hialina, os quais contém uma proteína rica em histidina fosforilada e proteínas contendo cistina. Possui ainda os grânulos lamelares, que contribuem para a formação de barreira da pele e impermeabilidade à água, evitando a desidratação do organismo, por se fundirem com a membrana plasmática e expulsar o conteúdo para o espaço intercelular, que é onde o material lipídico se deposita. A camada lúcida é formada por uma fina camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, e é mais visível na pele espessa. Já a camada córnea (stratum corneum), se constitui de células achatadas, mortas e sem núcleo, com citoplasma cheio de queratina, e é a camada mais externa da epiderme, servindo como a primeira barreira contra agressões externas e penetração de substâncias por sua alta lipofilicidade, espessura e composição. Na pele fina é comum a ausência das camadas granulosa e lúcida e possuir uma camada córnea reduzida [4,5,38,39].

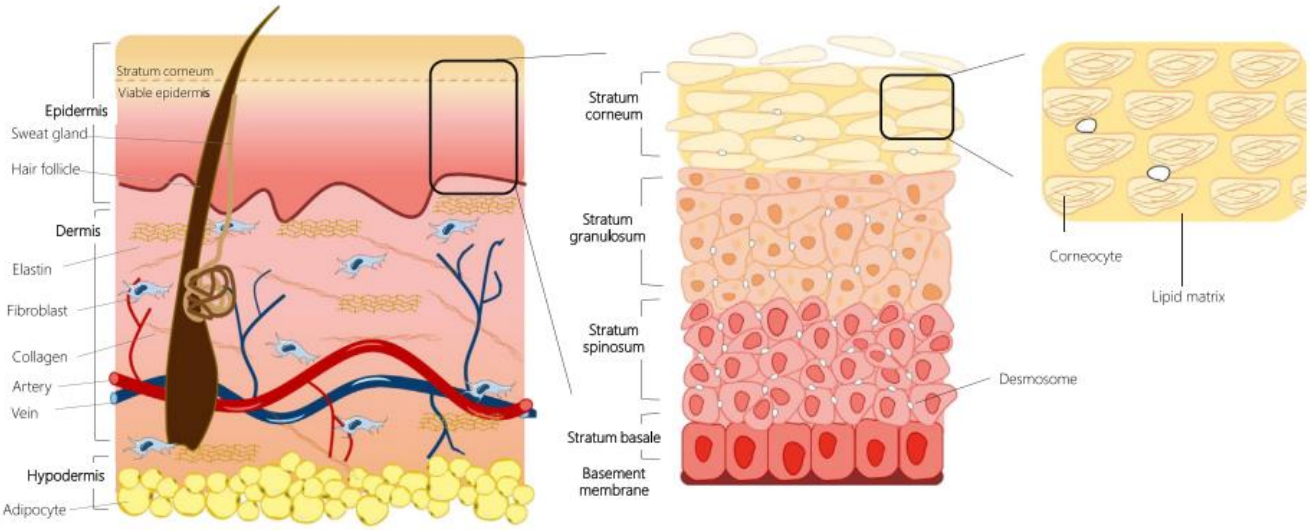


Figura 2: representação gráfica das camadas cutâneas. (Fonte: SALVIONI et al. 2021)

Já a derme, é um tecido conjuntivo que serve para conectar a epiderme com a hipoderme e sua espessura varia de acordo com a região. E a hipoderme é o tecido subcutâneo, que se constitui por tecido conjuntivo frouxo e une a derme aos órgãos subjacentes [38].

Os melanócitos são as células responsáveis pela síntese de melanina no organismo e estão localizados na junção da derme com a epiderme ou na camada basal da epiderme. São células de citoplasma globoso com prolongamentos que transferem os grânulos de melanina para as células das camadas basal e espinhosa pelas reentrâncias destas. A melanina é uma proteína naturalmente presente no organismo, sendo uma das principais responsáveis pela pigmentação da pele, cabelo e olhos, junto do caroteno, quantidade de capilares na derme e a cor do sangue nesses capilares. Seu tipo, quantidade e distribuição são regulados por fatores genéticos, ambientais e endócrinos [38]. Além da pigmentação da pele, tem como principal função atuar na proteção da pele contra luz visível e raios UV [13,14,15]. Sua síntese é chamada de melanogênese e ocorre nos melanócitos, mais especificamente nos melanossomos, que são vesículas formadas no complexo de Golgi. A síntese se inicia com a oxidação da L-tirosina em dopaquinona pela Tirosinase. A dopaquinona por sua vez serve de substrato para a síntese de eumelanina e feomelanina, conforme ilustrado na Figura 3. Devido a primeira etapa da síntese ser a etapa limitante, já que as demais reações ocorrem espontaneamente em pH fisiológico, a tirosinase é a enzima mais relevante e essencial para a

melanogênese e, portanto, é um dos principais alvos para estudo de ativos cosméticos e terapêuticos que visem interferir na melanogênese [12,13,16,38].

