



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

NATAN CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOESTIMULADORA DE COLÁGENO DA CRAMOLL
LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA *in vitro***

Recife

2024

NATAN CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOESTIMULADORA DE COLÁGENO DA CRAMOLL
LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA *in vitro***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Morfotecnologia da Universidade Federal
de Pernambuco.
Área de concentração: Morfologia e
Inovação tecnológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Miguel de Andrade.

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia.

Prof^a. Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos.

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Natan Cordeiro da.

Análise da atividade bioestimuladora de colágeno da cramoll livre e imobilizada em um gel de galactomanana in vitro / Natan Cordeiro da Silva. - Recife, 2024.

146 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, 2024.

Orientação: Fernanda Miguel de Andrade.

Coorientação: Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientação: Noemia Pereira da Silva Santos.

Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Colágeno; 2. Lectinas; 3. Envelhecimento da pele. I. Andrade, Fernanda Miguel de. II. Correia, Maria Tereza dos Santos. III. Santos, Noemia Pereira da Silva. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

NATAN CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOESTIMULADORA DE COLÁGENO DA CRAMOLL
LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfologia e Inovação tecnológica.

Aprovado em: 27/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fernanda Miguel de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Fernanda Das Chagas Angelo Mendes Tenorio, (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Paulo Antonio Galindo Soares, (Examinador Externo ao programa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Marllyn Marques Da Silva, (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas e em especial, essa grande realização. Por sempre estar presente em todos os momentos e nunca ter me faltado. Obrigado senhor por tudo.

Agradeço a minha esposa por toda força que tem me dado, todos os conselhos e por todo esforço para que se torne possível a realização desse sonho.

Agradeço aos meus pais por em toda vida sempre terem sido uma fortaleza. Todos os ensinamentos e por toda dedicação que sempre deram aos seus filhos.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Miguel de Andrade por toda disponibilidade, sempre, por toda paciência, por tudo que tem me ensinado e por todos os puxões de orelha. Tenho muita gratidão por tudo. Tenho certeza de que não poderia ter tido melhor orientadora.

Agradeço ao Professor Dr. Paulo Antônio por toda contribuição e por ter disponibilizado o Laboratório de Biotecnologia e os materiais.

Agradeço a Professora Dr^a. Mariane Cajubá, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika) da UFPE, por toda ajuda e disponibilidade, tanto do laboratório quanto das contribuições para a realização da pesquisa.

Agradeço também as minhas coorientadoras Professora Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia e Professora Dr^a. Noemia Pereira da Silva Santos por toda ajuda a mim disponibilizada.

Agradeço a meus amigos Elisandra Cibely, Carlos Eduardo e Marllyn Marques por toda ajuda, pela disponibilidade e contribuição para a realização dos nossos experimentos.

Agradeço ao meu amigo José Bruno pelo companheirismo e ajuda no desenvolvimento de nossas pesquisas.

Agradeço a minha ex. Professora Jannieres Darc e ex. colega de classe Angelo Lira por todo o apoio.

Agradeço a CAPES pelo incentivo.

Sem todos vocês, nada disso seria possível. Cada um contribuiu e contribui de uma forma especial. Existe uma parte de vocês nesse trabalho, nesse sonho.

“Agora, graças a Deus, que sempre nos faz triunfar em Cristo, e por meio de nós difunde a fragrância do Seu conhecimento em todos os lugares.” 2 Coríntios 2:14

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa uma estrutura vital para a proteção dos órgãos internos. Com o passar dos anos, tende a diminuir a produção de colágeno e com a exposição a agentes externos, como luz solar, o processo do envelhecimento é acelerado, levando a formação de rugas e um aumento da flacidez. Busca-se cada vez mais substâncias que sejam capazes de retardar esse processo. A Cramoll 1,4 (Cramoll) é uma lectina extraída das sementes de *Cratylia mollis* que demonstrou ser capaz de estimular a produção e o depósito de colágeno tipo I em feridas de camundongos diabéticos. A Cramoll foi imobilizada em um gel de Galactomanana extraído das sementes de *Cassia grandis*, pois, proporciona maior estabilidade a lectina e uma liberação controlada no meio. Este estudo teve o objetivo de analisar a atividade bioestimuladora de colágeno da Cramoll livre e imobilizada em um gel de galactomanana sobre a linhagem de células vero CCL-81. As células foram divididas em 7 grupos: Controle (C) - Células Vero e suplementação; Controle Meio (CM) - Meio de cultura; Cra_{0,2} – Células Vero tratadas com Cramoll (0,2mg/ml); Cra_{0,2}+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll (0,2mg/ml) imobilizada no gel de Galactomanana; Cra_{0,4} – Células Vero tratadas com Cramoll (0,4mg/ml); Cra_{0,4}+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll (0,4mg/ml) imobilizada no gel de Galactomanana; e CG – Células Vero tratadas com Galactomanana. Após 48 e 72 horas adicionou-se o corante Sirius Red (Chondrex) ao meio, que liga-se especificamente as fibras de colágeno e a quantificação foi realizada utilizando um espectrofotômetro a 570nm. A Cramoll foi capaz de estimular a síntese de colágeno em todas as concentrações utilizadas, tanto sozinha, quanto imobilizada no gel de galactomanana. Apresentou maior síntese de colágeno em relação ao tempo de exposição (72 horas) e não apresentou diferenças significativas de ação estando livre ou imobilizada. Esses resultados comprovam a atividade bioestimuladora de colágeno dessa lectina.

Palavras-chave: Colágeno; Lectinas; Envelhecimento da pele.

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the human body and represents a vital structure for the protection of internal organs. Over the years, collagen production tends to decrease and with exposure to external agents, such as sunlight, the aging process is accelerated, leading to the formation of wrinkles and increased sagging. More and more substances capable of slowing down this process are being sought. Cramoll 1,4 (Cramoll) is a lectin extracted from the seeds of *Cratylia mollis* that has been shown to be capable of stimulating the production and deposition of type I collagen in wounds of diabetic mice. Cramoll was immobilized in a galactomannan gel extracted from the seeds of *Cassia grandis*, as it provides greater stability to the lectin and a controlled release into the medium. This study aimed to analyze the collagen biostimulating activity of free Cramoll and immobilized in a galactomannan gel on the vero CCL-81 cell line. The cells were divided into 7 groups: Control (C) - Vero cells and supplementation; Control Medium (CM) - Culture medium; Cra0.2 - Vero cells treated with Cramoll (0.2mg/ml); Cra0.2+Gal - Vero cells treated with Cramoll (0.2mg/ml) immobilized in Galactomannan gel; Cra0.4 - Vero cells treated with Cramoll (0.4mg/ml); Cra0.4+Gal - Vero cells treated with Cramoll (0.4mg/ml) immobilized in Galactomannan gel; and CG - Vero cells treated with Galactomannan. After 48 and 72 hours, Sirius Red (Chondrex) dye was added to the medium, which specifically binds to collagen fibers and quantification was performed using a spectrophotometer at 570nm. Cramoll was able to stimulate collagen synthesis at all concentrations used, both alone and immobilized in galactomannan gel. It presented greater collagen synthesis in relation to the exposure time (72 hours) and did not present significant differences in action whether free or immobilized. These results prove the collagen biostimulating activity of this lectin.

Keywords: Collagen; Lectins; Skin aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 –	Termorregulação Corporal	18
Figura 2 –	Principais estruturas da pele	19
Figura 3 –	Camadas da epiderme	20
Figura 4 –	Fibroblasto	21
Figura 5 –	Matriz Extracelular	22
Figura 6 –	Síntese de colágeno	23
Figura 7 –	Pele sem incidência UV e pele fotoenvelhecida	25
Figura 8 –	Fibroblasto, inibição da síntese e a degradação de colágeno	27
Figura 9 –	Síntese de elastina	28
Figura 10 –	Agentes que danificam as fibras elásticas.	29
Figura 11 –	Síntese de ácido hialurônico	30
Figura 12 –	Vias de degradação do ácido hialurônico	30
Figura 13 –	Ressecamento dos lábios devido ao uso de retinóides sistêmicos	32
Figura 14 –	Efeito do preenchimento do ácido hialurônico	33
Figura 15 –	Efeito da administração de hidroxiapatita de cálcio na pele	34
Figura 16 –	Microagulhamento e estímulo da produção de colágeno	36
Figura 17 –	Hemoaglutinação mediada por uma lectina	40
Figura 18 –	<i>Cratylia mollis</i>	41
Figura 19 –	<i>Cassia grandis</i>	42

ARTIGO 1 – ANÁLISE DA ATIVIDADE INDUTORA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO *in vitro* PELA CRAMOLL LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA

Figura 1 – Síntese de colágeno pelas células Vero após 48 horas de cultivo.	53
---	----

Figura 2 – Síntese de colágeno pelas células Vero CCL-81 após 48 e 72 horas 53
de exposição a Cramoll respectivamente.

Figura 3 – Produção de colágeno pelas células Vero após 72 horas de 55
exposição a Cramoll e a Cramoll imonilizada no gel de galactomanana.

ARTIGO 2 – COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS INDUTORES DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA PELE

Esquema – Fluxograma mostrando as etapas da pesquisa bibliográfica nas 63
bases de dados.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2 – COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS INDUTORES DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA PELE

Quadro 1 - Compostos naturais bioativos da produção de colágeno 64
cutâneo de acordo com as publicações de 2018-2022.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D HDF-XOs	Exossomos derivados de fibroblastos dérmicos humanos 2D
3D HDF-XOs	Exossomos derivados de fibroblastos dérmicos humanos 3D
AH	Ácido Hialurônico
BO	<i>Borago officinalis L.</i>
CDR	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
CL-HÁ	Esfera de ácido hialurônico
Con A	Conconavalina A
DSPC	Células-tronco/progenitoras dérmicas
EtOH ext.	Extrato etanólico do âmbar Kuji
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HcXM	Xiloglucana
HSA	Ácido hidroxiesteárico
MEC	Matriz Extra Celular
MMP	Metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PGC-1 α	Coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
RARs	Receptores do Ácido Retinóico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	MEDIUM, WITH L-GLUTAMINE, WITH
scCO ₂ ext.	Extrato fluido de dióxido de carbono dois supercrítico do âmbar Kuji
FBS	Soro Fetal Bovino
UI	Unidade Internacional
UV	Raios Ultravioleta
UVB	Raios Ultravioleta B

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Morfofisiologia da Pele	18
3.1.1	<i>Epiderme</i>	19
3.1.2	<i>Derme</i>	20
3.2	Envelhecimento da Pele	24
3.2.1	<i>Características do envelhecimento</i>	24
3.2.2	<i>Perda de colágeno</i>	26
3.2.3	<i>Perda de outros componentes celulares</i>	27
3.2.3.1	Perda das fibras elásticas	27
3.2.3.2	Perda de ácido hialurônico	29
3.3	Métodos aplicados atualmente com ação antienvelhecimento	30
3.3.1	<i>Retinoides</i>	32
3.3.2	<i>Ácido Hialurônico</i>	33
3.3.3	<i>Hidroxiapatita de Cálcio</i>	34
3.3.4	<i>Ácido ascórbico</i>	35
3.3.5	<i>Microagulhamento</i>	35
3.3.6	<i>Colágeno</i>	36
3.4	Métodos experimentais que buscam analisar atividades antienvelhecimento	37
3.5	Lectina de <i>Cratylia mollis</i>	39
3.6	Galactomanana de <i>Cassia grandis</i>	42
4.	ARTIGO 1 – ANÁLISE DA ATIVIDADE INDUTORA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO <i>in vitro</i> PELA CRAMOLL LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA	44
5.	ARTIGO 2 – COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS INDUTORES DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA PELE	60
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

REFERÊNCIAS	74
APÊNDECE A – MORFOFISIOLOGIA DA PELE E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO A CUTÂNEO	84
APÊNDECE B – PROCEDIMENTOS QUE RETARDAM O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIENVELHECIMENTO	95
ANEXO A – ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR	114
ANEXO B – PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVAS NO TRATAMENTO DO DIABETES	124
ANEXO C – EFEITO TERATOGENICO DE PLANTAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA	138

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão humano, envolve todo o corpo e é responsável por diversas atividades biológicas. Ela é dividida basicamente em duas camadas, a epiderme e a derme. A epiderme é a camada mais superficial, não possui vascularização e é nutrida pela derme. Já a derme, é a camada mais interna, possui como principal tipo celular os fibroblastos, altamente vascularizada, é a parte da pele responsável pela sustentação e preenchimento (Nguyen; Soulika, 2019; Shin *et al.*, 2019).

Os espaços entre as células da derme são preenchidos por uma Matriz Extracelular (MEC), constituída por vários componentes, como o ácido hialurônico (AH), fibras elásticas e as fibras de colágeno, todos produzidos pelos fibroblastos. Basicamente, esses componentes são responsáveis pelo preenchimento, elasticidade e firmeza da pele, além de contribuir com a troca de informações entre as células. No funcionamento fisiológico da pessoa jovem, existe a produção e a degradação desses componentes de forma controlada, com isso, a tendência é que as pessoas possuam nesse momento da vida a pele mais uniforme, sem marcas aparentes e lisa (Wohlrab *et al.*, 2015).

Com o passar da vida e o avanço da idade a MEC tende a diminuir gradativamente com a perda de seus componentes. Apesar de natural, existem diversos fatores extrínsecos que podem acelerar esse decaimento da pele. Alguns hábitos de vida como a exposição a luz solar, uso de tabaco e má alimentação, podem desencadear um processo de redução da MEC acelerado devido a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ho; Dreesen, 2021).

A procura por tratamentos estéticos que possam reverter ou retardar o envelhecimento da pele é tanta que esse mercado foi avaliado em cerca de US\$ 99,1 bilhões no ano de 2021, com previsão de crescimento de 14,5% no faturamento até 2030. No Brasil, os procedimentos não cirúrgicos mais realizados em 2018 foram o uso da toxina botulínica e o preenchimento com ácido hialurônico, ambos para a redução de rugas e flacidez, cuja administração necessita de agulhas. Com esses números, é notável que se torna altamente rentável para a indústria a busca de novas substâncias que possam ser empregadas para essas finalidades (Cui *et al.*, 2020; Fonseca; Ishida, 2019).

A *Cratylia mollis* popularmente conhecida como Feijão Camaratu é uma planta encontrada no Nordeste Brasileiro que produz uma lectina chamada de Cramoll 1,4

(Cramoll). Extraída das sementes de *C. mollis*, essa lectina possui efeitos biológicos conhecidos como imunomodulação e atividade mitogênica, evidências também mostraram que ela é capaz de induzir a produção de colágeno pelos fibroblastos durante o processo cicatricial (Nascimento *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2021; Carneiro, *et al.*, 2021).

É comum que produtos com finalidades tópicas sejam imobilizadas em géis. Essa técnica tende a facilitar a administração, permitir a liberação controlada dos compostos e aumentar o tempo de estabilidade do princípio ativo. A galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis* forma um gel matriz com capacidade imobilizadora de biomoléculas como a Cramoll e estudos anteriores demonstraram a conservação da atividade da lectina por períodos superiores a trinta dias (Albuquerque *et al.*, 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho visou analisar a atividade bioestimuladora de colágeno da Cramoll livre e imobilizada em um gel de galactomanana sobre a linhagem de células vero CCL-81.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a atividade bioestimuladora de colágeno da Cramoll livre e imobilizada em um gel de galactomanana sobre a linhagem de células vero CCL-81.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Extrair e purificar a Cramoll a partir das sementes de *Cratylia mollis*;

2.2.2 Extrair e purificar a Galactomanana a partir das sementes de *Cassia grandis*;

2.2.3 Produzir o gel de Galactomanana e imobilizar a Cramoll no gel;

2.2.4 Avaliar o potencial anti-envelhecimento da Cramoll livre e imobilizada no gel de galactomanana através da quantificação dos níveis de colágeno *in vitro*.

2.2.5 Produzir e publicar um artigo sobre a morfofisiologia da pele e o processo de envelhecimento cutâneo.

2.2.6 Produzir e publicar um artigo sobre compostos naturais bioativos indutores da produção de colágeno na pele.

2.2.7 Produzir e publicar um capítulo de livro sobre procedimentos que retardam o envelhecimento cutâneo e modelos experimentais para análise de atividade antienvelhecimento.

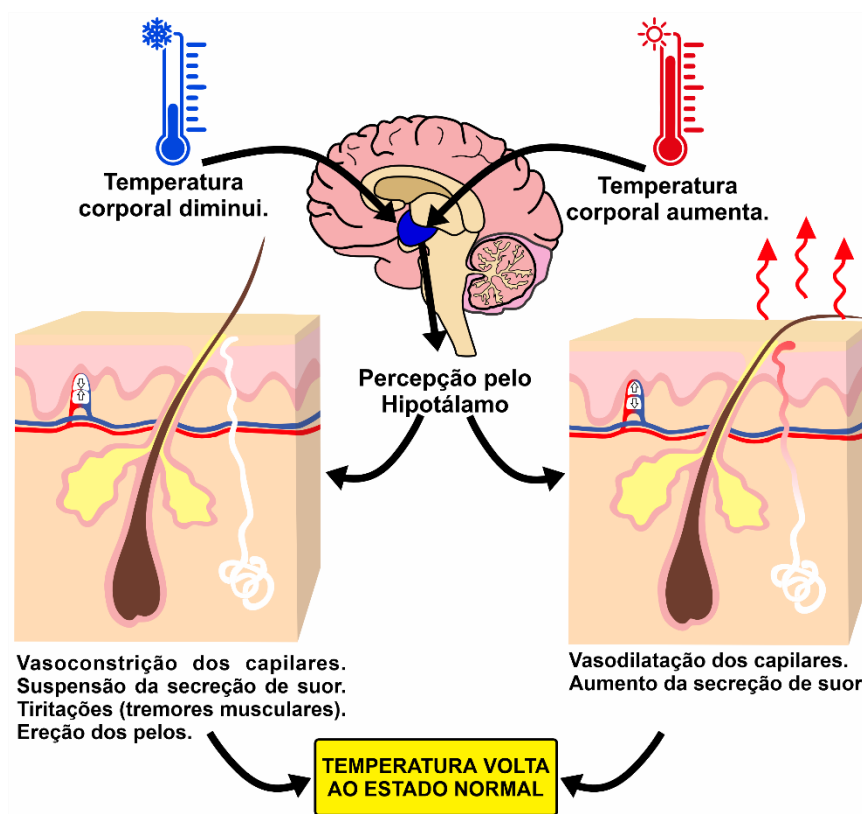
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Morfofisiologia da Pele

A pele é composta por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado. Juntamente com os seus apêndices (pelos, glândulas) e várias outras estruturas formam uma barreira responsável por proteger o organismo de fatores externos, sejam eles químicos, físicos ou biológicos. Esse grande escudo de proteção constitui cerca de 12% a 15% do peso corporal de um indivíduo e apesar de não ser sua única função, a defesa dos órgãos internos é uma característica muito importante desse tecido (Lorz *et al.*, 2019).

Além de possuir a função de defesa, a pele também desempenha um papel muito importante como regulador fisiológico do organismo. Contribui com a homeostase por ser termorreguladora, isso é, controlar a temperatura corporal através da produção de suor pelas glândulas sudoríparas e dilatação dos capilares próximos a superfície da pele quando a temperatura está alta. Para elevar a temperatura, inibe a liberação de suor, provoca vasoconstrição dos capilares para manter a temperatura sanguínea e elevação dos pelos (arrepio) para manter a camada de ar quente próxima ao corpo (Figura 1) (Wohlrab; Hilpert; Wolff, 2015).

Figura 1 – Termorregulação corporal

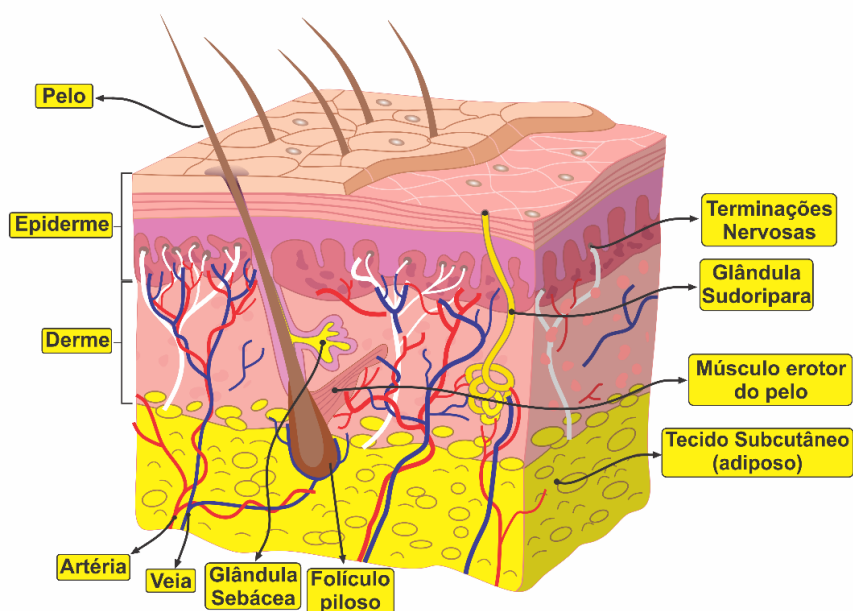


Fonte: Autoria própria (2024).

O equilíbrio hídrico do corpo também é uma função muito importante exercida pela pele, através desse, a barreira hidro lipídica impede a perda de água do corpo por evaporação. Ela é responsável ainda pela síntese de vitamina D, proteção contra os raios UV, atividades sensoriais, dentre outras inúmeras funções (Nguyen; Soulika, 2019).

Este órgão é dividido em duas camadas grandes e distintas, a epiderme, camada mais superficial e a derme, a camada mais interna que é altamente vascularizada e responsável por nutrir a epiderme. Embaixo delas está o tecido subcutâneo, a hipoderme que não é considerada parte da pele (Figura 2) (Araviiskaia *et al*, 2019).

Figura 2 – Principais estruturas da pele.



Fonte: Silva (2024).

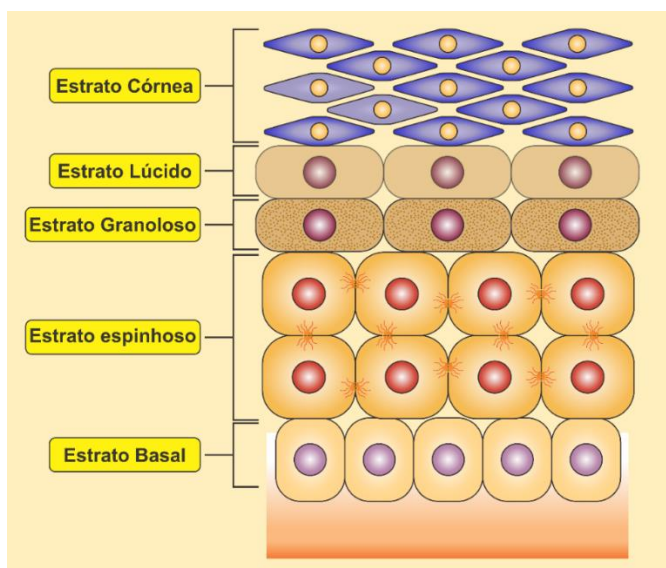
3.1.1 Epiderme

A epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, não possui vascularização e é constantemente renovado, onde as células mais superficiais (células mortas) são descamadas. Seu principal tipo celular são os queratinócitos. Porém, também são encontradas as células de Langerhans que fazem parte do sistema imune e realizam fagocitose nesse tecido. Os melanócitos são responsáveis pela coloração e fotoproteção da pele, assim como as células de Merkel que ficam na base da camada e em contato com fibras nervosas, possibilitando a percepção de sensações (Roger *et al.*, 2019).

Essa camada se divide em cinco subcamadas (estratos) e pode-se dizer que está mais bem relacionado ao tempo de vida celular, onde quanto mais superficial for o estrato, mais velhas são as células (Rittie; Fisher, 2015).

Esses estratos, do mais externo para o mais interno, são: Estrato córneo, nessa camada as células encontradas estão mortas, sem núcleo, citoplasma cheio de queratina e as células são descartadas pela descamação da pele. Estrato Lúcido é a última camada que se pode encontrar células vivas. Esses queratinócitos estão com os núcleos citoqueratinizados, as organelas estão sendo destruídas por enzimas e é a subcamada mais delgada da epiderme. Estrato granuloso, composto por células achatadas e com grânulos, secretam substâncias no meio intercelular como lipídeos que são responsáveis pela formação da barreira impermeável de compostos e água. Estrato espinhoso, onde as células se apresentam ligeiramente achatadas e possuem o núcleo centralizado, ligam-se entre elas através de desmossomos. Estrato Basal, onde as células se apresentam em formato semelhante a cubos e existe grande atividade mitótica, responsáveis pela renovação celular (Figura 3).

Figura 3 – Camadas da epiderme



Fonte: Silva (2024).

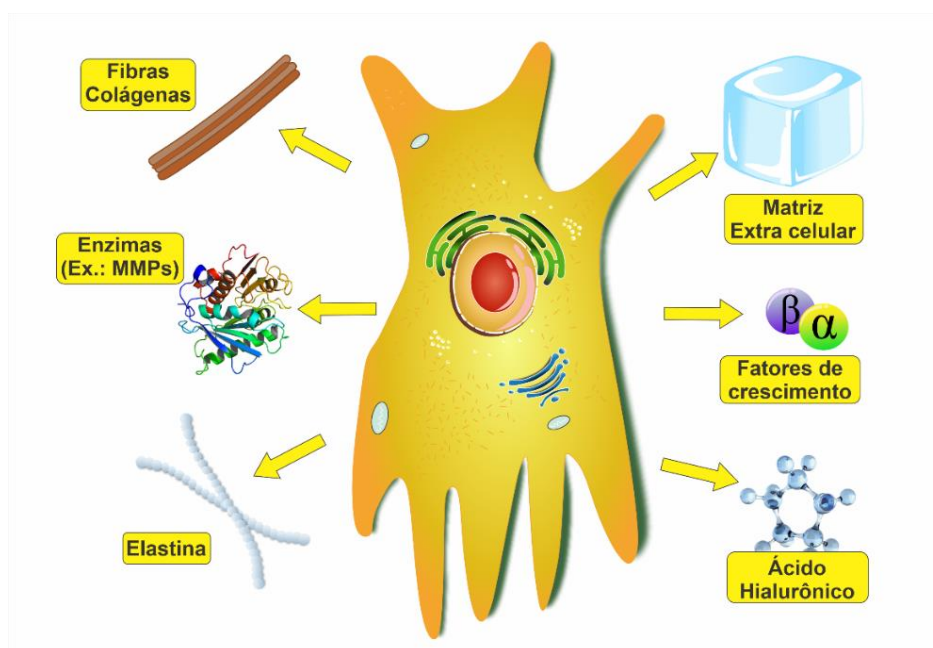
3.1.2 Derme

Formada por tecido conjuntivo é responsável por apoiar e nutrir a epiderme. É caracterizada por dar sustentação e elasticidade a pele devido a presença de fibras colágenas e elásticas na MEC, também contribui com o combate a invasão de patógenos por possuir células de defesa do sistema imune na sua composição (Roger *et al.*, 2019).

A derme se divide em camada papilar e reticular. A camada papilar é a mais externa, constituída de tecido conjuntivo frouxo, é mais delgada e altamente vascularizada, possui as papilas dérmicas e colágeno. Já a derme reticular é a maior parte da derme, fica abaixo das papilas dérmicas e é mais densa devido a maior presença de fibras de colágeno (Losquadro, 2017).

O principal tipo celular e o mais abundante existente na derme é o fibroblasto. Ele é responsável pela produção das fibras colágenas, elásticas e ácido hialurônico, para a composição da MEC. São eles que fazem toda a manutenção da matriz e controlam o volume de fibras mantendo a integridade do tecido. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que permitem comunicações intercelulares e quando existem ferimentos na pele, eles migram para o tecido lesionado para auxiliar na cicatrização (Figura 4) (Laing *et al*, 2020).

Figura 4 – Fibroblasto e suas funções.



Fonte: Autoria própria (2024).

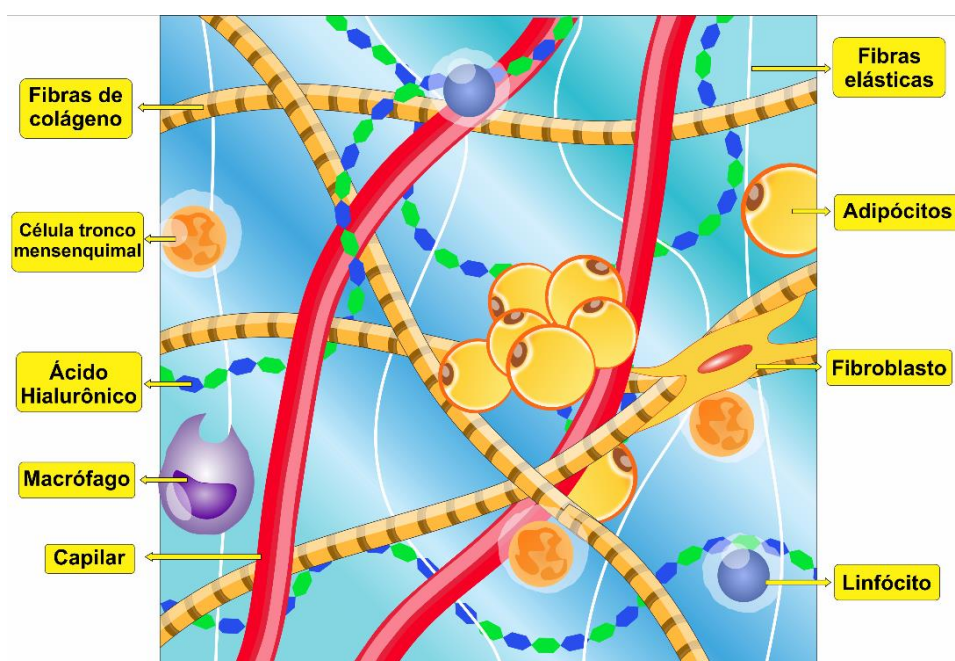
Os fibroblastos são essenciais para o funcionamento normal da pele, participando de diversos processos metabólicos, produzindo enzimas como as MMPs e assim degradando fibras de colágenos produzidas por eles mesmos, mantendo uma homeostase no ambiente. (Shin *et al.*, 2019).

Além dos fibroblastos, outras células se encontram presentes na derme, como os macrófagos, mastócitos e células dendríticas. Os macrófagos são as células fagocitárias do sistema imune. Os mastócitos são os responsáveis por ativação de

ações inflamatórias, ativação das células do sistema imune e regulação do fluxo sanguíneo capilar, através da liberação de diversas substâncias como citocinas, histamina, prostaglandinas entre outras. As células dendríticas são responsáveis pela apresentação dos antígenos desempenhando importante papel na defesa do organismo (Oliveira *et al.*, 2013).

A MEC compreende grande parte desse tecido e desempenha várias funções importantes que caracterizam a derme. Essa matriz forma uma grande malha de conectividade entre as células, composta principalmente por fibras de colágeno e fibras elásticas (Figura 5). As fibras de colágeno são responsáveis principalmente pela sustentação do tecido, enquanto as fibras elásticas, juntamente com as colágenas, garantem a elasticidade da pele. Além das fibras, ela também possui os vasos sanguíneos, terminações nervosas e receptores sensoriais (Cole *et al.*, 2018).

Figura 5 – Matriz extracelular.

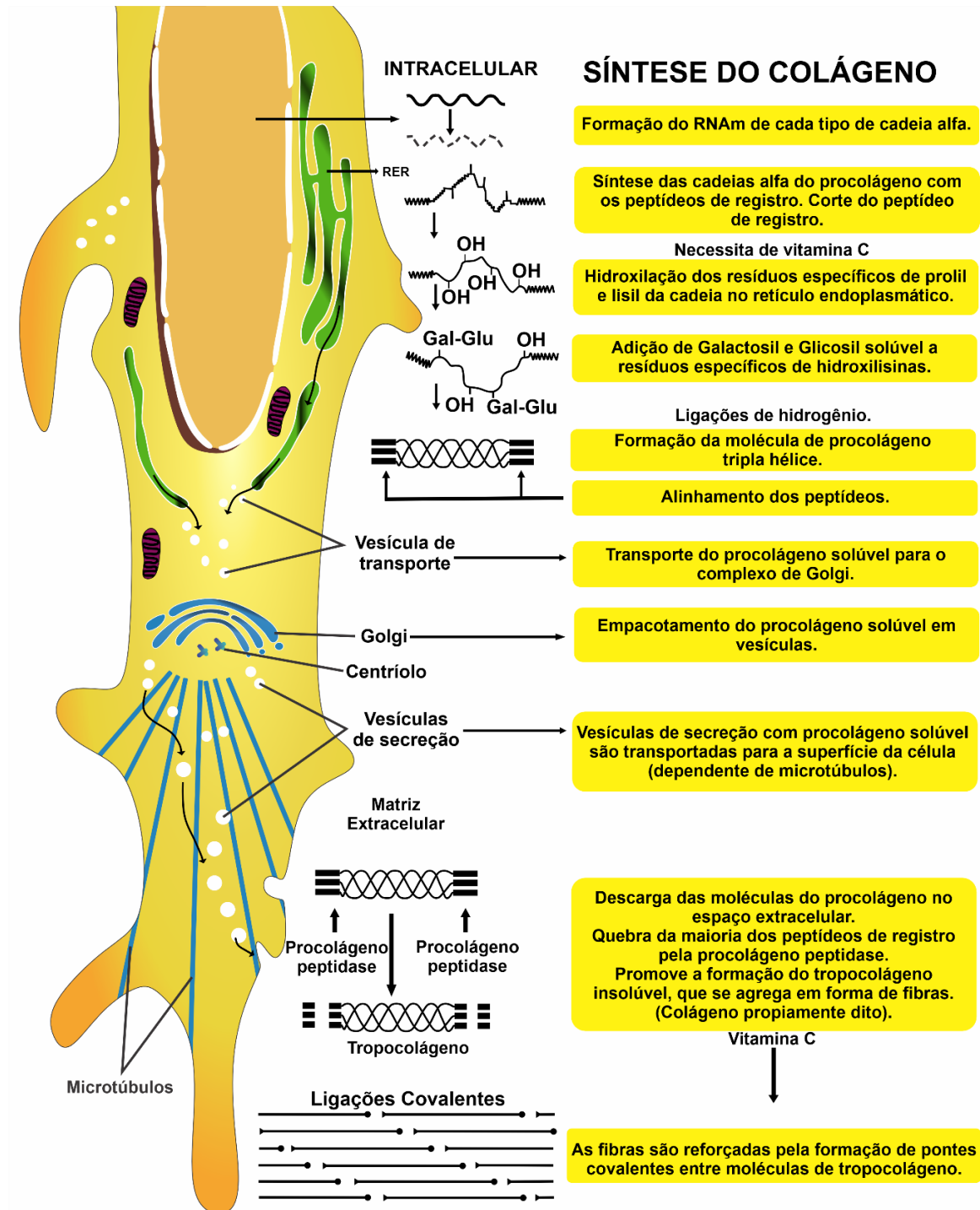


Fonte: Silva (2024).