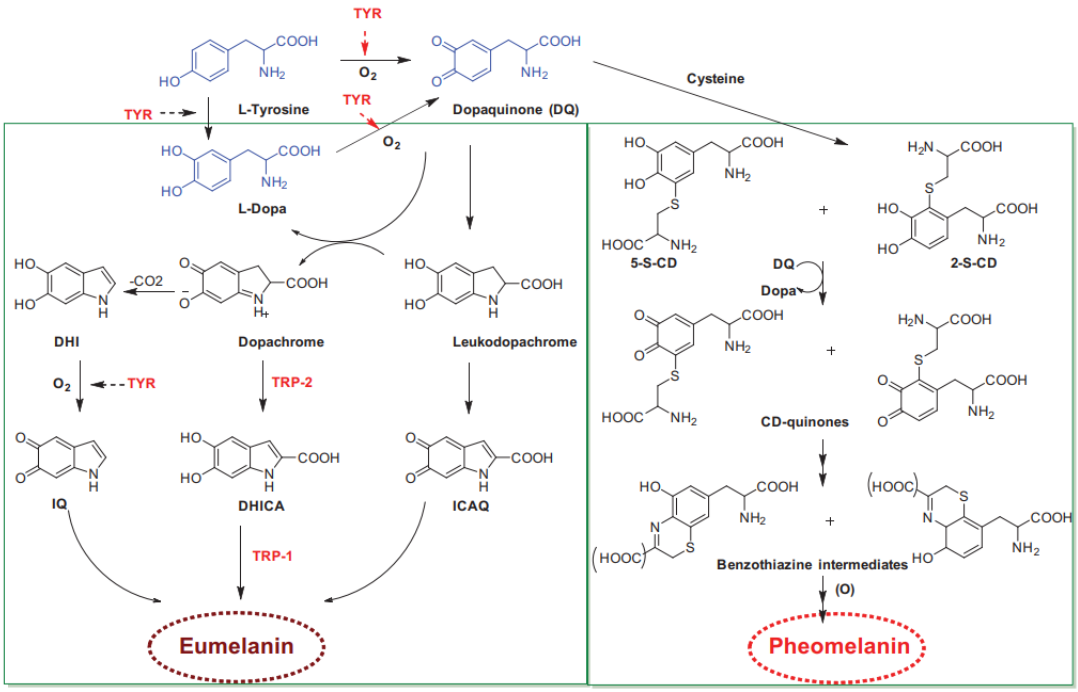


Figura 3: representação gráfica da rota sintética da melanina (Fonte: PILLAIYAR et al. 2017)
Obs.: Tyr: tyrosinase; DQ: dopaquinone; L-Dopa: L-3:4-dihydroxyphenylalanine; DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylic acid; DHI: 5,6-dihydroxyindole; ICAQ: indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone; IQ: indole-5,6-quinone; HBTA: 5-hydroxy-1,4- benzothiazinylalanine).

Em condições fisiológicas normais, a melanina apresenta os benefícios de fotoproteção contra raios ultravioletas (UV), atuação no cérebro, ação antioxidante e outras funções. Entretanto, pode haver condições de excesso de melanina no corpo, onde há a hiperpigmentação e doenças de pele relacionadas, como sardas, manchas da idade, melasma e melanoma (câncer), ou condições de redução/ausência de melanina, que resulta em hipopigmentação, a qual também está ligada com determinados distúrbios na pele. Neste contexto, considerando ainda como essas alterações prejudicam a autoestima do indivíduo afetado, há o interesse da indústria cosmética pela busca de potenciais produtos que interfiram na síntese de melanina (melanogênese) [14,15,18].

Entre os distúrbios com hiperpigmentação da pele, estão: melanose difusa congênita, anomalia pigmentar reticulada, hipermelanose nevoide linear e espiralada, melasma, doença de Addison e a dermatite de berloque e fitofotodermatite. A melanose difusa congênita é genética e de herança recessiva, que se caracteriza por hiperpigmentação difusa progressiva e pode

aparecer durante ou logo após o nascimento. A anomalia pigmentar reticulada inclui diferentes disfunções cutâneas hiperpigmentantes, com padrão reticulado, retiforme ou em forma de rede de pesca, e que ocorrem pelo aumento de melanina sem ser por alterações pós-inflamatórias ou condições que expõem reticulação secundária ao fenômeno vascular. A hipermelanose nevoide linear e espiralada se caracteriza por riscas múltiplas lineares, hiperpigmentadas e espirais, compostas de pequenas máculas homogêneas bronzeadas a marrons. O melasma, um dos distúrbios hiperpigmentantes mais comuns, se caracteriza por ser uma hiperpigmentação localizada na face, normalmente simétrica, que ocorre em mulheres. A doença de Addison se trata de uma hipofunção do córtex da suprarrenal e pode haver como manifestação clínica inicial a hiperpigmentação da pele, que é generalizada, mas com maior intensidade em regiões mais expostas ao sol. A dermatite de berloque e fitofotodermatite se dá por manchas hiperpigmentadas causadas por óleo de bergamota contendo furocumarina, que pode ser encontrado em perfumes [40].

Já no caso da hipopigmentação, podemos citar: despigmentação química, hipomelanose gutata idiopática, hipopigmentação macular progressiva, albinismo, piebaldismo e vitiligo. A despigmentação química é causada por agentes químicos como hidroquinonas e fenóis e a manifestação se assemelha ao vitiligo. A hipomelanose gutata idiopática não possui causa conhecida e produz máculas brancas nitidamente circunscritas, principalmente nas pernas e antebraços. A hipopigmentação macular progressiva também não possui etiologia conhecida e se dá por máculas hipopigmentadas no tronco central. O albinismo é uma alteração genética herdada, que resulta em perda de pigmentação na pele, cabelo e olhos, e pode ser ocular ou oculocutâneo. A síntese de melanina quando se tratar de albinismo oculocutâneo tirosinase-positivo. O piebaldismo também é uma condição genética, onde há manchas hipopigmentadas irregulares, presentes desde o nascimento, e podem estar associadas com uma mancha despigmentada que se origina a partir de uma área despigmentada no centro da testa. E por fim, o vitiligo, alteração pigmentante que vem ganhando destaque nos últimos anos, se trata de uma mancha adquirida e desfigurante, completamente despigmentada. Em lesões mais estabelecidas, há a destituição total de melanócitos, o que dificulta a possibilidade de tratamento. E mesmo em regiões que ainda estão

hipopigmentadas, mas não despigmentadas por completo, há poucos melanócitos dopa-positivos [40].

Tanto a hipo como a hiperpigmentação podem decorrer de alterações pós-inflamatórias ou por doenças sistêmicas e cutâneas. Alguns processos inflamatórios que podem alterar a pigmentação da pele são dermatoses, erupções fixas por medicamentos, líquen plano, queratose liquenoide benigna e o eritema multiforme. O tipo e nível de alteração pigmentante irá depender do processo inflamatório e das características do indivíduo, como fatores genéticos. A alteração pigmentar na pele pode ser também um sintoma secundário a determinadas doenças, como micoses, sarcoidose, doença de Darier, doença de Paget e doença de Bowen [40,41].

Considerando que a síntese de melanina ocorre nos melanócitos, presentes nas camadas mais internas da epiderme, é imprescindível que os ativos consigam alcançar essas camadas para que possam alterar a síntese. Pelo estrato córneo ser uma camada que normalmente serve de barreira e limita a entrada de substâncias externas na pele, se faz necessário o aprimoramento das fórmulas cosméticas de modo que os ativos possam alcançar as camadas mais profundas. Um dos métodos de interesse, é o uso da nanotecnologia. Como já mencionado anteriormente, as nanopartículas irão contribuir com outros fatores, não apenas com a absorção da substância de interesse, por isso é considerado vantajoso. A eficácia da penetração com uso da nanopartícula irá depender de suas propriedades físico-químicas, tais quais: equilíbrio óleo-água, tamanho, formato, deformabilidade e cargas de superfície. No geral, quando há maior caráter lipofílico e menores tamanhos de partícula, a absorção é aumentada [5,7,39]. Vale destacar ainda a variabilidade individual como um interferente no perfil de absorção de substâncias, que pode ser exemplificada pela idade, tipo de pele (oleosa, seca, mista), espessura da pele, fluxo sanguíneo na região de aplicação, hidratação, pH, presença de lesões cutâneas etc [4].