O colágeno é a proteína mais presente na MEC, onde está em formas de fibras em uma conformação de tripla-hélice de vários colágenos ligados uns aos outros. Ele é formado principalmente pelos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina, hidroxilisina. Basicamente na sua formação, acontece a liberação do RNAm para os ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, com a tradução do gene, acontece a formação do pré-pro-colágeno (apenas a fita de aminoácidos) e depois procolágeno (fitas em tripla-hélice), essa molécula de colágeno é conhecida como colágeno solúvel devido as suas terminações. Posteriormente é liberada no meio extracelular e uma

enzima chamada procólágeno peptidase cliva as suas terminações, com isso temos a formação do tropocolágeno (colágeno propriamente dito), posteriormente, as moléculas se agregam em forma de fibrilas (Figura 6) (Junqueira; Carneiro, 2012).

Figura 6 – Síntese de colágeno.



Fonte: Silva (2024).

3.2 Envelhecimento da Pele

3.2.1 Características do Envelhecimento

O envelhecimento é um fator cronológico que acontece de forma natural com os indivíduos. Basicamente é um processo que consiste na perda de funcionalidade das células e dos tecidos. A forma como se dá depende de muitos fatores, de certo modo a idade biológica é comum para todos, porém a forma como o corpo responde com o passar do tempo é diretamente ligada à individualidade. Tanto de forma genética, quanto a forma de vida adotada (Shin *et al.*, 2019).

Se tratando de fatores genéticos, é difícil conseguir fugir destas características, pois é comum que com o tempo elas se expressem. Mas, os fatores do dia a dia, a exposição a agentes que acelerem o envelhecimento como luz solar, má alimentação, cigarro etc, são fatores evitáveis que estão relacionados diretamente ao aceleração do envelhecimento, ou seja, quanto maior a exposição, mais rápido é o decaimento (Ho; Dreesen, 2021).

Outro fator muito marcante no processo do envelhecimento são as variações hormonais que afetam a maioria dos órgãos do corpo humano. Com a redução de hormônios importantes é perdido várias funcionalidades, como a menor produção da melatonina que causa alteração do ciclo circadiano, consequentemente perda de sono e alteração do estado de alerta. Logo provoca estresse oxidativo pela formação de ROS e ativação das MMPs (Csekes; Racková, 2021).

Os hormônios sexuais, como o estrogênio, quando em níveis baixos provocam uma redução significativa no número de vasos sanguíneos na derme, redução da produção de colágeno e aumento de sua degradação. O hormônio do crescimento, também tem influência direta no envelhecimento da pele, que quando reduzido, promove perda de massa muscular e fraqueza (Lubov; Kemp, 2022).

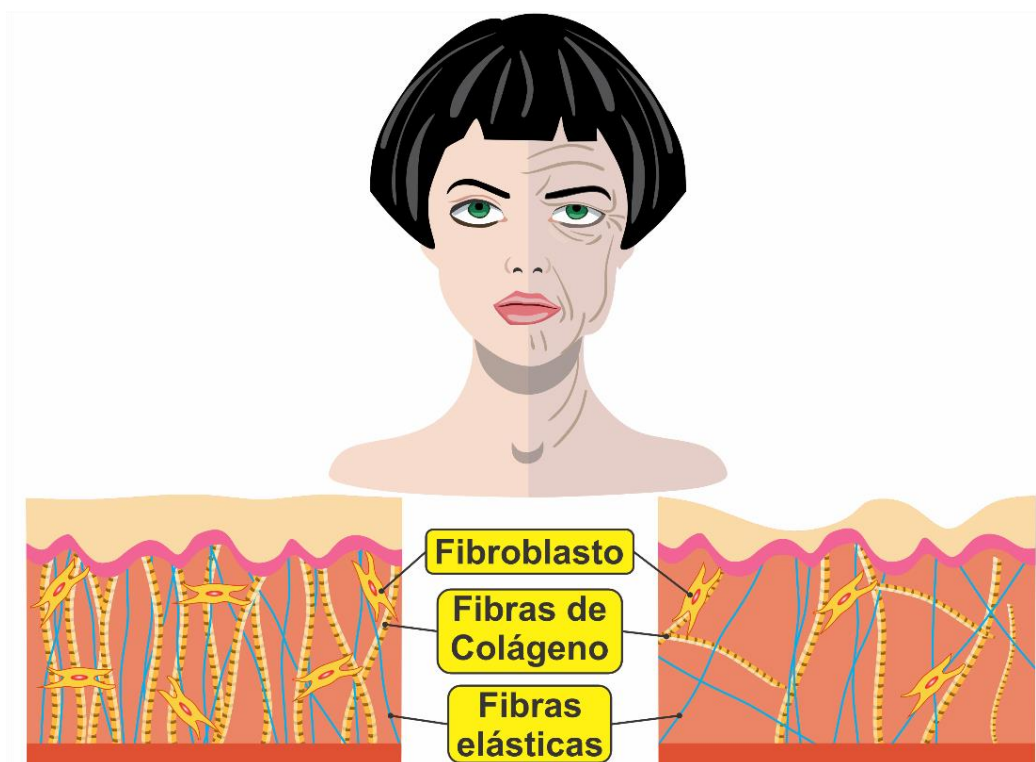
Entre todos os tecidos, a pele estar exposta aos fatores externos que aceleram esse processo, proteger os outros órgãos e não permitir que sofram as alterações exógenas do envelhecimento (Csekes; Racková, 2021).

Entre os vilões do envelhecimento precoce da pele, destaca-se os raios solares como um dos principais agentes externos que provocam as degradações das fibras de colágeno. A luz solar traz benefícios para o organismo, como a produção de Vitamina D e prevenção de algumas doenças, porém, o seu excesso no dia a dia, pode trazer prejuízos a saúde como câncer e fotoenvelhecimento (Cole *et al.*, 2018).

O fotoenvelhecimento da pele é provocado pelos raios UV, que trazem diversos problemas para esse tecido como, por exemplo, o aparecimento de manchas, rugas e flacidez (Figura 7). As rugas e a flacidez acontecem principalmente pela perda de colágeno na matriz extracelular e o grau de envelhecimento é medido por uma escala muito utilizada na área da harmonização facial, a classificação de GLOGLAU (Alam *et al.*, 2018).

Figura 7 – Pele sem incidência UV e pele fotoenvelhecida.

Desorganização da matriz extracelular devido à grande perda de fibras.



Fonte: Autoria própria (2024).

A classificação de GLOGLAU classifica o envelhecimento em 4 graus, de acordo com a idade e relaciona as alterações aparentes na pele. No grau I estão as pessoas entre 20 e 30 anos normalmente sem rugas ou com linhas mínimas, algumas alterações pigmentares leves, mas considerado precoce. No grau II considerado moderado (pessoas entre 30 e 40 anos) há o surgimento de algumas queratoses discretas (alterações na coloração da pele), linhas de expressão paralelas ao sorriso, aparecimento de rugas principalmente ao sorrir. O grau III normalmente acontece com pessoas entre 50-60 anos e as rugas são visíveis mesmo com a pele relaxada, existem manchas (lentigos senis) e a presença de queratoses (vasos visíveis). Já o último, o grau IV acomete normalmente pessoas acima dos 60 anos onde a pele já se

apresenta enrugada, flácida devido à diminuição da derme e aumento da espessura da camada córnea, o que leva a uma pele acinzentada. Também é comum o aparecimento de lesões que podem se tornar cancerígenas (Özkoca; Aşkin; Engin, 2021).

3.2.2 Perda de colágeno

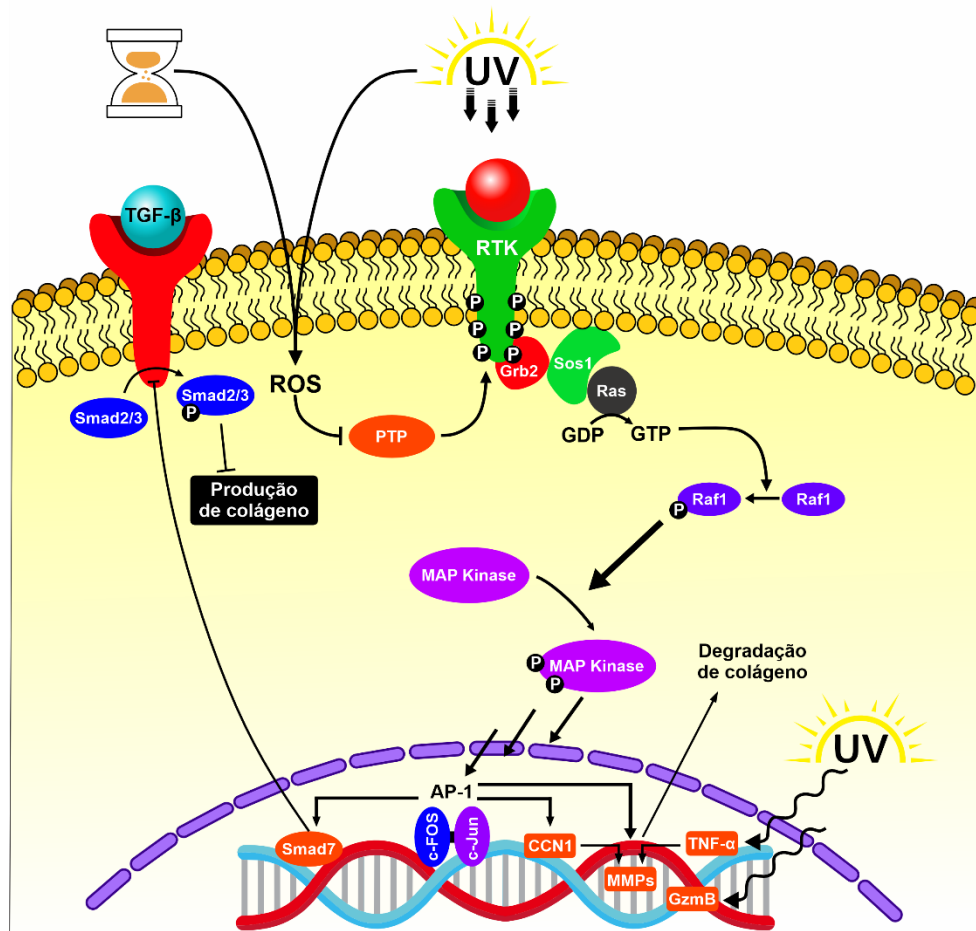
Com o passar dos anos a produção de colágeno tende a diminuir naturalmente. Como já mencionado, além da fisiologia comum do envelhecimento (redução da produção e aumento na degradação) o colágeno tende a diminuir também devido a fatores externos. Isso acontece porque esses hábitos levam a produção de radicais livres, o que provoca uma cascata de ativação de MMP e inibição da sinalização do fator de transformação de crescimento β (TGF- β), consequentemente uma redução da produção de colágeno pelos fibroblastos (Lubov; Kemp, 2022).

As metaloproteinases são uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular. Existem diversos tipos e desempenham diversas atividades fisiológicas diferentes. As metaloproteinases que degradam o colágeno (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são denominadas de collagenases, elas clivam a tripla-hélice das fibras de colágeno desestruturando a matriz extracelular. Normalmente, esse processo ocorre de forma controlada, faz parte do processo fisiológico, o desequilíbrio ocorre com o passar da idade e com a exposição aos fatores determinantes (Figura 8) (Cole *et al.*, 2018).

Existem vários componentes da MEC que sofrem alterações durante o processo do envelhecimento, como por exemplo, as fibras elásticas, os glicosaminoglicanos (o ácido hialurônico) entre vários outros. Porém, o colágeno, como principal componente da MEC merece uma atenção especial, pois além de estar presente em maior quantidade, é uma proteína funcional que interage com a maioria dos outros componentes (Suzuki *et al.*, 2019).

A redução dessa proteína tão importante na pele leva a uma perda perceptível da matriz extracelular. Com isso, ocorre a redução dos espaços preenchidos e então tornam-se aparentes as rugas e a flacidez da pele. Com a exposição a fatores externos ao corpo, esse processo se acelera e a tendência é que a pele se mostre aparentemente mais velha do que já é (Bolke *et al.*, 2019).

Figura 8 – Fibroblasto, inibição da síntese e a degradação de colágeno.



Fonte: Autoria própria (2024).

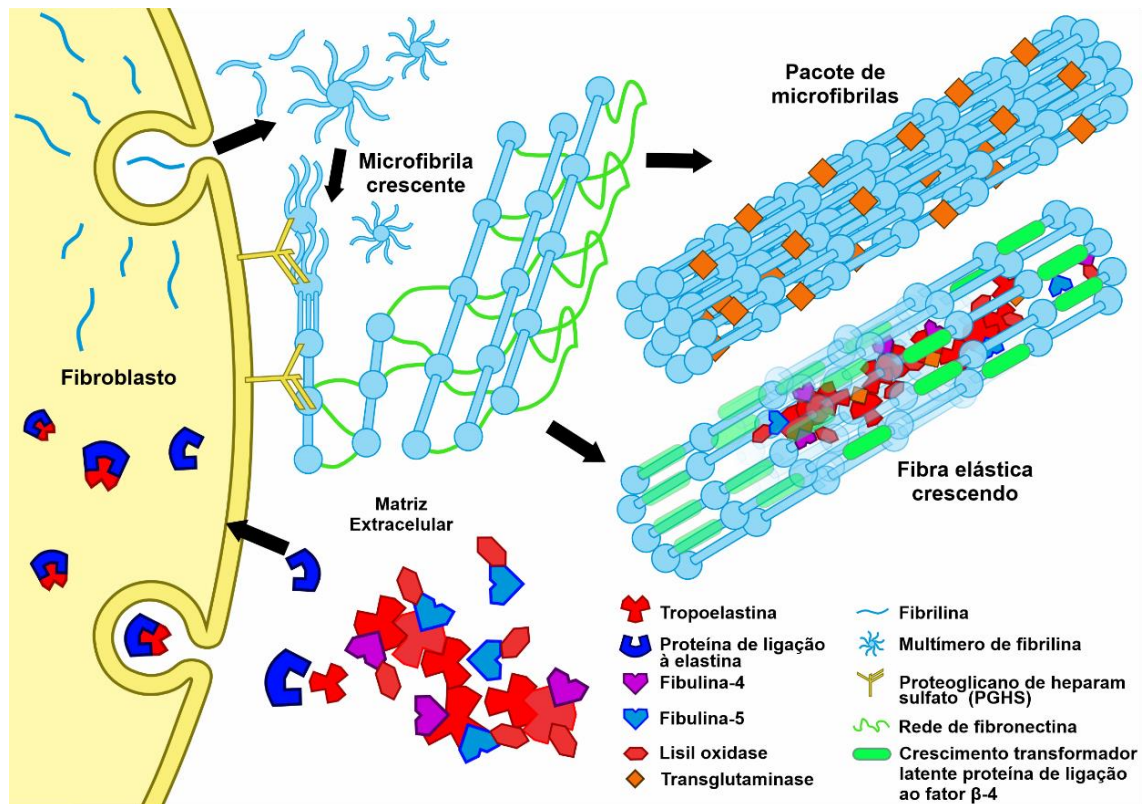
3.2.3 Perda de outros componentes celulares:

3.2.3.1 Perda das fibras elásticas

As fibras elásticas são componentes extracelulares presentes em diversos tecidos. Possuem a função de dar elasticidade e retração aos órgãos como os pulmões, os vasos sanguíneos e a pele. São extremamente duráveis, compostas por um invólucro de microfibrilas ricas em fibrilina e um núcleo de elastina que é correspondente a aproximadamente 90% das fibras maduras (Heinz, 2021).

Antes da formação das fibras elásticas maduras definitivamente, existem dois processos distintos, de forma sucinta, um é a formação das microfibrilas através da multimerização das moléculas de fibrilina liberadas na MEC e formação de uma rede fibrilar com depósito de fibronectina. O outro é a liberação da tropoelastina na MEC e a sua deposição na rede fibrilar, onde são alinhadas e reticuladas formando as fibras elásticas propriamente ditas (Figura 9) (Schmelzer *et al.*, 2022).

Figura 9 – Síntese de elastina



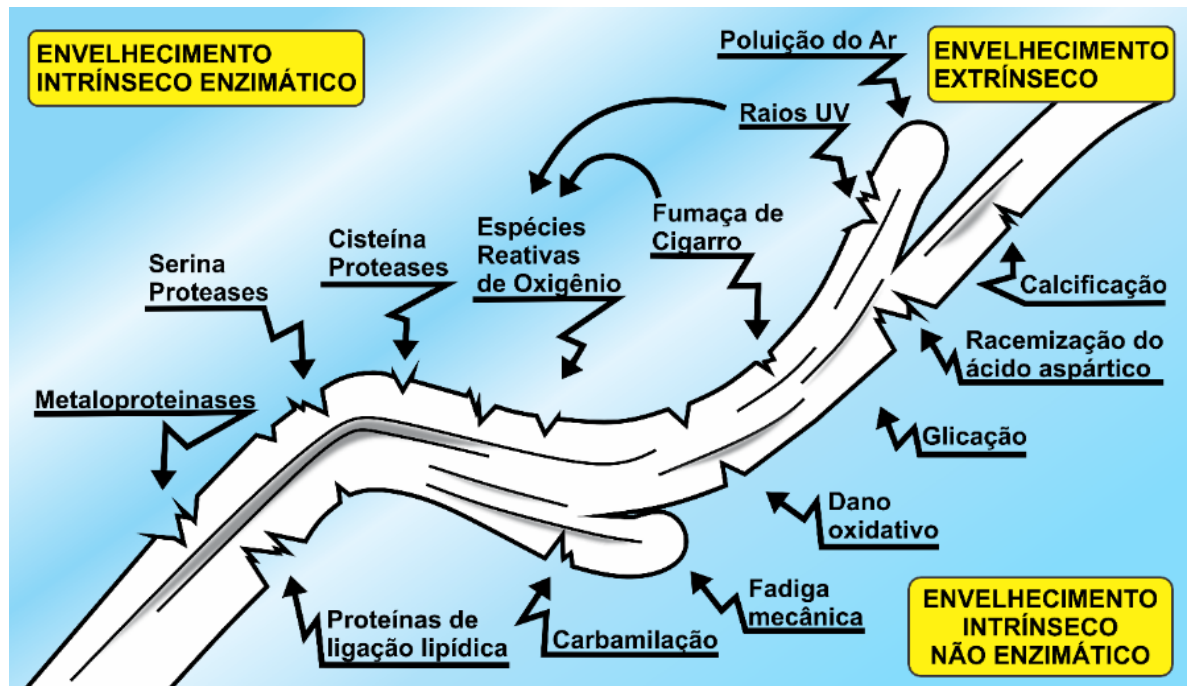
Fonte: Silva (2024).

Essas fibras passam por diversos estresses de agentes distintos que podem prejudicar as suas estruturas ou inativá-las, porém não são substituídas e permanecem no tecido mesmo danificadas ou inativadas devido ao seu baixo turnover. Se tratando da pele, esses danos fazem com que o tecido perda a elasticidade provocando flacidez (Heinz, 2021).

Existem diversos agentes que causam o envelhecimento e perda das fibras elásticas. Esses também são classificados como intrínsecos e extrínsecos, sendo os intrínsecos os fatores genéticos que aparecem com o tempo e é individual. Já os extrínsecos, são os quais o indivíduo é exposto no decorrer da vida, como a radiação UV, o tabagismo e a poluição. Esses fatores se somam e potencializam os danos a essas fibras (Schmelzer *et al.*, 2022).

Os fatores que danificam as fibras elásticas provocam diversos mecanismos distintos, como degradação enzimática, calcificação, ligação lipídica, fadiga mecânica, entre outros. Com o avançar da idade, os danos se tornam acentuados, pois são cumulativos, e além de serem muitos, não acontecem reparos as fibras. Mesmo indivíduos com estilos de vida saudáveis não estão isentos de sofrerem os danos desses agentes (Figura 10) (Robert *et al.*, 2008).

Figura 10 – Agentes que danificam as fibras elásticas.



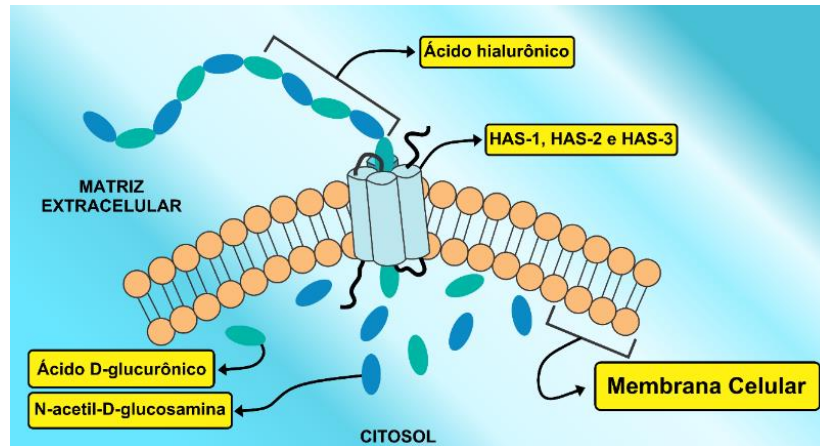
Fonte: Silva (2024).

3.2.3.2 Perda do ácido hialurônico (AH)

O AH é um polímero natural pertencente a classe dos glicosaminoglicanos, tem estrutura simples formado por unidades dissacarídicas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina ligados através de ligações glicosídicas. É um composto de caráter polar e através dessa característica desempenha sua principal função na pele, que é reter moléculas de água ao seu redor, controlando a hidratação da pele. Cada molécula tem a capacidade de conter até dez mil vezes seu peso em moléculas de água (Scarano *et al*, 2020).

Esse polímero é sintetizado por diversas células, porém as principais são as células mesenquimais. A formação acontece na membrana plasmática pelas proteínas hialuronanas sintases (HAS-1, HAS-2 e HAS-3), que ligam o ácido D-glucurônico e o N-acetil-D-glucosamina repetidamente para a formação de uma grande molécula. Uma característica interessante é que o AH é sintetizado e excretado simultaneamente como mostra a figura 11 (Marinho; Nunes; Reis, 2021).

Figura 11 – Síntese de ácido hialurônico

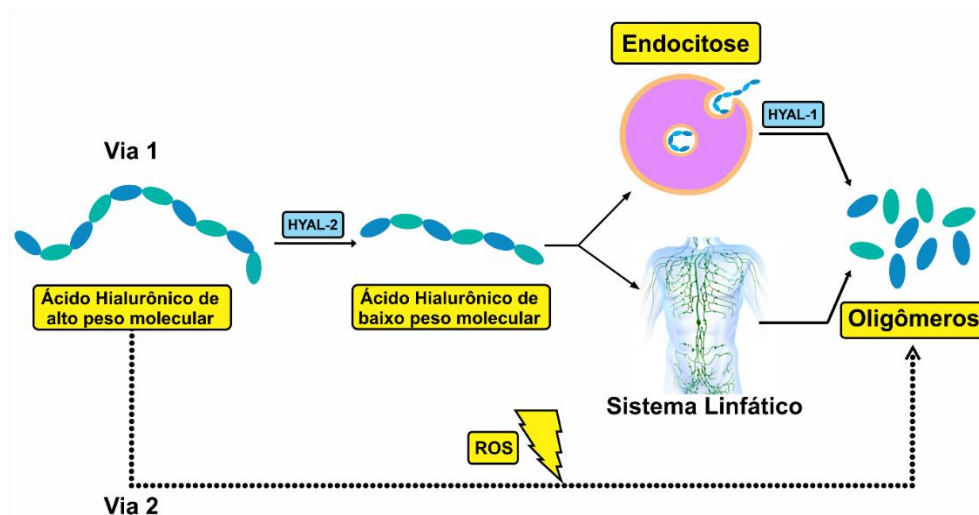


Fonte: Autoria própria (2024).

A degradação de AH também é um processo fisiológico comum que acontece para controle da homeostase do organismo. Aproximadamente aos 25 anos de idade iniciasse um processo de decaimento acelerado das concentrações de AH na MEC, através de processos endógenos comuns, mas também por fatores exógenos como os raios UV, má alimentação e poluição (Scarano *et al*, 2020).

Existem dois mecanismos que levam a degradação do AH, um é mediado por enzimas específicas, as hialuronidases (HYALs) que clivam as ligações glicosídicas fragmentando as moléculas e permitindo que sejam fagocitadas. O outro é através do estresse oxidativo que leva a formação de ROS, o segundo é potencializado através dos estímulos exógenos como os raios UV (Figura 12). Essa degradação leva a uma perda de preenchimento na MEC, desidratação do tecido e consequentemente formação das rugas (Marinho; Nunes; Reis, 2021).

Figura 12 – Vias de degradação do ácido hialurônico



Fonte: Autoria própria (2024).

3.3 Métodos aplicados atualmente com ação antienvelhecimento

Com o aumento da valorização da aparência pela sociedade como um todo, tem-se buscado cada vez mais procedimentos e substâncias que retardem o envelhecimento da pele. A utilização de processos mecânicos, como o microagulhamento, e de bioestimuladores de colágeno, como a hidroxiapatita de cálcio, são exemplos de procedimentos que induzem a produção de colágeno e logo retardam ou reverterem a flacidez da pele (Zouboulis *et al.*, 2019).

A busca por produtos antienvelhecimento da pele tendem a focar principalmente no colágeno. Vendo que após o início do envelhecimento existe um ciclo de destruição das fibras de colágeno, é possível observar alguns mecanismos de ação possíveis para futuros produtos voltados a retardar o envelhecimento (Dayan *et al.*, 2019).

Uma das possibilidades é a busca de agentes que inibam as enzimas degradadoras de colágeno, as metaloproteinases MMP-1, MMP-8 e MMP-13 (colagenases). Essa inibição faria com que essas enzimas ficassem impedidas de degradar as fibras de colágeno existentes, logo a pele permaneceria com os espaços da MEC bem preenchidos. Porém, esse mecanismo não levaria em consideração a renovação dos componentes da matriz extracelular, e se os fibroblastos pararem ou reduzirem a liberação de colágeno, com o passar do tempo a pele continuará envelhecendo por falta de renovação (Shin *et al.*, 2019).

Outra opção, seria inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou degradá-las, como a vitamina C atua. Com isso, existiria uma redução da formação de MMPs e logo uma menor degradação das fibras de colágeno. Porém, inibir a produção das ROS se torna algo muito improvável, levando em consideração que vários mecanismos celulares liberam essas espécies e que ações intrínsecas ao corpo promovem a formação dessas espécies, como já mencionado os hábitos alimentares e a própria exposição aos raios solares por exemplo (Boo, 2022).

Atualmente, sabe-se que um fator muito importante para a estimulação da produção de colágeno pelos fibroblastos é a indução da inflamação na região. Essa indução controlada faz com que os fibroblastos voltem a sua atividade normal e comecem a sintetizar colágeno (Taub; Pham, 2018).

Fica claro que entre as possibilidades de mecanismos, a indução da reativação da produção do colágeno pelos fibroblastos que reduziram sua produção seria a ideal. Essa indução faz com que os espaços intercelulares sejam novamente preenchidos e

que a ligação entre os fibroblastos e a MEC seja retomada. Ao chegar a esse ponto, as ROS são reduzidas e logo não poderão induzir a produção das MMPs, consequentemente a degradação do colágeno é reduzida. Sendo assim, o ciclo de degradação consegue ser retardado e o processo do envelhecimento também (Shin *et al.*, 2019).

3.3.1 Retinóides

Existem vários produtos utilizados como agentes antienvelhecimento, com diversos mecanismos de ação. Os retinóides, são a vitamina A e seus derivados, normalmente são utilizados para o tratamento da acne, manchas e rugas. De forma geral, para o tratamento de rugas esses medicamentos atuam através de receptores do ácido retinóico (RARs) e receptores X (RXRs) e acabam aumentando a quantidade de procolágeno e consequentemente colágeno do tipo I, III e VII, e além de estimular a produção, eles também contribuem para a organização das fibras colágenas (Shin *et al.*, 2019).

A principal utilização dessas substâncias é para o tratamento de acne. A isotretinoína, o medicamento mais famoso dessa classe é utilizado com muita frequência para a redução da oleosidade da pele e consequentemente o fim das acnes. Possui uma grande efetividade e atua basicamente provocando uma descamação da camada córnea, afinando a pele e atrofiando as glândulas sebáceas, impedindo a produção de oleosidade (Fallah; Rademaker, 2020).

Porém, esses produtos apresentam efeitos colaterais bem incômodos. A isotretinoína por exemplo, devido seu efeito sistêmico, provoca um ressecamento em toda a pele, os lábios ressecam, aparecem rachaduras e podem apresentar sangramentos (Figura 13). A pele fica sensível ao sol, podendo os usuários apresentarem irritações, além disso, existem várias evidências de casos de depressão relacionados ao uso (Huang; Cheng, 2017).

Figura 13 – Ressecamento dos lábios devido ao uso de retinóides sistêmicos



Fonte: Adaptado de Oliveira (2021).

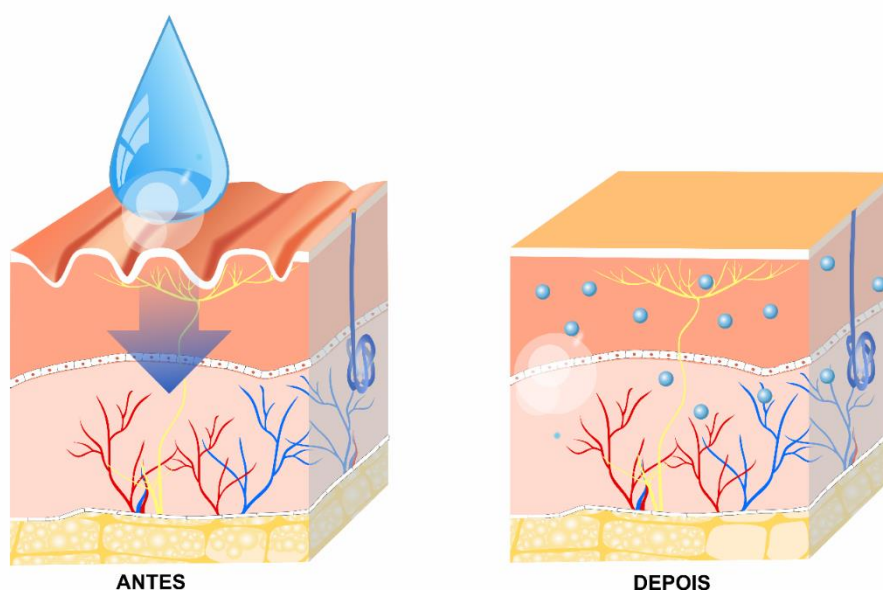
Já um dos efeitos colaterais mais graves acontece em mulheres que fazem uso desses produtos na gestação, pois podem provocar abortos espontâneos além de teratogênias graves aos bebês. Por esse motivo, retinóides de uso sistêmico fazem parte das substâncias de controle especial e existe todo um protocolo estabelecido por lei para que se autorize a utilização dessas substâncias (Alvarenga, 2015).

3.3.2 Ácido Hialurônico

Outra estratégia antienvhecimento bastante utilizada é o preenchimento, que consiste em utilizar um produto, por exemplo o AH para preencher os espaços da MEC, o que leva a uma interação melhorada entre os fibroblastos e a MEC, consequentemente uma redução das ROS e logo redução da degradação de colágeno pelas MMPs. Além disso, o AH induz a produção de colágeno pelos fibroblastos através da via de sinalização TGF- γ (Scarano *et al*, 2020).