2.3 CULTIVO CELULAR

A cultura de células é uma ótima alternativa ética e econômica para substituir o uso de animais na pesquisa, apesar de apresentar certas desvantagens considerando que não reproduz com tanta fidelidade o tecido

humano, por estar em condições diferentes do organismo, sejam nutricionais, hormonais ou dimensionais [42]. A cultura de células pode ser em monocamada (bidimensional) ou tridimensional, além das co-culturas, porém este trabalho foca no modelo bidimensional, que foi a empregada. Existem diversos fatores que podem influenciar no crescimento celular, entre eles a morfologia, a expressão proteica, a adaptação à cultura, as condições ambientais, e ainda a disponibilidade de nutrientes e substratos [43]. Há 3 tipos principais de culturas de células: a cultura primária, a contínua ou imortalizada e a de células transformadas. A cultura primária é obtida pela fragmentação de um tecido por dissociação mecânica ou enzimática e mantém as características do tecido de origem. É interessante para estudar o comportamento de determinada célula in vitro, porém seu tempo de vida é mais curto. A cultura contínua ou imortalizada é aquela obtida após algumas passagens, pois se tornam predominantes as células capazes de sobreviver e bem adaptadas ao meio, o que faz com que se proliferem mais rapidamente. A linhagem imortalizada apresenta algumas características do tecido de origem e são altamente proliferativas, podendo se dividir várias vezes. A vantagem é justamente a capacidade de serem mantidas por longos períodos e por isso é muito utilizada na pesquisa, como na produção de fármacos e vacinas. Já as células transformadas, são as com características tumorais e, portanto, são genética e morfologicamente diferentes do tecido original, especialmente na divisão celular que ocasiona na proliferação descontrolada. As células podem ainda ser divididas em aderentes e não aderentes (em suspensão), de acordo com a necessidade de adesão/ancoragem. As aderentes se originam de tecidos duros e dependem de uma superfície de contato para se aderirem e proliferarem. Para tanto, as garrafas de cultivo devem possuir uma carga negativa, que irá mediar a adesão e as células formarão uma monocamada celular no fundo da garrafa. As células não aderentes ficam suspensas no meio, derivando de tecidos que não necessitam de adesão para sua proliferação e sobrevivência [42,43].

As células são cultivadas em garrafas contendo meios nutritivos, que possibilitem seu crescimento, proliferação e sobrevivência, juntamente do controle de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, oxigênio, gás carbônico (CO_2) e umidade. Esse meio é normalmente suplementado e deve ser sempre renovado, para evitar tanto a escassez de nutrientes como a contaminação [43]. Sua composição consiste de sais inorgânicos, vitaminas,

aminoácidos essenciais e não essenciais, proteínas, glicose, antibióticos e um indicador de pH, além das especificidades de acordo com cada linhagem, que podem requerer suplementos como tampões HEPES e bicarbonato de sódio, entre outros. Há diferentes meios que podem ser empregados no cultivo celular, mas os usualmente recomendados e utilizados são o RPMI 1640 e o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). O pH do meio de cultura deve ser entre 7,4-7,7, o que pode ser averiguado com o uso de um indicador como o vermelho de fenol. Também costuma ter umidificação com CO_2 a 5%, para a formação do ácido carbônico (H_2CO_3) através das reações de tamponamento do sistema bicarbonato. O meio completo é aquele que possui soro, rico em fatores de crescimento que induzem a proliferação, e fatores de adesão. Os soros mais utilizados são o de bezerro bovino (BCS) e fetal bovino (SFB [43]. O SFB é universalmente utilizado como suplementação para meios de cultivo de fibroblastos, isso pode se dar por ser obtido com menor dificuldade, apresentar grandes concentrações de fatores de crescimento e baixa concentração de gamaglobulinas, quando comparado aos demais soros animais. É usualmente empregado em concentrações de 5 a 20% no meio [44]. O estudo de ISAAC et al. avaliou a viabilidade do soro humano como alternativa para o SFB, tendo em vista as complicações imunológicas do mesmo, e puderam constatar que seria uma alternativa em especial para a aplicação clínica. Porém, no que tange à pesquisa, não é necessária a substituição.

Após cultivadas, as células devem passar por um processo de renovação, o qual consiste em transferir as células para uma nova garrafa e, se necessário, descartar uma quantidade. Isto porque ao atingir certo número de células (confluência) que impossibilite o crescimento, elas se inibem e morrem [42,43]. Para as células não aderentes, basta retirá-las e adicionar novo meio completo. Porém no caso das aderentes, é necessário passar por uma dissociação do fundo da garrafa, onde as células estão aderidas, que pode ser por ação mecânica ou enzimática. A mecânica é através de um dispositivo semelhante a um rodo, enquanto que a enzimática é pelo uso de proteases que digerem as proteínas de adesão. A protease mais comum é a tripsina, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida, impedindo a ligação dos receptores da superfície celular. Porém, não se pode deixar muito tempo a célula na presença da tripsina para não haver lise celular [42]. A confluência pode ser observada em microscópio óptico invertido

com contraste de fase normalmente. Enquanto as células não estão confluentes suficiente (80-90% para aderentes e $1x10^5$ a $1x10^6$ células/ mL para em suspensão), pode-se apenas fazer a troca do meio. A quantidade de passagens também é importante a se monitorar devido às alterações gênicas que modificam o fenótipo celular, o que prejudica a reprodutibilidade de resultados [43].

Durante o cultivo celular, é importante manter as boas práticas laboratoriais no sentido de prevenir contaminações, as quais podem ser biológicas, químicas ou cruzadas. As biológicas incluem bactérias, fungos e vírus. Entre as químicas estão as endotoxinas das bactérias gram negativas, detergentes residuais, radicais livres, metais pesados e fixadores residuais. E a cruzada é a contaminação entre diferentes linhagens celulares. A água utilizada para o meio também é importante ser de alta pureza, para evitar contaminações químicas e biológicas [43].

Para este trabalho, foram utilizadas células de melanoma humano imortalizadas, por possuírem alta proliferação e facilidade para sobreviver, comparada a cultura de melanócitos comuns.