O AH é um glicosaminoglicano, polissacarídeos de preenchimento da matriz extracelular de vários tecidos, e que também está presente na derme, sofre redução com aumento da idade e sua ausência também contribui para o aparecimento de rugas. Essa molécula consegue reter uma grande quantidade de moléculas de água, mantém a região preenchida e a pele bem hidratada (Figura 14). O preenchimento com o gel de AH na pele se dá de forma invasiva por administração com agulhas diretamente na derme. Essa tem sido a forma mais efetiva encontrada até o momento (Cui *et al.*, 2020).

Figura 14 – Efeito do preenchimento do ácido hialurônico



Fonte: Silva (2024).

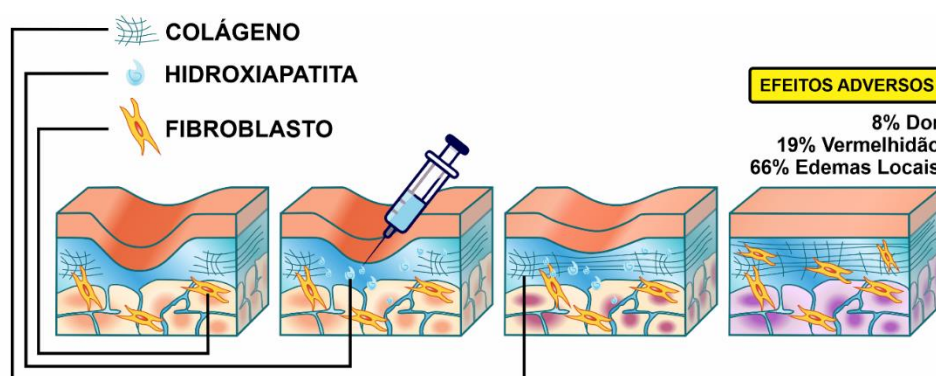
Porém, existem alguns cosméticos que utilizam outras formas de administração, mas essa molécula é administrada em forma de sal, o hialuronato de sódio. Quando o sal tem baixo peso molecular como no caso do Oligo AH ele consegue penetrar com maior facilidade e chegar à derme. Já quando tem um peso molecular elevado só penetra a primeira camada da pele, absorve grande quantidade de água e dá um preenchimento temporário de algumas horas. Um exemplo de utilização desse tipo de AH é a utilização em gloss ou batons que dão um inchaço temporário aos lábios (Wohlrab; Hilpert; Wolff, 2015; Dayan *et al*, 2019).

3.3.3 Hidroxiapatita de cálcio

Os bioestimuladores de colágeno são também produtos utilizados com a finalidade antienvelhecimento que tem uma ótima aceitação comercial. Entre esses produtos, destaca-se a hidroxiapatita de cálcio como um dos mais utilizados. Consiste em uma molécula sintética biocompatível composta por fosfato de cálcio cristalino, são pequenas esferas que possuem a capacidade de serem biodegradáveis com o tempo (Csekes; Racková, 2021).

Logo após a administração essa substância provoca um preenchimento imediato e momentâneo da região da aplicação, removendo assim as rugas. Devido a uma reação inflamatória provocada de forma controlada, os fibroblastos se dirigem a região da aplicação e são estimulados a produzir colágeno tipo I e III. Com o passar do tempo essas esferas começam a ser degradadas e fagocitadas lentamente. Ao mesmo tempo o colágeno tipo I vai sendo produzido e substituindo o espaço dessas esferas no tecido (Figura 15). Esse processo é lento, inicia-se dentro de um mês e pode durar até um ano, já os efeitos da aplicação, podem ter uma durabilidade de três anos (Wohlrab; Hilpert; Wolff, 2015).

Figura 15 – Efeito da administração de hidroxiapatita de cálcio na pele.



Fonte: Silva (2024).

Esses bioestimuladores são normalmente seguros, e raramente apresentam efeitos adversos graves. No caso da hidroxiapatita de cálcio são comuns edemas e pequenas manchas pós aplicação, mas que desaparecem em alguns dias. Pode acontecer a formação de granulomas na região da aplicação devido à má aplicação e eles podem ser revertidos com massagem (Dayan *et al.*, 2019).

3.3.4 Ácido ascórbico

Uma substância que tem um papel essencial na síntese do colágeno é o ácido ascórbico (Vitamina C), uma molécula natural importante na promoção da bioestimulação do colágeno pelos fibroblastos. Ele é um excelente antioxidante, impede a oxidação de duas enzimas precursoras do colágeno, a prolil e a lisil hidroxilase, duas enzimas férricas que oxidam facilmente na ausência da vitamina C. Além de contribuir com essa síntese, contribui também na desativação de espécies reativas de oxigênio, provocando a sua redução e logo uma redução na formação das MMPs (Gref *et al.*, 2020).

Existem vários cosméticos a base de vitamina C no mercado que tem um foco especial a pele. Como a biodisponibilidade do ácido ascórbico na pele não é efetiva quando ele é administrado por via oral, os produtos voltados para essa finalidade são normalmente tópicos. Um problema enfrentado para essa administração é a permeabilidade da Vitamina C à camada córnea, devido a sua baixa lipofilicidade, o que faz com que esse composto tenha que ser conjugado com agentes lipofílicos para facilitar a passagem por essa barreira (Boo, 2022).

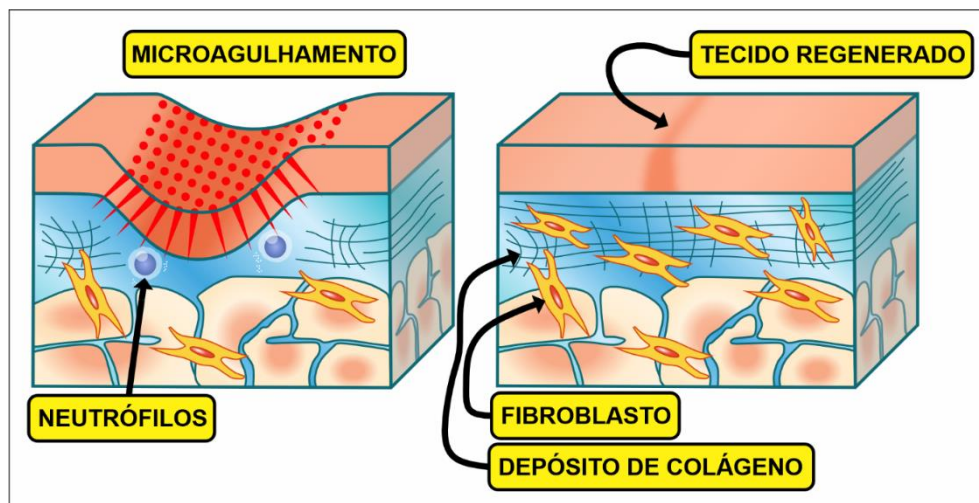
Além da dificuldade de permeabilidade, a vitamina C apresenta uma instabilidade em condições normais de temperatura e ambiente muito grande. Existe todo um cuidado e cautela com os produtos cosméticos a base desse produto e ainda assim, muitos podem perder a qualidade devido às más condições de armazenamento (Dayan *et al.*, 2019).

3.3.5 Microagulhamento

O microagulhamento ou indução percutânea de colágeno é uma técnica simples que busca provocar pequenos furos (lesões) com várias agulhas para estimular a inflamação e consequentemente a produção de colágeno e elastina pelos fibroblastos de forma natural (Figura 16). É uma técnica minimamente invasiva que apresenta ótimos resultados, provoca a redução das rugas, da flacidez da pele, estrias e até melasmas. Essa técnica pode ser associada ao uso de alguns cosméticos após

as microperfurações, como por exemplo a vitamina C e assim potencializar o estímulo (Albano; Pereira; Assis, 2018).

Figura 16 – Microagulhamento e estímulo da produção de colágeno.



Fonte: Silva (2024).

O estímulo de produção ocorre por essas micro-lesões provocarem a liberação de citocinas, fatores de crescimento e neutrófilos, que por sua vez sinalizam e estimulam os fibroblastos a migrarem e iniciarem a produção das fibras elásticas e de colágeno na região lesionada. No início a produção de colágeno é principalmente do tipo III e em menor quantidade tipo I, essa conformação dura alguns meses até um processo de remodelação do tecido, onde o colágeno tipo III é convertido no tipo I e esse permanece por vários anos (Albano; Pereira; Assis, 2018).

Sendo realizado por profissionais qualificados existem poucos riscos. Mesmo assim ainda pode provocar o surgimento de queloides, infecções, irritações e sangramento. Porém, esses efeitos estão associados a má realização do procedimento (Zouboulis *et al.*, 2019).

3.3.6 Colágeno

Além de vários produtos voltados a produção ou estímulo da produção de colágeno, existe ainda também o próprio colágeno, que é comercializado em diversas formas e que não são voltados especificamente para a pele, mas que também contribuem para o depósito de colágeno na MEC. Entre esses produtos, alguns se apresentam com as moléculas de colágeno inteiras e outras com as moléculas de colágeno fragmentadas, ditos peptídeos de colágeno, para isso, é realizada uma reação de hidrólise da molécula para que aconteça a quebra dos peptídeos,

resultando no famoso colágeno hidrolisado. As diferentes formas de apresentação modificam apenas o tempo de absorção, onde o colágeno hidrolisado será absorvido mais rapidamente do que os produtos que apresentam a molécula de colágeno inteira (Porfirio; Fanaro, 2016).

O colágeno administrado por via oral é considerado um nutracêutico seguro, sua suplementação principalmente para idosos é muito bem recomendada, pois contribui para uma revitalização da pele, o fortalecimento das cartilagens e prevenção da osteoporose ou da sua progressão, doença essa que atinge principalmente a população mais idosa (Zouboulis *et al.*, 2019).

Uma das desvantagens da administração oral do colágeno é que a sua molécula não é absorvida inteira, antes que aconteça a absorção, quando não hidrolisado, ela precisa ser hidrolisada e esse processo ocorre quase que por completo no duodeno e no jejuno pelo suco pancreático, viram pequenos peptídeos ou aminoácidos. Depois de absorvidos essas substâncias são distribuídas para diversas reações, uma quantidade infinitesimal pode ser direcionada para a formação de colágeno, o restante se perde em outras reações ou são excretadas (Porfirio; Fanaro, 2016).

3.4 Métodos experimentais que buscam analisar atividades antienvhecimento

Na ciência, existem diversos métodos experimentais para a realização de testes sobre eficácia de fármacos. Sabe-se que nada substitui os testes realizados diretamente no ser humano, porém para esses testes são levantadas diversas questões éticas devido à possibilidade de que substâncias desconhecidas podem levar ao surgimento de sequelas graves e até a morte (Williams, 2006). Por isso, antes das testagens em humanos, são buscadas possibilidades de estudos em outras formas e modelos semelhantes, que possam trazer resultados fidedignos e representem teoricamente o que aconteceria no homem. Só depois de vários estudos que comprovem a eficácia e a sua segurança é que esses protótipos podem ser testados nos seres humanos (Moon *et al.*, 2021).

Dentre esses métodos utilizados que possam ser confiáveis existem a utilização de animais como cobaias para testes de toxicidade e eficácia, esse é um dos métodos mais utilizados, mas veem perdendo espaço gradativamente por também envolver vidas (Monteiro *et al.*, 2013).

Além dos citados, existem as culturas celulares que representam o funcionamento celular e os processos bioquímicos, sendo capazes de apresentarem boa comparabilidade com os estudos com o corpo humano. Ademais, não trazem prejuízos para vidas, sendo assim um método eficaz e seguro para a realização de estudos tanto para atividade de protótipos quanto de toxicidade. Dentro da área de cultura celular, existem possibilidades de estudos como (Disner., 2019):

- Monoculturas: culturas celulares que utilizam apenas um tipo celular no meio, como por exemplo, apenas fibroblastos;
- Co-culturas: culturas celulares que utilizam mais de um tipo celular no meio como por exemplo, a utilização de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos;
- Culturas 2D: culturas celulares que ficam em superfície plana, as células interagem apenas lado a lado e se multiplicam uma ao lado das outras de forma horizontal;
- Culturas 3D: modelo que possibilita uma maior representatividade do modelo fisiológico original, possibilita que as células interajam com o ambiente em todas as direções. Permite uma maior interação célula-célula.

Então, principalmente para estudos preliminares, esses devem ser os métodos adotados em estudos de descoberta de novos fármacos. Ficando os estudos com seres humanos para etapas finais do desenvolvimento (Williams., 2006).

O avanço da ciência tem permitido que a utilização dos animais em pesquisas científicas possa ser reduzida. Com a pressão da sociedade e os avanços tecnológicos várias indústrias têm buscado métodos alternativos espontaneamente para a realização de experimentos, com a finalidade de abolir a utilização de animais. Recentemente, o senado aprovou o projeto de lei PLC 70/2014 que proíbe a utilização de animais em pesquisas e testes para a produção de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes, a lei entrou em vigor em 24 de fevereiro de 2023 através da resolução nº58. Esse marco torna-se um grande avanço para o fim dos testes em animais no Brasil (Disner, 2019; Diario Oficial Da União, 2023).

A utilização de modelos *in vitro* é uma alternativa ideal para realização de experimentos preliminares levando em consideração a confiabilidade desse modelo, a humanização do processo e a possibilidade de repetições simultâneas dos testes (Suzuki *et al.*, 2019). Esses modelos utilizam células de animais que reproduzem os processos fisiológicos e com isso, possibilita a visualização das respostas celulares a possíveis fármacos. Os testes com culturas celulares não substituem totalmente os

testes com o ser humano, pois trata-se de um organismo complexo, que possibilita muitas variáveis. Porém além de respostas semelhantes, pode-se destacar também como vantagem a reprodutibilidade, a rapidez em que os testes podem ser realizados e a necessidade de uma quantidade de amostras reduzida (Moon *et al.*, 2021).

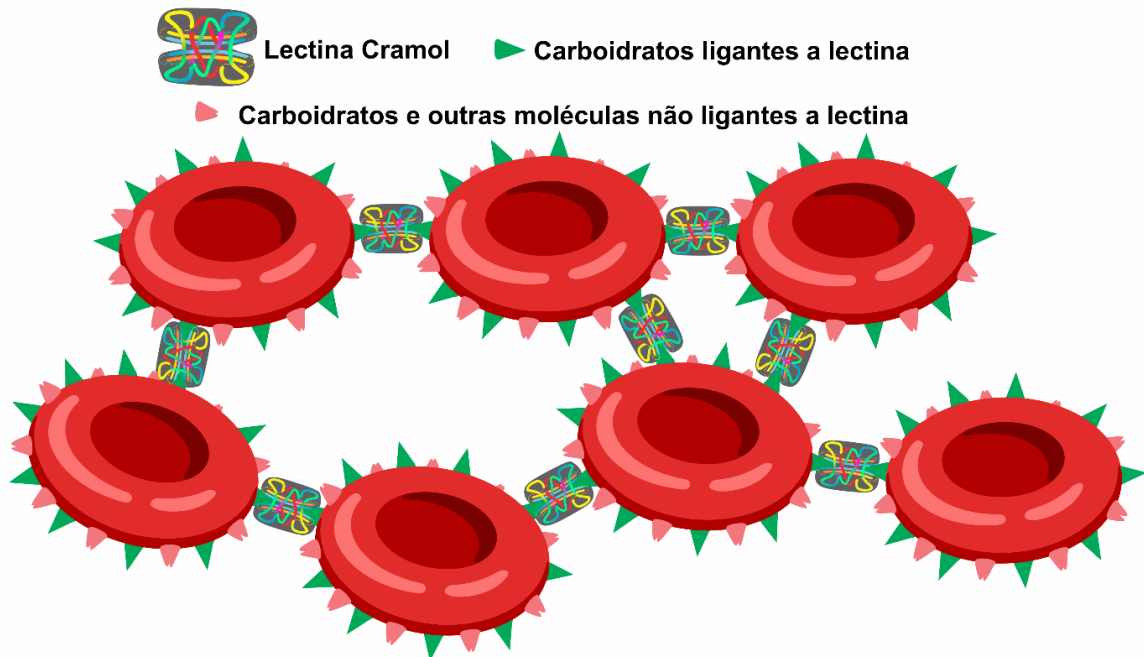
3.5 Lectina de *Cratylia mollis*

As lectinas são proteínas bioativas de origem não imunológica com capacidades moduladoras para diversos mecanismos fisiológicos. Elas se ligam reversivelmente a carboidratos e por isso desempenham papéis importantes em mecanismos celulares, como capacidades mitogênicas e indutores de síntese de proteínas. Podem ser encontradas em diversas formas de vidas, como plantas, animais e microrganismos (Gautam *et al.*, 2019).

A primeira lectina identificada foi a ricina, extraída da *Ricinus communis* L. (mamona) em 1888 por Stillmark, quando ele observou a atividade hemoaglutinante do extrato. Apesar de ter sido descoberta a muito tempo, a pouco menos de um século é que se começou a estudar de forma mais difundida as lectinas existentes e as suas atividades. Existem diversas lectinas conhecidas que são extraídas principalmente de plantas leguminosas, entre elas a que está mais bem caracterizada é a Concanavalina A (Con A) que é uma lectina extraída da planta *Canavalia ensiformis* (Huldani *et al.*, 2022).

Por serem seletivas a carboidratos, apresentam capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos da parede celular de eritrócitos em sistemas sanguíneos ABO e MN, através de ligações hidrofóbicas e de hidrogênio. Essa propriedade permite as lectinas a capacidade de aglutinar os eritrócitos de forma seletiva e isso as distingue de outras moléculas como as glicotransferases. Através dessa ligação aos carboidratos membrana celular dos eritrócitos é possível a realização do teste de hemoaglutinação para verificar a presença e/ou atividade de lectinas (Figura 17) (Sá *et al.*, 2008).

Figura 17 – Hemoaglutinação mediada por uma lectina.



Fonte: Silva (2024).

Elas podem ser encontradas naturalmente ligadas reversivelmente a carboidratos de membranas celulares, pois muitas desses carboidratos são glicosiladas e se tornam um sítio de ligação para essas lectinas através do seu “sítio de ligação a carboidrato” (Domínio de Reconhecimento a Carboidrato – CDR) um mecanismo conhecido como encaixe induzido (Nascimento *et al.*, 2020).

A CramolIII 1,4 é uma lectina muito semelhante a ConA e possui diversos efeitos fisiológicos já conhecidos. Essa lectina é extraída das sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratu), uma leguminosa nativa do nordeste brasileiro, predominante do bioma Caatinga, que se apresenta em formas de arbustos (Figura 18). Quando a extração é realizada, é obtido diversas formas moleculares da lectina: CramolI 1, CramolI 2, CramolIII3 e CramolI 4. A CramolIII 1,4 é uma associação das duas formas moleculares específicas para glicose/manose (Melo *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2020).

Figura 18 – Vagens, flores, sementes e arbusto de *Cratylia mollis*.



Fonte: Adaptado de Queiroz, (2015).

Dentre as atividades observadas até o momento da Cramoll pode-se destacar as atividades imunomoduladoras e anti-infecciosas (Carneiro *et al.*, 2021), pró-inflamatórias e mitogênicas (Melo *et al.*, 2010), antitumoral (Cunha *et al.*, 2016), e cicatrizantes (Melo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012 Andrade *et al.*, 2021). Podendo a mesma mediar processos infecciosos contra agentes invasores, contribuindo com ativações de citocinas importantes para estimulação de células do sistema imune, como as interleucinas e fatores de crescimento (Oliveira *et al.*, 2013).

Recentemente Andrade e colaboradores (2021) ao analisar a capacidade cicatrizante da Cramoll em camundongos diabéticos, conseguiram observar que ao final do experimento de 12 dias além da Cramoll ter acelerado a reepitelização, ocorreu também um maior depósito de colágeno tipo I nas feridas do grupo em que foi utilizado essa lectina, mostrando que ela atua acelerando a cicatrização mesmo em situações adversas.

Levando em consideração que a Cramoll apresenta atividade pró-inflamatória e atua acelerando a deposição de colágeno tipo I no processo cicatricial, e sendo esse o principal tipo de colágeno na pele humana, o que melhor se organiza e preenche de forma moduladora a pele, essa lectina pode se tornar uma excelente candidata a um produto cosmético antienvelhecimento.

3.6 Galactomanana de *Cassia grandis*

Os polissacarídeos são carboidratos formados por grandes polímeros de monossacarídeos ligados covalentemente uns aos outros. Esses compostos extraídos de fontes naturais têm ganhado cada vez mais destaque em várias indústrias por apresentar diversas vantagens como sua biocompatibilidade, baixo custo e fácil obtenção (Silva *et al.*, 2020).

As galactomananas são polissacarídeos extraídos do endosperma de sementes de plantas, principalmente leguminosas com diversas aplicabilidades em vários setores, como na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Por terem alto peso molecular, serem solúveis em água e não iônicas possuem as características ideais para a formação de sistemas altamente viscosos e em baixas concentrações. Assim, podem ser utilizados para a preparação de filmes cosméticos, estabilizadores de emulsão e para a formação de hidrogéis (Albuquerque *et al.*, 2017).

É importante destacar também a capacidade de imobilização de biomoléculas. No estudo de Albuquerque e colaboradores (2016) foi realizada imobilização da Cramoll no gel de Galactomanana extraído de *Cassia grandis*, uma árvore nativa brasileira (Figuras 19). Além de ter permitido uma liberação controlada Cramoll o hidrogel permitiu uma estabilidade que manteve as características naturais da lectina por até 30 dias e sem contaminações microbiológicas.

Figura 19 – Sementes de *Cassia Grandis*



Fonte: Autoria própria (2024)

Uma vantagem da utilização do gel de Galactomanana como imobilizador da Cramoll para os fins cosméticos é a sua intimidade com o estrato córneo da pele. Já que a Cramoll necessita ultrapassar o estrato para induzir a produção de colágeno dérmico, estar associado a um gel que facilite esse transporte pode ser fundamental para que aconteça de forma definitiva esse processo (Albuquerque *et al.*, 2016).

4. – ARTIGO CIENTÍFICO QUE SERÁ ENVIADO PARA A REVISTA:

evidência
BIOCIÊNCIAS, SAÚDE E INOVAÇÃO

evidence: bioscience, health and innovation

ARTIGO 1 - ANÁLISE DA ATIVIDADE INDUTORA DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO *in vitro* PELA CRAMOLL LIVRE E IMOBILIZADA EM UM GEL DE GALACTOMANANA

Natan Cordeiro Da Silva¹; Bruno José da Silva Bezerra²; Marllyn Marques da Silva³; Elisandra Cibely Cabral de Melo²; Paulo Antônio Galindo Soares²; Noemia Pereira da Silva Santos¹; Maria Tereza dos Santos Correia²; Fernanda Miguel de Andrade¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia – Recife, Pernambuco, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Recife, Pernambuco, Brasil

Resumo

Cramoll é uma lectina extraída das sementes da planta *Cratylia mollis* que possui diversas atividades biológicas, incluindo a capacidade de ser pró-inflamatória e de induzir a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Devido a essas características, a Cramoll pode desempenhar um papel importante em produtos antienvelhecimento para a pele. Moléculas imobilizadas em géis podem apresentar características de estabilidades melhoradas, assim como a capacidade de liberação controlada. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Cramoll imobilizado ou não em gel de Galactomanana sobre células Vero CCL-81. As células foram cultivadas, tratadas e a concentração de colágeno no meio foi analisada utilizando o kit Sirius Red Total Collagen Detection (Chondrex), a leitura foi realizada em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm. A Cramoll estimulou a síntese de colágeno por células Vero em todas as concentrações analisadas. Os grupos tratados com a lectina tendem a se equiparar em relação ao estímulo da síntese. Além disso, a cramoll manteve a sua atividade mesmo imobilizada no gel de galactomanana. Essa lectina demonstrou ser promissora em relação a atividade bioestimuladora de colágeno, ao induzir a síntese dessas fibras por células Vero.

Palavras-chave: Colágeno; Envelhecimento da pele; Fibroblastos; Lectinas

INTRODUÇÃO

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes no corpo humano. Correspondente a cerca de 30% do peso seco. Está presente em diversos tecidos e tem função estrutural muito importante no funcionamento do organismo. É composto pelos aminoácidos glicina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina (bolke *et al.*, 2019).

Na pele, está localizado na derme, uma região bastante vascularizada e que possui uma vasta matriz extracelular, que apesar de possuir outros componentes como ácido hialurônico e fibras elásticas, as fibras de colágeno são a principal composição dessa matriz. Nesse tecido, ele é produzido pelos fibroblastos, que é o principal tipo celular da derme. Por ser produzido intracelularmente, é liberado no meio extracelular e depois liga-se uns aos outros para formar fibras colágenas em uma tripla hélice organizada (Gref *et al.*, 2020; Boo, 2022, Geahchan *et al.*, 2022).

Em um determinado momento da vida adulta, o corpo humano tende a reduzir a produção de colágeno naturalmente. Acontece um desequilíbrio entre a produção e a degradação. Além do processo natural, fatores externos como a luz solar (principalmente na pele) e hábitos alimentares e de vida aceleram o processo de degradação através do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que estimulam a produção das collagenases, enzimas responsáveis pela degradação do colágeno (Hwang *et al.*, 2020).

Com a idade e a perda de colágeno gradativa, aparecem diversos problemas, como as dores nas articulações, dificuldade de cicatrização de feridas e os mais aparentes que é a perda de preenchimento da matriz extracelular na pele, que leva consequentemente ao aparecimento de rugas e flacidez (Lorz *et al.*, 2019).

A procura por tratamentos que retardem essa perda de colágeno ou revertam esses quadros cresce cada vez mais. Os produtos utilizados atualmente envolvem aplicações intradérmicas de bioestimuladores, microagulhamento e uso de colágeno via oral, sendo o último, uma técnica que não possui nenhuma comprovação científica de funcionalidade. Com isso, a busca da indústria farmacêutica e cosmética por novos compostos de melhor administração e efetividade é notória, incluindo a possibilidade de utilização de produtos fitoterápicos.

A Cramoll é uma lectina extraída de uma planta leguminosa da região semiárida brasileira, a *Cratylia mollis*. Com várias atividades biológicas comprovadas, possui importantes modulações identificadas que ainda necessitam de estudos aprofundados. Entre essas atividades, está a indução da produção de colágeno tipo I,

que recentemente foi identificada após estudos mostrarem considerável depósito de colágeno tipo I prematuramente em feridas de camundongos diabéticos em relação ao grupo controle (Carneiro *et al.*, 2021).

É comum a imobilização de substâncias em géis na indústria farmacêutica para a constituição de formulações, melhorar a estabilidade de moléculas e o controle de liberação de princípios ativos. Esse mecanismo trás diversos benefícios para as formulações, pois reduz a necessidade de repetições de doses diárias, facilitando a adesão ao tratamento pelo paciente. Possibilita também um tempo de prateleira prolongado. Essa imobilização pode ser realizada tanto por matrizes poliméricas sintéticas, quanto por naturais, derivadas de várias partes de plantas distintas.

A galactomanana extraída do endosperma de sementes de *Cassia grandis* é um polissacarídeo de grande capacidade de utilização nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas. Possui alto peso molecular, é solúvel em água e apresenta propriedades que possibilitam a formação de emulsões e géis, que permitem a imobilização de substâncias dentro desses sistemas. Albuquerque e colaboradores (2016) testaram a imobilização da Cramoll no gel dessa Galactomanana e observaram que ele possibilita uma estabilidade que garante as características do produto em até 30 dias. Além disso, o gel mantém uma liberação prolongada da lectina, o que permite uma liberação de dosagem no meio de forma controlada.

Esse estudo teve como objetivo investigar os efeitos da Cramoll imobilizado ou não em gel de Galactomanana sobre células Vero CCL-81.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração da Cramoll das sementes de *Cratylia mollis*

As sementes de *Cratylia mollis* (coletadas no município de Ibimirim, no sertão de Pernambuco, Brasil) foram secas a 40° por 3 dias, até atingirem massa constante. Posteriormente, trituradas em um moinho e obtido uma farinha, que foi dissolvida em NaCl 0,15M (p/v) e colocada sob agitação magnética a (500rpm) por 16 horas a 4°C; em seguida o extrato foi filtrado em algodão. Após ser filtrado o extrato foi fracionado por saturação com sulfato de amônia (0-40% e 40-60%), foram obtidas três frações: Fração 0-40%, fração sobrenadante 40-60% e fração precipitado 40-60%. A fração precipitado 40-60% é a que está presente a Cramoll, as outras são desprezadas. O precipitado foi dialisado com água destilada e posteriormente com uma solução salina

de NaCl a 0,15M. Em seguida purificada por cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-75 e por fim, liofilizado (Correia; Coelho, 1995, Albuquerque *et al.*, 2016).

Extração, purificação e preparação do gel da Galactomanana de sementes de *Cassia grandis*

As sementes de *Cassia grandis* (coletadas na costa sul de Pernambuco, Brasil) foram retiradas das vagens e colocadas em água destilada (1:3 p/v) a 100°C por 1 hora para inativação enzimática. Posteriormente, ficaram 36 horas em água destilada em temperatura ambiente para o amolecimento das sementes, já que a Galactomanana está presente apenas no endosperma, é necessário retirar a casca após o amolecimento.

Em seguida, o endosperma foi triturado em um liquidificador industrial com uma solução de NaCl 5%. Depois foi realizado a filtragem em um pano de vual e posteriormente em um tecido de serigrafia. O filtrado foi colocado em álcool 46% (1:3 p/v) por 18 horas para precipitar por inteiro. Em seguida o precipitado permaneceu por 30 minutos em álcool absoluto, filtrado novamente e lavado com acetona. Posteriormente, colocado para secar a 40°C até o peso ficar constante. Para a preparação do gel, a Galactomanana, foi dissolvida em água a 1,7% (p/v) em agitação magnética (500rpm) por 12 horas à 25°C (Albuquerque *et al.*, 2016).

Imobilização da Cramoll no gel de Galactomanana

A imobilização da Cramoll no gel de Galactomanana foi realizada de acordo com Albuquerque e colaboradores (2016). A Cramoll foi imobilizada por aprisionamento na concentração de 100g/ml. Foi adicionado ao gel de Galactomanana puro sob agitação magnética por 1 hora a temperatura ambiente.

Atividade Hemoaglutinante do extrato bruto das sementes de *Cratylia mollis* e da fração purificada

A análise foi realizada em duplicata, em placas de 96 poços. Adicionou-se 50µl de NaCl 0,15M em 24 poços para cada experimento, o primeiro poço foi utilizado como controle, o qual não recebeu nenhuma dosagem das amostras. Foi realizada uma diluição seriada com 50µl de ambas as amostras partir do segundo poço, esse procedimento foi repetido até que chegasse ao último poço, desprezando os últimos 50µl. Em seguida administrou-se 50µl de uma suspensão 2,5% (v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído em cada um dos poços. Para a análise da atividade

aguardou-se 45 minutos e em seguida realizada a leitura macroscópica (Correia; Coelho, 1995).

Cultivo das células vero CCL-81

As células Vero CCL-81 foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Nippon Rinsho 21: 1209-, 1963; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 119-, 1967). Foram cultivadas no laboratório de Bioquímica do Instituto Keizo Asami (LIKA) descongeladas, ressuspensas em meio de cultura (RPMI-1640 MEDIUM, (Sigma-Aldrich)) e em seguida centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet novamente ressuspensado em meio de cultura.

As células foram cultivadas com meio RPMI-1640 MEDIUM, WITH L-GLUTAMINE, WITH (Sigma-Aldrich) e suplementados com 5% de soro fetal bovino (FBS), 1,0 g/L de D-glicose, 2,2 g/L de NaHCO_3 , 10.000UI de Penicilina e 0,060 g/L de Estreptomicina. Mantidos em atmosfera de 95% de O_2 e 5% CO_2 a 37°C (Kovacic *et al.*, 2020) por 24 horas.

Tratamento das células vero CCL-81 com a Cramoll livre e imobilizada no gel de Galactomanana

Após o pré-cultivo (2x) as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (GIBCO), tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 3ml de meio para a realização da contagem das células.

As células Vero foram incubadas em placas de 96 poços em concentração de 1×10^6 células/poço, novamente em meio RPMI, suplementadas com 5% de FBS e 1% de antibiótico, divididas em grupos e cultivadas com os seguintes tratamentos por 48 e 72 horas em atmosfera de 95% de O_2 e 5% CO_2 a 37°C: Controle (C) - Células Vero e suplementação; Controle Meio (CM) - Meio de cultura; Cra_{0,2} – Células Vero tratadas com Cramoll (0,2mg/ml); Cra_{0,2}+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll (0,2mg/ml) imobilizada no gel de Galactomanana; Cra_{0,4} – Células Vero tratadas com Cramoll (0,4mg/ml); Cra_{0,4}+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll (0,4mg/ml) imobilizada no gel de Galactomanana; e CG – Células Vero tratadas com Galactomanana. O experimento foi realizado em duplicata com nove repetições para cada, por experimento. Essas concentrações foram utilizadas por se mostrarem seguras em estudos anteriores (Silva *et al.*, 2015; Albuquerque *et al.*, 2017).

Para o tratamento com a lectina, foi realizado a produção de uma solução mãe com o próprio meio de cultura. Já para o tratamento da lactina com o gel de galactomanana, após a imobilização da Cramoll no gel, o gel foi adicionado previamente aos poços para a formação de um filme, permitindo que as células se aderissem ao mesmo. Então, posteriormente as células foram adicionadas, conforme Albuquerque e colaboradores (2017).