2.4 ENSAIOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA

A avaliação da segurança e eficácia de um produto e/ou seus ingredientes faz parte da fase pré-clínica de seu desenvolvimento. São testes essenciais para avaliar o potencial e a aptidão do composto a prosseguir com o desenvolvimento e realizar testes clínicos. Tais ensaios podem ser realizados *in sílico*, *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* em animais e, posteriormente, os clínicos (*in vivo* em seres humanos). Atualmente há uma grande regulamentação a respeito destes testes, incluindo os tipos de testes que podem ser realizados, validados ou não, além da atenção especial em relação aos testes em animais, os quais foram em grande parte substituídos por testes *in vitro* devido a uma demanda de produtos *cruelty free*. Para a avaliar a segurança de um cosmético, podem ser realizados testes de irritação/corrosão ocular e cutânea, fototoxicidade, sensibilização cutânea, genotoxicidade e absorção e permeação cutânea [45]. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade são muito empregados para avaliar a toxicidade dos ativos ou produtos, podendo estar incluso nas avaliações mencionadas ou realizados separadamente. É importante salientar a tendência

do ramo para a completa substituição de testes in vivo, não somente em animais, mas também em humanos, que vem sendo motivada desde a conceitualização do programa 3Rs, na década de 60. O nome vem de seus 3 principais objetivos: Reduction (Redução), Refinement (Refinamento) e Replacement (substituição). O programa é caracterizado basicamente por: reduzir a quantidade de animais utilizados na pesquisa, reduzir o sofrimento destes e também a busca por métodos que substituam os testes *in vivo* [46]. Tendo isto em vista, é notável a relevância da utilização e desenvolvimento de testes *in vitro*.

Os testes *in vitro* podem ser realizados utilizando-se culturas em monocamadas ou em modelos 3D. As células de fibroblasto humano ou queratinócitos são usualmente empregadas para os ensaios. Os fibroblastos dérmicos humanos são células fusiformes com longas prolongações citoplasmáticas, responsáveis pela estrutura e resiliência dérmica, além de relevantes no processo de regeneração celular. Também é mencionado sua capacidade de estimular a proliferação de queratinócitos e reduzir alguns sinais de envelhecimento da pele [47]. A viabilidade celular é comumente realizada para analisar a proliferação celular, a citotoxicidade dos ativos e produtos, ou como um controle interno durante outros ensaios [48]. Um dos métodos mais utilizados é o método descrito por Mosmann (1983), um método colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazólio MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) pelas células metabolicamente ativas. Outros sais de tetrazólio que podem ser utilizados são o XTT, MTS e WST-1, porém estes possuem carga negativa e são normalmente utilizados junto de um intermediário aceitador de elétrons. A redução dos sais de tetrazólio é teorizada na literatura como sendo por enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, as quais reduziriam os anéis de tetrazólio a formazan, de coloração roxa. Com a morte celular, ou seja, ausência de respiração celular, não há a redução dos sais de tetrazólio e consequentemente não há a coloração roxa resultante. A quantidade de formazan pode ser medida por espectrofotometria com um leitor de microplacas, com leitura em comprimento de onda de 570nm, e é diretamente proporcional à viabilidade celular. A concentração do MTT e o tempo de incubação também afetam na intensidade do resultado. Como o formazan formado é insolúvel em água, é necessária a solubilização do produto, feita normalmente com DMSO (dimetil sulfóxido) [47-51]. Outros métodos que podem ser empregados para avaliar a viabilidade celular são a redução de resazurina,

medição de ATP, teste de proteases marcadores de viabilidade e viabilidade em tempo real. A resazurina é uma molécula que serve como marcador redox e é reduzida à resorufina pelas células. Este método possui a vantagem de ser barato e mais sensível que a redução de tetrazólio, porém possui muitos interferentes. A detecção de proteases marcadoras de viabilidade celular se baseia, como o nome sugere, analisa a presença de proteases seletivamente presentes e ativas em células vivas. O substrato fluorogênico (GF-AFC) penetra as células, onde é clivado e gera um sinal fluorescente proporcional à viabilidade celular. Uma vantagem do método é não ser tóxico para as células, o que permite inclusive a multiplexação com outros testes, já que a cultura celular permanece viável após o teste e permite realização de outros ensaios sequencialmente. O ensaio de medição de ATP é um teste bioluminescente que utiliza luciferase. É o ensaio mais rápido e mais sensível disponível. Já o ensaio em tempo real, mais recente, também utiliza luciferase, junto de um pró-substrato, o qual é reduzido pelas células metabolicamente ativas a um substrato que se difunde pelo meio de cultura e é utilizado pela luciferase para gerar um sinal luminescente. É um ensaio que também pode ser utilizado para multiplexação e possui a característica de permitir a monitoração de eventos citotóxicos recentes, porém é limitado pela eventual depleção do pró-substrato pelas células ativas [45]. A citotoxicidade também pode ser avaliada por métodos que analisam a ruptura da integridade da membrana, como o *Trypan Blue* o *Neutral Red*. O *Trypan Blue* se baseia na penetração deste composto, normalmente impermeável, em células mortas que possuem a membrana citoplasmática danificada, as corando. Apresenta vantagens como a percepção se é célula morta ou detritos manchados, variação entre operadores e tempo e trabalho na medição de várias amostras. Já o *Neutral Red*, é um corante catiônico fraco capaz de se difundir pela membrana citoplasmática normal, sendo diretamente proporcional ao número de células vivas [48,50,51].

A avaliação da eficácia de cosméticos depende da característica desejável do produto a se obter, como anti-aging, fotoproteção, hidratação, cicatrização, etc. No caso desse tipo de avaliação é mais interessante o uso de modelos tridimensionais de cultura celular, devido a maior semelhança com o nativo, essencial pela interação do ativo com o tecido. Um ensaio de eficácia muito utilizado é a atividade antioxidante dos ativos e produtos cosméticos, um ensaio *in vitro* importante que pode indicar informações sobre as características

anti-aging e de clareamento de pele por exemplo do composto [45]. Diversos tipos de ensaios químicos podem ser empregados para a análise da atividade antioxidante, como DPPH, ABTS, hidroxil, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), ferric antioxidant power reduction (FRAP), cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC), phosphomolybdenum (PM). São métodos normalmente baratos, úteis e de alto rendimento. Cada um deles apresenta determinada limitação e, portanto, a escolha do método deve ser de acordo com a necessidade e disposição do avaliador. DPPH, ABTS e hidroxil são testes de eliminação de radicais, baseando-se nas conversões desses compostos na presença de antioxidantes; β-Carotene-linoleate model system e TBARS são testes de peroxidação lipídica; e FRAP, CUPRAC e PM são testes de poder redutivo. Ensaios baseados em células e enzimas também podem ser utilizados [52].