Quantificação de colágeno nas culturas celulares

A quantificação da produção de colágeno utilizou apenas o meio de cultura, afim de identificar se as células Vero CCL-81 produziram e liberaram esse colágeno no meio. Para a análise, utilizou-se o kit Sirius Red Total Collagen Detection – Chondrex e todos os procedimentos utilizados seguiram as orientações do fabricante, explicadas resumidamente a seguir.

Após as 48 e 72 horas de cultivo respectivamente, transferiu-se 200µl de cada poço para um tubo de centrífuga e adicionou-se 50 µl de uma solução de concentração (Chondrex) de colágeno. Como a concentração de colágeno em meio de cultura é geralmente baixa, se faz necessário a utilização dessa solução para permitir que os níveis de colágeno fiquem dentro da faixa de detecção do teste. Posteriormente, os valores da concentração das amostras são multiplicados por um fator de diluição de 0,1, conforme orientação do fabricante.

Após a adição da solução de concentração ao meio, foram agitados no vórtex e incubados a 4°C por 18 horas. Posteriormente, centrifugados a 10.000rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet dissolvido em 100µl de ácido acético a 0,05 M.

Em seguida, foi adicionado 500µl de Sirius Red (Chondrex) a amostra, vórtex e incubado a 25°C por 20 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi removido. O pellet foi ressuspenso em 500µl da solução de lavagem (Chondrex) no vórtex e novamente centrifugado por 3 minutos a 10.000rpm. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o pellet dissolvido em 250µl da solução tampão de extração (Chondrex), em seguida realizou-se a leitura da placa em um leitor de placa de 96 poços (Multiskan™ FC Microplate Photometer - Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 570nm (Suzuki *et al*, 2019).

Para fim de identificação da concentração de colágeno nas amostras, foi realizado também simultaneamente uma diluição seriada em ácido acético a 0,5 M em

duplicata de uma solução de colágeno bovino 0,5mg/ml (Chondrex) para a construção da curva padrão.

Análise estatística

Para as análises estatísticas foi realizado o método de análise de variância ANOVA test, utilizando o software GraphPad Prism 10.3.0 e foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração da Cramoll e testes de atividade hemoaglutinante

Depois de todo o processo de preparação do extrato das sementes de *Cratylia mollis*, realizou-se a análise da atividade hemoaglutinante para constatar a presença da lectina no extrato. O extrato apresentou atividade hemoaglutinante até uma diluição de (Diluição $1/1024^{-1}$), A análise da atividade hemoaglutinante do extrato é importante pois permite a identificação da presença da lectina, para poder continuar as etapas de purificação tendo a certeza de sua presença. Após a purificação completa da Cramoll, a análise foi realizada novamente e a lectina manteve a sua atividade, comprovando o êxito em sua purificação.

A cramoll foi amplamente analisada para diversas funcionalidades, apresentando atividades biológicas como cicatrizante (Melo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012 Andrade *et al.*, 2021), pró-inflamatórias, mitogênicas (Melo *et al.*, 2010) imunomoduladoras e anti-infecciosas (Carneiro *et al.*, 2021). Com a presença de diversos estudos na literatura, a sua extração e purificação baseado no método de Correia e Coelho (1995) mostra-se já bem elucidada. Resultados semelhantes foram observados em Albuquerque e colaboradores (2016) onde após a extração e purificação das sementes de *Cratylia mollis* obtem-se um pó branco com atividades hemoaglutinante, demonstrando a presença da Cramoll.

Extração e purificação da Galactomanana de sementes de *Cassia grandis*.

Na obtenção da Galactomanana é importante observar o rendimento da extração, já que o objetivo do estudo para ela é a produção do gel. O rendimento da extração é expresso em uma porcentagem da massa seca final obtida da extração em relação ao peso inicial das sementes secas. A quantidade de sementes pesadas inicialmente foi de 26,5037g e após a purificação restaram 8,4930g em termos de porcentagem, o rendimento da purificação foi de 32,04%. Comparando com a purificação da mesma Galactomanana realizada por Albuquerque e colaboradores

(2014), o rendimento é satisfatório, pois, relataram um rendimento de $36 \pm 8\%$. Estando então dentro do esperado para essa amostra.

A Galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis* tem apresentado uma ótima atividade imobilizadora da Cramoll em diversos estudos como o de Albuquerque e colaboradores (2016) e Seixas e colaboradores (2024). Por ser um produto de origem natural e excelente matriz imobilizadora, é promissor na indústria cosmética, mostrando boa estabilidade e manter as características farmacológicas dos compostos imobilizados.

A imobilização de macromoléculas mostra-se importante por diversos fatores. Inicialmente, todo produto final na indústria necessita de uma gama de excipientes que garantem estabilidade, funcionalidade e boa atividade farmacocinética. O gel de galactomanana apresenta características que permitem a ele essa funcionalidade, demonstrando garantir a estabilidade de compostos como a Cramoll acima de 30 (Albuquerque *et al.*, 2016).

Função importante também da imobilização é a capacidade de liberação controlada do composto, fazendo com que o princípio ativo seja liberado gradativamente e possua um efeito prolongado. A imobilização da cramoll no gel de galactomanana permitiu que ela fosse liberada gradativamente na pele de ratos Wistar promovendo a cicatrização de queimaduras e a reepitelização do tecido (Seixas *at al.*, 2024).

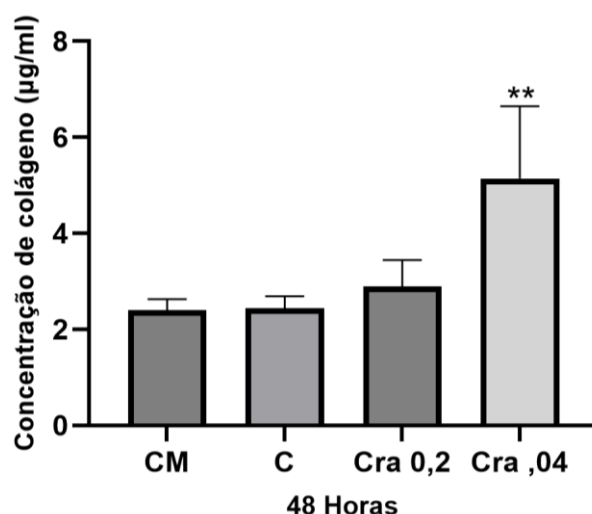
A Cramoll induz a produção de colágeno por células Vero CCL-81.

A Cramoll estimula a produção de colágeno por células Vero CCL-81. Inicialmente, mostra-se que esse efeito é dependente de dosagem, uma vez que em comparação com as células não tratadas com a lectina, as células tratadas com a concentração de 0,2mg/ml no período de 48 horas não apresentaram diferença, já na concentração de 0,4mg/ml apresentaram concentrações de colágeno significativas no mesmo período.

A concentração encontrada no grupo controle meio (CM) foi dada como zero, partindo do pressuposto que sem células não é possível existir a síntese de fibras de colágeno. O grupo C, possuía células Vero e teve uma pequena produção de colágeno. Já os grupos que as células foram tratadas com a Cramoll nas concentrações de 0,2mg/ml (Cra 0,2) e 0,4mg/ml (Cra 0,4) apresentaram aumento na síntese de colágeno, porém, apenas o grupo Cra 0,4 ($5,41 \pm 1,79 \mu\text{g/ml}$) teve diferença

significativa em relação aos grupos controle ($2,45 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) tendo o dobro da concentração de colágeno (figura 1).

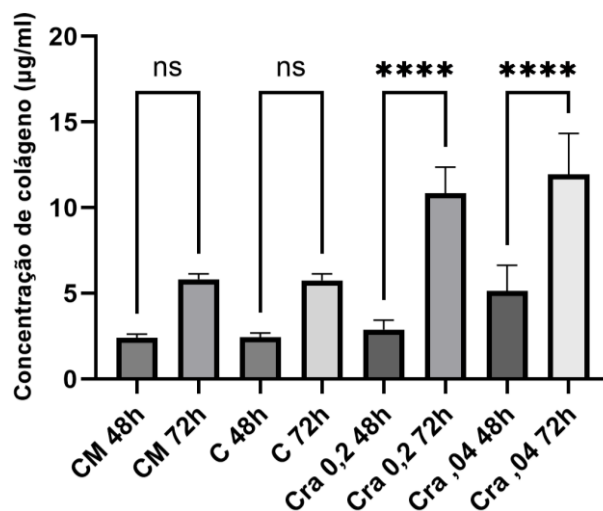
Figura 1 – Síntese de colágeno pelas células Vero após 48 horas de cultivo.



Legenda: Quantificação dos níveis de colágeno em cultura de células vero CCL-81 tratadas com a Cramoll. CM – Controle meio de cultura; C – Controle com células Vero; Cra 0,2 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,2mg/ml; Cra 0,4 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,4mg/ml. * $p < 0,05$ (diferença significativa em relação ao controle).

A atividade biológica de qualquer substância depende de diversos fatores. Além da concentração ideal para atingir a janela terapêutica, o tempo de exposição também é relevante (Fernades *et al.*, 2023). Ao analisar a lectina em ambas as concentrações nos tempos de 48 e 72 horas, foi possível observar que com um maior tempo de exposição, a síntese de colágeno tende a ser maior, porém as duas dosagens se equiparam em estímulo à produção. Esse feito pode ser melhor observado na (figura 2).

Figura 2 – Síntese de colágeno pelas células Vero CCL-81 após 48 e 72 horas de exposição a Cramoll respectivamente.



Legenda: Quantificação dos níveis de colágeno em cultura de células vero CCL-81 tratadas com a Cramoll em 48 e 72 horas respectivamente. CM – Controle meio de cultura; C – Controle com células Vero; Cra 0,2 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,2mg/ml; Cra 0,4 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,4mg/ml. ns - Não possui diferença significativa. * $p < 0,05$ (diferença significativa em relação ao controle).

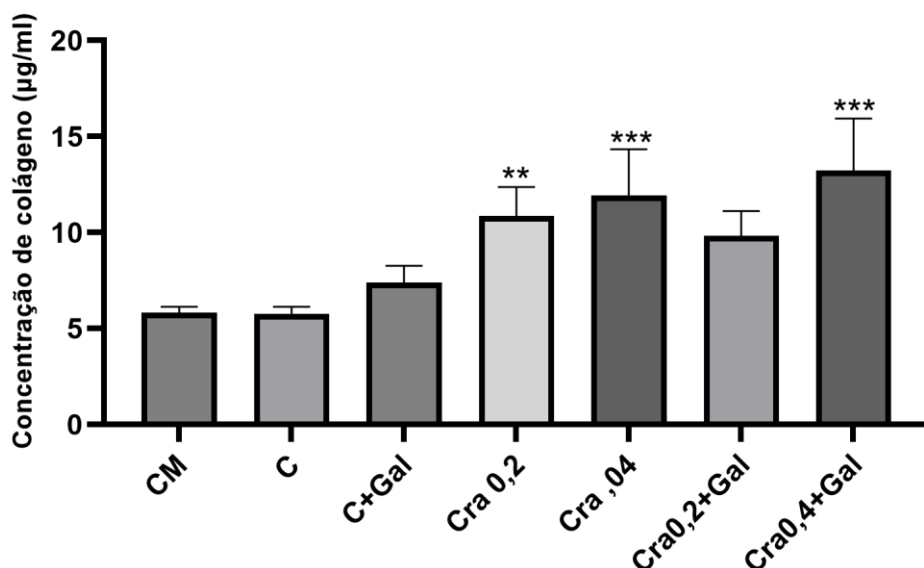
É possível observar que entre as 48 e 72 horas de cultivo, acontece uma síntese de fibras de colágeno mais acentuada, principalmente nos grupos onde há a presença da lectina. Isso seria facilmente explicado por a necessidade inicial das células de se fixarem nas primeiras horas, posteriormente metabolizarem o meio para garantirem a sua sobrevivência e por fim, iniciarem a síntese de compostos secundários.

A produção de colágeno entre os grupos tratados com a Cramoll após as 72 horas de cultivo mostra-se bem superior aos dois grupos controle. Porém, relacionando-se as dosagens 0,2mg/ml e 0,4mg/ml, percebe-se que os níveis de concentração são bem próximos, ($10,86 \pm 1,74 \mu\text{g/ml}$) e ($13,25 \pm 2,75 \mu\text{g/ml}$) e não possuem diferenças significativas, o que leva a entender que a lectina é capaz de estimular a síntese de colágeno até mesmo em baixas concentrações se as células forem expostas a um tempo superior a 48 horas. Essa é uma característica otimista para essa atividade, pois, farmacologicamente falando, possuir atividade em baixas concentrações distancia o produto do topo da sua janela terapêutica, diminuindo por exemplo, as chances de toxicidade na sua futura utilização.

Como observado na figura 2, os níveis de concentração de colágeno nos grupos controles não variaram de forma relevante no intervalo observado. Já os grupos tratados com a cramoll, Cra 0,2 e Cra 0,4 no período de 72 horas ($10,86 \pm 1,74 \mu\text{g/ml}$) e ($13,25 \pm 2,75 \mu\text{g/ml}$) apresentaram diferença estatística significativa em relação aos seus respectivos grupos do dia anterior ($2,9 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$) e ($5,41 \pm 1,79 \mu\text{g/ml}$). Demonstrando que o tempo de exposição da lectina as células, é essencial para a formação de fibras de colágeno.

A quantificação dos níveis de colágeno nas células vero após o tratamento com a cramoll imobilizada no gel de galactomanana, foi analisada nas 72 horas. Sabe-se que o gel permite uma liberação controlada e gradativa da lectina, além disso, é importante analisar a manutenção da eficácia dela, já que a principal função do gel é manter a estabilidade da molécula (Gráfico 3).

Figura 3 – Produção de colágeno pelas células Vero após 72 horas de exposição a Cramoll e a Cramoll imonilizada no gel de galactomanana.



Legenda: Quantificação dos níveis de colágeno em cultura de células vero CCL-81 tratadas com a Cramoll livre e imobilizada no gel de galactomanana em 72 horas de tratamento. Cra 0,2 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,2mg/ml; Cra 0,4 – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,4mg/ml; C – Controle com células Vero; CM – Controle meio de cultura; Cra 0,2+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,2mg/ml imobilizada no gel de galactomanana; Cra 0,4+Gal – Células Vero tratadas com Cramoll na concentração de 0,4mg/ml imobilizada no gel de galactomanana; * $p < 0,05$ (diferença significativa em relação ao controle)

A lectina imobilizada no gel de galactomanana manteve sua atividade indutora da produção de colágeno. Em relação aos grupos tratados com as mesmas concentrações, porém estando a cramoll imobilizada ou não, esses não apresentaram diferenças significativas. Já se comparando a cramoll imobilizada e o grupo controle (C+Gal) ($7,49 \pm 1,27 \mu\text{g/ml}$), o grupo em que a lectina foi dosada na concentração de 0,2mg/ml não apresentou atividade relevante ($9,82 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$). O grupo em que a cramoll foi dosada em 0,4mg/ml demonstrou diferença significativa ($13,25 \pm 2,75 \mu\text{g/ml}$).

É importante destacar que todas as dosagens da lectina (imobilizada ou não) testadas apresentaram atividade indutora da síntese de colágeno em comparação aos grupos controles que não receberam nenhum tipo de tratamento após 72 horas. Apresentando níveis de concentrações de colágeno próximos do dobro dos grupos controle. A maior dosagem testada (0,4mg/ml) resultou em uma concentração de colágeno levemente superior em comparação a dosagem inferior (0,2mg/ml). Isso se

torna mais visível nas 48 horas, já após as 72 horas, não existe diferença significativa entre as duas dosagens, tanto com a cramoll livre, quanto imobilizada.

Estudos anteriores já demonstravam que a cramoll estimulava a síntese e o depósito de colágeno em tecidos em processo de cicatrização. Andrade e colaboradores (2021) analisaram a atividade cicatricial da cramoll livre e imobilizada em uma membrana extraída de *Hymenaea courbaril* em feridas de camundongos diabéticos. A cramoll livre foi capaz de aumentar o depósito de colágeno tipo I nas feridas e acelerar o processo de cicatrização.

Albuquerque e colaboradores (2017) avaliaram a atividade cicatrizante da cramoll livre e imobilizada no filme de galactomanana em feridas tópicas de ratos. A Cramoll imobilizada na galactomanana provocou uma cicatrização mais rápida e um depósito de colágeno com muitas fibras em relação aos outros grupos.

A cramoll já demonstrava ter capacidade de estimular a síntese de colágeno em tecidos em processo cicatricial, inclusive imobilizada no gel de galactomanana. O que seria necessário saber, era se ela também manteria essa atividade em células em situações fisiológicas normais, sem estresses e processos pró inflamatórios. Pois, seria uma excelente substância candidata a utilização como produto antienvelhecimento.