2.4.1 Síntese de melanina

Um outro ensaio de eficácia interessante para cosméticos é a avaliação da síntese de melanina, que foi o ensaio realizado neste trabalho. A síntese da melanina pode ser mensurada nas culturas celulares pelo conteúdo de melanina formado ou pela atividade da enzima tirosinase. Podem ser utilizadas técnicas de espectrofotometria e degradação química seguida de HPLC (CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e ESR (espectroscopia), sendo a espectrofotometria o método mais utilizado e gera resultados confiáveis se executado adequadamente. Para avaliar o conteúdo de melanina, pode ser considerado o conteúdo de melanina por célula ou por cultura/área, mas o conteúdo por cultura/área é considerado a melhor opção, já que in vivo o efeito do conteúdo de melanina é determinado por área, considerando que pode haver crescimento celular sem mudar a síntese de melanina por célula. Em comparação com a medição do conteúdo de melanina, a avaliação da atividade da tirosinase não é tão sensível, pois apesar de a enzima ter um papel fundamental na síntese da melanina, outros fatores como enzimas auxiliares, alguns íons metálicos como cobre e ferro, e também fatores genéticos, contribuem para a síntese. Adicionalmente, deve ser considerado a fase de crescimento celular da cultura ao analisar a melanogênese, pois dependendo da fase e do tipo de célula, a síntese pode naturalmente aumentar ou decair,

independentemente do tratamento, destacando-se a importância da comparação com o controle nos experimentos. [18,53]

2.5 AMORA PRETA XAVANTE

A amora preta faz parte da família Rosaceae e é classificada no gênero Rubus, o qual possui cerca de 740 espécies. São várias as cultivares produzidas atualmente, mas as mais utilizadas provêm do programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado, como a Tupy, Guarani e Xavante. O maior produtor no Brasil é o Rio Grande do Sul, em consequência de suas características climáticas adequadas, mas outras regiões do sul e sudeste também apresentam boa produção. O cultivo da amora preta é interessante pois possui baixo custo de implantação e manutenção do pomar, não exige muito uso de agrotóxicos e possui um retorno rápido. [3,54,55,56]

O fruto é rico em compostos bioativos como vitamina A, B e C, polifenóis, pigmentos, minerais, entre outros, os quais resultam em seus significantes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antineoplásicos, etc., demonstrados *in vitro* e *in vivo*. Seus compostos fenólicos são os principais responsáveis por sua ação antioxidante. Entre os compostos fenólicos estão inclusos os flavonoides, os taninos, os ácidos fenólicos e estilbenos, que são metabólitos secundários com ação protetora ao organismo. As antocianinas também estão inclusas nesses compostos, sendo pigmentos com vários efeitos benéficos à saúde. Também é comum na amora preta a presença de ácido elágico, um constituinte fenólico da fruta que possui funções antimutagênica e anticancerígena. [3,54,55,56]

Uma forma de utilizar a amora é usando seu óleo, o qual possui alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, tocoferóis, tocotrienóis, fitoesteróis e carotenóides, que podem ser benéficos para a saúde, além de ser um óleo comestível. Em cosméticos, é possível a encapsulação do óleo para obter uma permeação cutânea mais efetiva. [1,2] Sua extração pode ser feita de várias formas: prensagem a quente ou a frio, extrações por solvente, entre outras. A extração com solvente é a menos interessante, pelo tempo e trabalho requerido, havendo ainda resíduos no óleo. A extração com líquido pressurizado é uma

melhor opção. Para tal, é amplamente utilizado o CO_2 supercrítico como solvente. Propano também é uma alternativa.[2]

Por se apresentar como um fruto repleto de benefícios para a saúde e com grande potencial como ativo cosmético por suas propriedades antioxidantes especialmente, a amora preta xavante foi o fruto escolhido para o presente trabalho, a fim de avaliar se seu óleo possui efeitos sobre a síntese de melanina, característica ainda não estudada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação da melanogênese, fizemos dois tipos de metodologias diferentes, sendo uma básica e a outra uma adaptação na tentativa de aperfeiçoar o método e os resultados.

3.1 PRIMEIRO MÉTODO

As células de melanoma humano A375 foram plaqueadas em placa de 12 poços e incubadas por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Após a incubação, as células foram tratadas com meio suplementado (ou completo, meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e soluções estoques de óleo de amora obtido por extração com CO_2 supercrítico, nanocápsulas do óleo de amora. As soluções para os tratamentos foram antes preparadas em eppendorfs, nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL de ativo, e delas foram transferidos 100 µL para os respectivos poços.

Concentração	Óleo de Amora	Nano do óleo de Amora
100	200 µL da amostra + 1800 µL de meio completo	200 µL da amostra + 1800 µL de meio completo
150	300 µL da amostra + 1700 µL de meio completo	300 µL da amostra + 1700 µL de meio completo
200	400 µL da amostra + 1600 µL de meio completo	CONTROLE

Tabela 1: representação simplificada das concentrações de amostras e soluções de tratamento utilizados na placa.

A placa com o tratamento foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 72 horas. Adicionou-se 1 mL de NaOH a 1M em cada poço para lise das células, a placa foi colada na estufa a 60ºC por 1 hora e após esse tempo, cada poço foi homogeneizado na própria placa e depois transferido para um tubo Falcon, seguindo com centrifugação a 4000 RPM por 10 min. O pellet foi ressuspendido por ação mecânica através da micropipeta de 1 mL após 3

dias na geladeira, pela dificuldade em ressuspender com RPMI e auxílio de vórtex no dia, e foi transferido para uma placa de 96 poços para fazer a leitura de absorbância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na Central Analítica, no comprimento de onda de 405 nm.

3.2 SEGUNDO MÉTODO

As células de melanoma humano A375 foram plaqueadas em placa de 12 poços e incubadas por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C, assim como no primeiro método. Após as 24h, foram tratadas com 0,2 mM de Tirosina estéril, meio suplementado (composto por meio RPMI 1640, 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e soluções estoques estéreis de óleo de amora e nanocápsulas do óleo de amora. A Tirosina foi adicionada no meio suplementado e essa composição foi então transferida para os poços. A concentração foi única, de 100 µg/mL de ativo, ou seja, adicionou-se 200 µL de ativo e 1800 µL de meio suplementado com tirosina. A placa com o tratamento foi incubada em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 72 horas.

O conteúdo dos poços foi transferido para tubos Falcon, os quais foram centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. Para a leitura, utilizou-se 2 metodologias de revelação para complementar, Biureto (sulfato de cobre) e Bradford. Em uma placa de 96 poços, foram pipetados 150 µL de amostra + 150 µL de reativo nos poços (utilizamos apenas 30 poços). No caso, pela falta de certeza se a melanina estava precipitando, foi realizado também o teste com o pellet + sobrenadante, além de somente com o pellet (ressuspenso no reativo), resultando na placa da seguinte maneira:

Bradford + sobrenadante	A	NA	C	C	C	C	B	B
Biureto + sobrenadante	A	NA	C	C	C	C	B	B
Bradford + pellet	A	NA	C					
Biureto + pellet	A	NA	C					

Figura 4: ilustração da disposição do conteúdo na placa de 96 poços para leitura. *C: controle; B: branco; A: óleo de amora; NA: nanocápsula do óleo de amora. Obs: não foram ilustrados os 96 poços, mas apenas os que utilizamos.

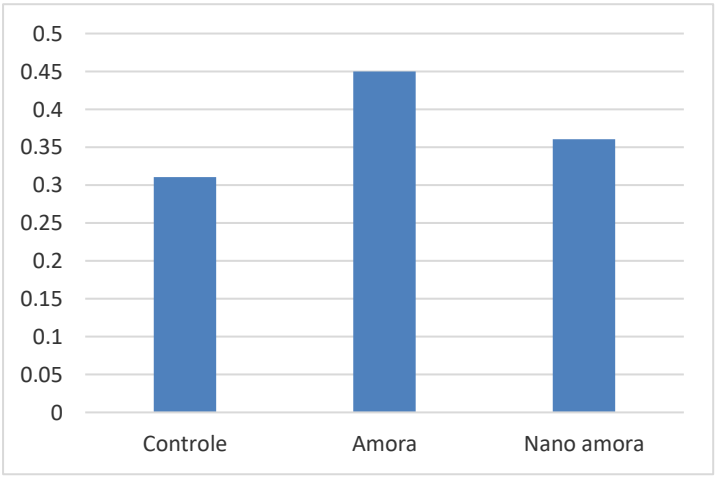
Em seguida, levamos a placa para leitura no espectrofotômetro, lendo em 3 comprimentos de onda diferentes: 570 nm, 540 nm (comprimento de onda do complexo formado com biureto) e 620 nm. O comprimento de onda para o complexo formado com o reativo de Bradford seria de 595 nm, mas como não havia este valor no equipamento, utilizamos os de 570 e 620 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

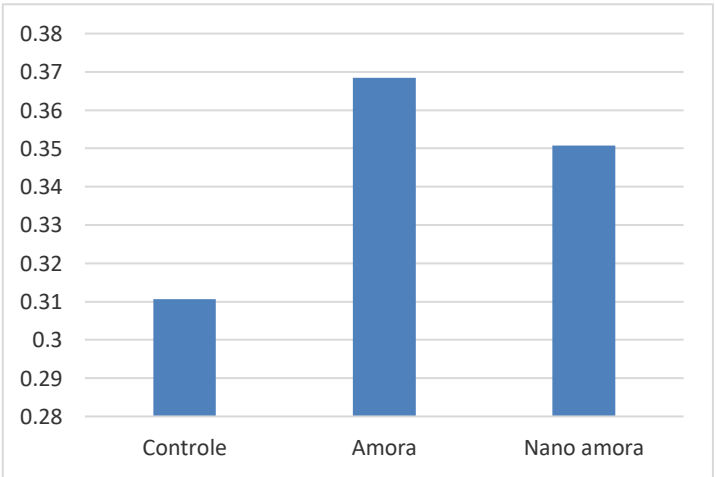
Para o primeiro método, obtivemos os seguintes resultados, apresentados abaixo na Tabela 2 e na Figura 5:

Concentração (µg/mL)	Porcentagem de melanina comparada ao controle (100%)	
	Óleo de Amora	Nano Amora
100	144.9%	116%
150	118.6%	112.9%
200	64.4%	-

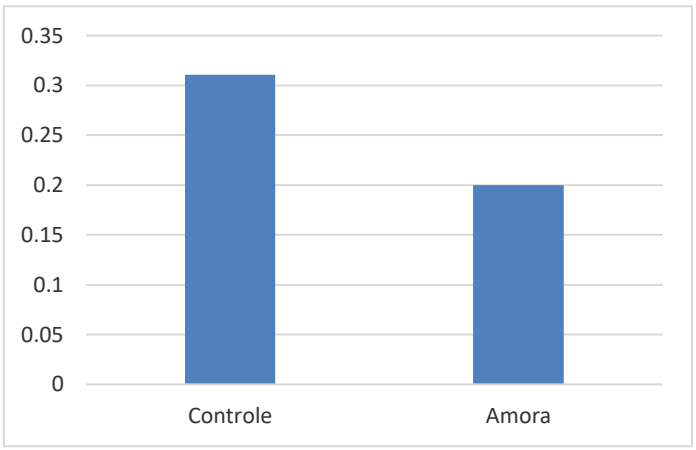
Tabela 2: porcentagens do conteúdo de melanina obtidos após os tratamentos em diferentes concentrações e leitura em 405 nm.



(A)



(B)



(C)

Figura 5: Gráficos da absorbância obtida pela leitura das concentrações de 100 µL (A), 150 µL (B) e 200 µL (C) pelo primeiro método. No eixo y estão os valores de absorbância encontradas e o eixo x diz qual a amostra.

Para o segundo método, obtivemos os seguintes resultados:

	Óleo de amora	Nanocápsulas de amora
Sobrenadante + pellet com Biureto	90.4%	95.2%
Pellet com Biureto	57.1%	70.1%

Tabela 3: porcentagens do conteúdo de melanina obtidos após os tratamentos, revelados com Biureto e lidos em 540 nm.

	Óleo de amora	Nanocápsulas de amora
Sobrenadante + pellet com Bradford	99.3%	101.1%
Pellet com Bradford	165.1%	95.4%

Tabela 4: porcentagens do conteúdo de melanina obtidos após os tratamentos, revelados com Bradford e lidos em 570 nm.

	Óleo de amora	Nanocápsulas de amora
Sobrenadante + pellet com Bradford	97.4%	103.0%
Pellet com Bradford	363.4%	142.4%

Tabela 5: porcentagens do conteúdo de melanina obtidos após os tratamentos, revelados com Bradford e lidos em 620 nm.

Como é possível observar nos dados apresentados na Tabela 2 e na Figura 5, o óleo de amora na concentração de 100 µg/mL proporcionou um aumento significativo na síntese de melanina, de 44,9%. Ainda não há tantos dados em relação aos efeitos na melanogênese por este óleo, porém os dados encontrados demonstram o potencial deste ativo no tratamento de distúrbios por hipopigmentação, sendo necessários mais estudos acerca. Já as nanocápsulas apresentaram um aumento de 16% apenas, valor considerado baixo, porém é esperado que haja um menor aumento na síntese do que o óleo bruto, já que o ativo está protegido nas nanocápsulas. Entretanto, a vantagem da aplicação de nanocápsulas em cosméticos reside justamente na proteção do ativo, aumento da absorção cutânea, entre outras características. Portanto, sua utilidade depende do ativo e do tipo de produto que se deseja obter, sendo possível um ajuste de dose. Neste caso, seria interessante realizar comparações no tecido dérmico, como testes in vitro com tecnologia 3D, para avaliar a intensidade e duração do efeito após a aplicação, além da estabilidade e integridade do produto.

Nota-se que em concentrações de 150 e 200 µg/mL passa a haver um decréscimo na melanogênese, demonstrando a citotoxicidade a partir destas concentrações. Considerando juntamente o custo de produção, não seria interessante exigir concentrações maiores do óleo para produzir efeitos significativos, mas é importante ressaltar os limites de segurança do ativo.

Em relação aos métodos de revelação Bradford e Biureto, ambos os métodos quantificam proteínas totais, porém diferem entre si na sensibilidade, sendo que o Bradford é mais sensível. A desvantagem do uso desses reveladores é justamente por quantificar todas as proteínas e não apenas a

melanina, mas ainda são utilizados. Na realização do método, foram obtidas absorbâncias muito altas (>1), o que é justificado pelo fato de quantificarem as proteínas totais. Mas por conta destes valores altos, o método perde a confiabilidade e, portanto, os resultados foram desconsiderados e a metodologia foi tida como inadequada para avaliação da melanogênese.

Considerando os problemas de ambos métodos, foi considerado que uma boa opção a se testar seria utilizar o primeiro método, porém tratando adicionalmente com tirosina estéril e o meio suplementado com 20% de SFB para maior estímulo das células, e sem utilizar reveladores.

5 CONCLUSÕES

A amora preta xavante (Rubus spp. L., Rosaceae) apresenta grande potencial para aplicação em produtos cosméticos, especialmente os que buscam um claim de produtos mais naturais e menos agressivos ao organismo e ao meio ambiente. Isto se dá pela sua rica composição de vitaminas e polifenóis, entre outros compostos, os quais resultam em diversos efeitos benéficos para a saúde, como ação antioxidante por exemplo. Tendo isto em vista, é adequada a realização de outros testes para avaliar outros possíveis efeitos ainda não explorados deste fruto, que no caso do presente trabalho foi a interferência na síntese de melanina. Visando avaliar o efeito do óleo da semente da amora preta xavante, realizamos testes baseados no cultivo celular 2D e quantificação do conteúdo de melanina por espectrofotometria após os tratamentos com o óleo bruto e encapsulado. Os resultados apresentaram um aumento significativo da síntese de melanina, caracterizando o óleo como possível estimulante da melanogênese, o que poderia ajudar nas diversas condições hipopigmentantes. Apesar de não ter sido possível no presente trabalho, seria interessante reproduzir os testes a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados. Entretanto, o trabalho conseguiu demonstrar o potencial do óleo de semente da amora preta xavante como potencial ingrediente em produtos cosméticos que objetivam aumentar a melanogênese.

REFERÊNCIAS

1. D'ANGELO, R. W. O. et al. UPLC–QToF-MS Characterization of Blackberry Extracts of Cultivars 'Tupy', 'Guarani', and 'Xavante': Development of Extract-Loaded Niosomes. Curitiba: Revista Brasileira de Farmacognosia, v.30, n.4, 2020.

2. CORREA, M. S. et al. Pressurized extraction of high-quality blackberry (Rubus spp. Xavante cultivar) seed oils. Curitiba: J. of Supercritical Fluids, 2020.

3. JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (Rubus spp). Londrina: Universidade Federal de Pelotas, Semina: Ciências Agrárias, v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.

4. VOGEL, E. M. et al. Challenges of nanotechnology in cosmetic permeation with caffeine. Campo Mourão, Paraná: Brazilian Journal of Biology, v.82, 2020.

5. SALVIONI, L. et al. The emerging role of nanotechnology in skincare. Milano, Italy: Elsevier, Advances in Colloid and Interface Science, 2021.

6. SANTOS, P. P. et al. Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. Porto Alegre, RS: J Food Sci Technol, 2018.

7. KATZ, L. M.; DEWAN, K.; BRONAUGH, R. L. Nanotechnology in cosmetics. USA: Elsevier, Food and Chemical Toxicology, v.85, p.127-137, 2015.

8. LOHANI, A. et al. Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. India: Hindawi Publishing Corporation, 2014.

9. FERREIRA, L. V. V. Nanotecnologia na formulação de cosméticos. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2016.

10. NASCIMENTO, P. A. do; PINHEIRO, F. Toxicidade dérmica por nanocosméticos. Brasil: Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz.

11. VIEIRA, M. V. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo carotenoides de Haematococcus pluvialis para aplicação tópica cutânea visando atividade quimiopreventiva e fotoprotetora. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

12. SARKAR, R.; BANSAL, A.; AILAWADI, P. Future therapies in melasma: What lies ahead?. India: Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2020.

13. PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. Korea: Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry, v. 32, n. 1, p. 403–425, 2017.

14. HATDYZ, K.; LATAKJA, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. Poland: Med. Chem. Commun., v.10, p. 378-389, 2019.

15. NIU, C.; AISA, H. A. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. China: Molecules, 2017.

16. HWANG, I.; HONG, S. Neural Stem Cells and Its Derivatives as a New Material for Melanin Inhibition. Korea: International Journal of Molecular Sciences, 2018.

17. PANDEL, R. et al. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. Hindawi Publishing Corporation, 2013.

18. HU, Dan-Ning. Methodology for Evaluation of Melanin Content and Production of Pigment Cells in Vitro. Photochemistry and Photobiology, 2007.

19. LEE, J.; JI, J.; PARK, See-Hyoung. Antiwrinkle and antimelanogenesis activity of the ethanol extracts of Lespedeza cuneata G. Don for development of the cosmeceutical ingredients. Korea: Food Sci Nutr., 2018.

20. DeLouise, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. University of Rochester Medical Center, New York: Journal of Investigative Dermatology, v.132, p. 964–975, 2012. Disponível em: <*Applications of Nanotechnology in Dermatology (jidonline.org)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

21. BALKRISHNA, A. et al. Phytoantioxidant Functionalized Nanoparticles: A Green Approach to Combat Nanoparticle-Induced Oxidative Stress. India: Hindawi, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021. Disponível em: <*OMCL_3155962 1..20 (nih.gov) >. Acesso em: 12 fev. 2022.

22. KAUR, I. P. et al. Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization. India: Elsevier, Journal of Controlled Release, v.193, p.51-62, 2014. Disponível em: <Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization | Elsevier Enhanced Reader>. Acesso em: 12 fev. 2022.

23. PACHECO, C. C. Desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo de Copaifera reticulata Ducke. Manaus, AM: Universidade Federal do Amazonas, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, 2014. Disponível em: <*(Microsoft Word - Disserta\347\343o_versaofinal_Carolina Pacheco) (ufam.edu.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

24. CAVALCANTI, C. de O. Nanocosméticos: da manipulação atômica aos desafios regulatórios. Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra, 2014. Disponível em: <*Nanocosmeticos da manipulacao atomica aos desafios regulatorios.pdf (uc.pt)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

25. PERES, M. C. Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de Xylopia Aromatica Lamm. e sua atividade frente a oviposição de Bemisia Tabaci(Genn.) (Hemiptera: Aleroydidae) biótipo B. Rio Verde, GO: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2015. Disponível em: <2017-04-03-03-17-15NANOENCAPSULAMENTO Dissertacao Marília Cristina Peres .pdf (ifgoiano.edu.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

26. SANTOS, C. M. P. Nanoencapsulação de Ingredientes Activos em Cosmetologia. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2012. Disponível em: < >. Acesso em: 12 fev. 2022.

27. ASSIS, B. A. Nanocosmetotecnologia: principais nanoestruturas e suas aplicações. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2018. Disponível em: <Beatriz Alves Assis.pdf (mackenzie.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

28. JAEGER, A. F. Desenvolvimento de nanocápsulas para incorporação do fármaco. Assis, SP: FEMA, 2012. Disponível em: <1 CAPA.pdf (femanet.com.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

29. PRANDO, A.; ALVES, J.; JORGE, A. Nanocosméticos – QP 434. Disponível em: <*untitled (unicamp.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

30. SANTOS, A. C. et al. Nanotechnology-based sunscreens—a review. Portugal: Materials Today Chemistry, v.23, 2021. Disponível em: <Nanotechnology-based sunscreens-a review | Elsevier Enhanced Reader>. Acesso em: 12 fev. 2022.

31. VERDE, F. R. V.; WEID, I. von der; SANTOS, P. R. dos. Radar tecnológico: Nanocosméticos. Rio de Janeiro: Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, 2017.

32. GANESAN, P.; CHOI, DONG-KUG. Current application of phytocompound-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. Konkuk University, Republic of Korea: International Journal of Nanomedicine, 2016. Disponível em: <IJN-104701-current-application-of-phyto-compounds-based-nano-cosmeceuti (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

33. REIS, A. D. F.; SILVESTRIM, M. B.; SILVA, D. da. Nanotecnologia aplicada à cosméticos: avaliação da rotulagem de cosméticos com nanotecnologia. Balneário Camboriú, SC: UNIVALI. Disponível em: <NANOTECNOLOGIA APLICADA A COSMÉTICOS: AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE COSMÉTICOS COM NANOTECNOLOGIA (univali.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

34. DHAPTE-PAWAR, V. et al. Nanocosmeceuticals: facets and aspects. India: Future Sci. OA, 2020. Disponível em: <fsoa-06-613.pdf (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

35. CARVALHO, L. P. Nanotecnologia aplicada à dermocosmética. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, 2018. Disponível em: <TESE FINAL 21_11_2017.pdf (ensinolusofona.pt)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

36. LEITE, E. A. Nanocápsulas de poli--caprolactona contendo halofantrino: desenvolvimento, caracterização e estudo da cardiotoxicidade. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto, 2006. Disponível em: <6 (ufop.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

37. GOMES, M. L. S. Desenvolvimento tecnológico e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo Cilostazol. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

38. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica, Texto e Atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

39. KROMBHOLZ, R.; LUNTER, D. A New Method for In-Situ Skin Penetration Analysis by Confocal Raman Microscopy. Germany: Molecules, 2020.

40. ELDER, D. E. et al. Histopatologia da Pele, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

41. RAO, M. et al. Post-Inflammatory Hypopigmentation: Review of the Etiology, Clinical Manifestations, and Treatment Options. United States: J. Clin. Med., 2023.

42. MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. v. 2. 254 p.

43. GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. (Org.). Cultivo de células: da teoria a bancada. João Pessoa: UFPB, 2020.

44. ISAAC, C. et al. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. São Paulo: Rev. Bras. Cir. Plást., 2011; 26(3): p. 379-84.

45. TAVARES, R. S. N.; DE SOUZA, I.; DE MELO, M. O.; GASPAR, L. R. Biologia Celular e Molecular - Avaliação da Segurança e Eficácia de Produtos Cosméticos. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 2020. Disponível em: <Cosmetoguia - Biologia Celular e Molecular - Avaliação da Segurança e Eficácia de Produtos Cosméticos>. Acesso em: 12 fev. 2022.

46. CAZARIN, K. C. C. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Campinas: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2004. Disponível em: <02.pmd (scielo.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

47. ESPINOSA-LEAL, C. A.; GARCIA-LARA, S. Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications. Planta Med, 2019. Disponível em: <Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications - PubMed (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

48. Markossian, S. et al. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD), 2021. Disponível em: <Assay Guidance Manual (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

49. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983.

50. ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. ANVISA, 2012, 2 ed. Disponível em: <Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf (saocamilo-sp.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

51. ESTEVES-PEDRO, N. .M. Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso de cosméticos. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. Disponível em: <Natalia_Mencacci_Esteves_Pedro_ME_corrigida.pdf (usp.br)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

52. NASCIMENTO, L. D. do et al. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. Biomolecules, 2020. Disponível em: <Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications - PubMed (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

53. Hałdys, K.; Latajka, R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. Med. Chem. Commun., 2019. Disponível em: <MD-010-C9MD00005D.pdf (nih.gov)>. Acesso em: 12 fev. 2022.

54. HIRSCH, G. E. Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-preta (Rubus sp.). Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

55. ANTUNES, L. E. C. et al. Produção De Amoreira-Preta No Brasil. Jaboticabal: Rev. Bras. Frutic., 2014.

56. SAQUET, L. D.; CHIM, J. F. Compostos bioativos da amora-preta (Rubus spp): uma revisão. Campo Mourão: Brazilian Journal of Food Research, v. 11 n. 4, p. 35-53, 2020.

57. FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. França: International Journal of Pharmaceutics, 1989.