A busca por bioestimuladores de colágeno cresce constantemente devido ao potencial uso dessas substâncias como produtos antienvelhecimento da pele. São diversos os estudos, com as mais variadas substâncias, naturais, sintéticas e afins. Suzuki e colaboradores (2019) analisaram a atividade bioestimuladora de colágeno do extrato etanólico e a extração de fluido supercrítico de dióxido de carbono de âmbar Kuji (EtOH ramal.) em células SF-TY e constataram atividade indutora para ambas as extrações, de forma dependente de dosagem. O que difere esses extratos da Cramoll, a sua atividade não demonstra ser dose dependente, pois, com um maior tempo de exposição as concentrações analisadas tendem a estimular aproximadamente a mesma quantidade de fibras de colágeno.

Sabe-se que a vitamina C é essencial para a síntese de colágeno por auxiliar na junção das moléculas de tropocolágeno e formação das fibras. Gref e colaboradores (2020) analisaram a capacidade de biossíntese de colágeno de uma vitamina C conjugada ao escaleno em explantes de pele total humana em modelo ex vivo. A vitamina C conjugada com o escaleno apresentou atividade bioestimuladora

de colágeno melhorada em relação ao seu composto de referência (Vitamina C-Palítico).

Machado e colaboradores (2020) analisaram a atividade antienvhecimento dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca em fibroblastos CCD-1072Sk. Os óleos de alecrim e melaleuca não apresentaram atividade bioestimuladora de colágeno. Já o óleo de lavanda demonstrou ter influência na síntese de colágeno e apresentou um aumento em relação ao grupo controle.

O estímulo da cramoll à síntese de colágeno demonstra ser muito relevante, já que boa parte dos compostos analisados na literatura apresentam aumento da síntese, mas não em proporção tão significativa.

CONCLUSÃO

A cramoll induziu a síntese de colágeno pelas células vero CCL-81 em todas as concentrações analisadas, tanto livre quanto imobilizada. Demonstrou que com pouco tempo de exposição (48 horas), dosagens superiores são necessárias para que a produção de colágeno seja realizada, porém, com um tempo prolongado (72 horas) a síntese é equivalente para ambas as concentrações analisadas. Estando imobilizada no gel de galactomanana, a lectina mantém a sua atividade de forma significativa apenas na maior concentração analisada. Com isso, A Cramoll demonstra ser uma substância indutora da síntese de colágeno estando livre ou imobilizada no gel de galactomanana. Mostrando-se uma excelente candidata a fármaco antienvhecimento da pele.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P. B. S.; BARROS, W. J.; SANTOS, G. R. C.; CORREIA, M. T. S.; MOURÃO, P. A. S.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 104, p. 127-134, 10 jan. 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.010>.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; SILVA, C. S.; SOARES, P. A.G.; BARROS, W. J.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CUNHA, M. G. C. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 454-461, 1 fev. 2016. DOI [10.1016/j.ijbiomac.2016.01.107](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.107)
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Immobilization of bioactive compounds in *Cassia*

grandis galactomannan-based films: Influence on physicochemical Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 96, p. 727-735, 1 jan. 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.081>.

ANDRADE, F. M.; NEVES, F. P. A.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; ARAGÃO-NETO, A. C.; JANDÚ, J. J. B.; COELHO, L. C. B. B.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; TEIXEIRA, Á. A. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Healing activities of Cramolll and xyloglucan membrane in cutaneous wounds of diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 100045, 21 mai. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.regen.2021.100045>

BOLKE, L.; SCHLIPPE, G.; GERSS, J.; VOSS, W. A Collagen Supplement Improves Skin Hydration, Elasticity, Roughness, and Density: Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Blind Study. **Nutrients**, [S. l.], v. 11, p. 1-14, 17 out. 2019. DOI <https://doi.org/10.3390/nu11102494>.

BOO, Y. C. Ascorbic Acid (Vitamin C) a cosmeceutical to increase dermal collagen for skin antiaging purposes: emerging combination therapies. **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1-18, 26 ago. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/antiox11091663>.

CARNEIRO, M. A. M. S.; SILVA, L. S.; DINIZ, R. M.; SAMINEZ, W. F. S.; OLIVEIRA, P. V.; MENDONÇA, J. S. P.; CALOSSO, A. H. M.; SILVA, I. S. S.; JANDÚ, J. J. B.; SÁ, J. C.; FIGUEIREDO, C. S. S. S.; CORREIRA, M. T. S.; SILVA, L. C. N. Immunomodulatory and anti-infective effects of Cratylia mollis lectin (Cramolll) in a model of wound infection induced by Staphylococcus aureus. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 100, n. 108094, 8 set. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108094>.

CORREIA, M. T.; COELHO, L. C. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of Cratylia mollis Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol**, [S. l.], v. 55, p. 261-273, 31 jan. 1995. DOI: 10.1007/BF02786865

DE SEIXAS, J. R. P. C.; RIBEIRO, K. A.; SOUZA, A. de A; SILVA, C. E. da; PEDRAFEIXE, M. G.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M; NETO da C. S. J.; BARRO, W. J.; MARTINS; R. D.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; SOARES A. G. P. Hydrogels based on galactomannan and κ-carrageenan containing immobilized biomolecules for in vivo thermal-burn wound treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 270, n. 132379, 14 mai. 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132379.

FERNANDES, A.; RODRIGUES, P. M.; PINTADO, M.; TAVARIA, F. K. A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 115, n. 154824, 18 abr. 2023. DOI 10.1016/j.phymed.2023.154824.

GEAHCHAN, S.; BAHARLOUEI, P.; RAHMAN, A. Marine Collagen: A promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration. **Marine drugs**, [S. l.], v. 20, p. 1-16, 10 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/md20010061>.

GRAF, R.; DELOMÉNIE, C.; MAKSIMENKO, A.; GOUADON, E.; PERCOCO, G.; LATI, E.; DESMAËLE, D.; ZOUHIRI, F.; COUVREUR, P. Vitamin C–squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 16883, 9 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72704-1>.

HWANG, S. J.; HA, G. H.; SEO, W. Y.; KIM, C. K.; KIM, K. J.; LEE, S. B. Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs). **BMB Reports**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 539-544, 20 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.10.120>.

KOVACIK, A.; TVRDA, E.; JAMBOR, T.; FULOPOVA, D.; KOVACIKOVA, E.; HLEBA, L.; KOŁODZIEJCZYK, L. M.; HLEBOVA, M.; GREN, A.; MASSANYI, P. Cytotoxic effect of aminoglycoside antibiotics on the mammalian cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 56, p. 1-8, 10 out. 2020. DOI [10.1080/10934529.2020.1830653](https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1830653).

LORZ, L. R.; YOO, B. C.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-Wrinkling and Anti-Melanogenic Effect of *Pradosia mutisii* Methanol Extract. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1043, 27 fev. 2019. DOI [10.3390/ijms20051043](https://doi.org/10.3390/ijms20051043).

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 28 mai 1951.

MACHADO, A. C. H. R.; SPÍNDOLA, D. G.; LEITE-SILVA, V. R.; OLIVEIRA, C. R. Efeitos anti-idade dos óleos essenciais de lavanda, alecrim e melaleuca em fibroblastos dérmicos humanos. **Revista Científica de Estética e Cosmetologia**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1-7, 10 out 2020. DOI: <https://doi.org/10.48051/rcec.v1i1.15>

SILVA, L. C. N.; ALVES, N. M. P.; CASTRO, M. C. A. B.; HIGINO, T. M. M.; CUNHA, C. R. A. da; PEREIRA, V. R. A.; PAZ, N. V. N. da; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. PCramolll and rCramolll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. **Oxid Med Cell Longev**, [S. l.], n. 520872, 20 out. 2015. DOI [10.1155/2015/520872](https://doi.org/10.1155/2015/520872).

SUZUKI, S.; ABE, J.; KUDO, Y.; SHIRAI, M.; KIMURA, K. Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 84, p. 518-525, 22 nov. 2019. DOI <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1693251>.

5. ARTIGO 2 – COMPOSTOS NATURAIS BIOATIVOS INDUTORES DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA PELE

Natan Cordeiro Da Silva¹; Bruno José da Silva Bezerra²; Marllyn Marques da Silva³, Noemia Pereira da Silva Santos¹; Maria Tereza dos Santos Correia²; Fernanda Miguel de Andrade¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia – Recife, Pernambuco, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Recife, Pernambuco, Brasil

Resumo

A pele é o maior órgão do corpo humano e é extremamente importante para a proteção e o controle da homeostase dos órgãos e tecidos internos. Dividida em derme e epiderme, tem como um dos principais componentes da derme, o colágeno, responsável pela sustentação da pele e preenchimento da matriz extracelular, ele começa a diminuir após a vida adulta, tanto por redução na produção, quanto por degradação induzida pelas metaloproteinases, que podem degradá-lo por estímulos genéticos, mas também por induções externas como os raios solares. Esse estudo teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico para identificar possíveis compostos bioativos de origem natural que sejam capazes de induzir a produção de colágeno dérmico. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura que utilizou como base de dados PubMed e Google acadêmico, buscando publicações dos últimos cinco anos (janeiro/2018 a dezembro/2022). Foram encontrados diversos estudos que analisaram produtos derivados de plantas, extratos, moléculas, microrganismos como fungos e também a utilização de moléculas endógenas do homem como peptídeos e genes de células humanas para estimular a síntese de colágeno. Vários produtos como o *Borago officinalis* L. e o extrato de *Aronia melanocarpa* demonstraram induzir a síntese de colágeno, e mediar a inibição das metaloproteinases. Percebe-se que existem vários estudos voltados ao desenvolvimento de indutores da produção de

colágeno na literatura e que muitos deles demonstraram ser promissores para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Bioestimulador de colágeno; Fibroblastos dérmicos; Pele.

INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína fibrosa, produzido intracelularmente pelos fibroblastos e que posteriormente é secretado, tem como principal função manter a integridade da matriz extracelular por meio da formação de suas fibras que dão sustentação e elasticidade ao tecido, garantindo integridade estrutural e firmeza (Aly *et al*, 2022).

É comum que o indivíduo ao chegar a sua idade adulta comece a ter um declínio na quantidade de fibras de colágeno nos tecidos devido ao aumento na expressão de metaloproteinases (MMPs) responsáveis pela degradação de colágeno (MMP1, MMP-8 e MMP-13, conhecidas como collagenases). Assim como também uma menor expressão dele pelos fibroblastos. A derme por exemplo, por apresentar uma grande quantidade de fibras de colágeno, sofre alterações em sua estrutura que levam ao aparecimento de rugas e aumento da flacidez da pele (Shin *et al*, 2019).

Existem fatores intrínsecos e extrínsecos que provocam esse processo. Os intrínsecos ocorrem de forma natural, através de fatores genéticos. Os fatores extrínsecos incluem tabagismo, uso excessivo de álcool, radiação ultravioleta, má alimentação, entre outros. Esses, relacionados ao grau de envelhecimento, se acelerado ou não, dependem muito do nível de exposição a determinado fator, sendo que quanto maior a exposição, mais rápido se torna o envelhecimento e o aparecimento dos sinais característicos (Hwang *et al*, 2021).

Ambos os fatores, provocam morte celular, atrofia e além dos danos celulares, ocorre também danos aos componentes extracelulares, que são importantíssimos para a sustentação da pele, como por exemplo a quebra do colágeno (Kisiel; Klar, 2019).

Para que o colágeno seja produzido de forma natural, a célula precisa estar em sua fase de funcionamento normal. Sabe-se que ao induzir a inflamação, células que já não produzem colágeno podem voltar a produzi-lo e promover a formação de suas fibras. Algumas técnicas utilizam desse processo para induzir a produção e formação dessa proteína (Suzuki *et al*, 2019).

Basicamente, o que se utiliza nos dias atuais é uma indução controlada a inflamação da pele fazendo com que os fibroblastos voltem a produzir colágeno. Um exemplo amplamente utilizado são os bioestimuladores como a Hidroxiapatita de Cálcio e o Ácido Poli-L-Lácteo (Csekes; Racková, 2021).

Porém, existem algumas desvantagens na utilização dos produtos comercializados atualmente, como por exemplo a forma invasiva de aplicação de alguns, efeitos colaterais a curto prazo como necrose na região de aplicação e a longo prazo alergias, granulomas por corpo estranho, deformidades por deslocamento, entre outros (Bolke *et al*, 2019).

A obtenção de produtos de origem natural é uma das técnicas mais tradicionais de desenvolvimento de compostos ativos e que por mais que seja antiga, continua trazendo ótimos resultados (Suzuki *et al*, 2019).

Com isso, o objetivo desse estudo é realizar um levantamento bibliográfico para identificar possíveis compostos bioativos de origem natural que sejam capazes de induzir a produção de colágeno dérmico.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, realizada a partir de buscas nas seguintes bases de dados: PubMed e Google Acadêmico. Os critérios de inclusão adotados foram: artigos experimentais, publicados nos últimos cinco anos (janeiro/2018 a dezembro/2022), nos idiomas português e inglês, texto integral disponível; e os seguintes critérios de exclusão: revisões de literatura e trabalhos que não tratavam da temática proposta neste estudo. Descritores utilizados: Bioestimuladores, Fibroblastos, Colágeno; Biostimulators, Fibroblastos, Collagen.

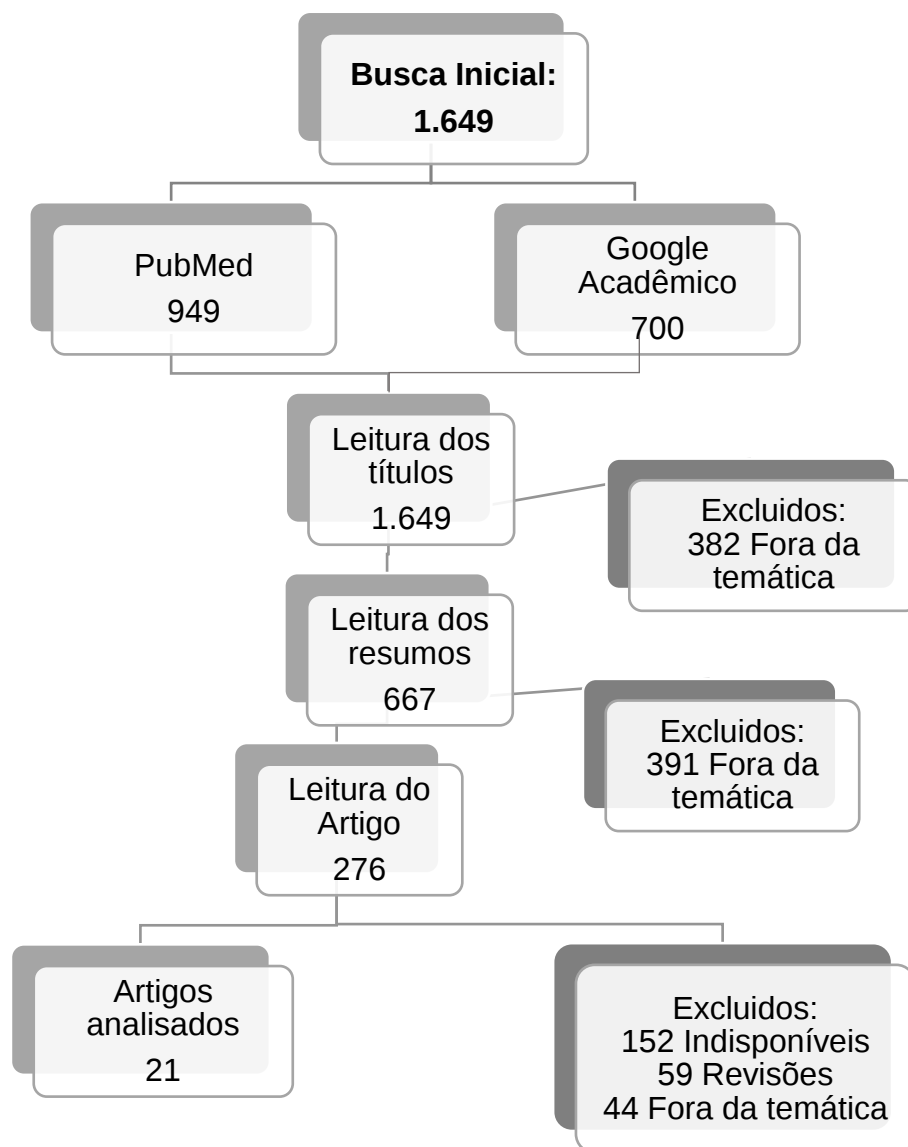
Após a coleta dos artigos, os títulos e resumos dos mesmos foram lidos, aqueles que não atendiam aos critérios de inclusão e as repetições foram excluídos. Os artigos selecionados, após a leitura dos títulos e resumos, foram lidos na íntegra, e os selecionados tiveram seus resultados analisados e comparados.

RESULTADOS

Esta revisão partiu, inicialmente de 1.649 artigos completos publicados em duas bases de dados (PubMed e Google Acadêmico), sendo 949 artigos da base de dados PubMed e 700 do Google Acadêmico. Na análise das buscas, obedecendo os critérios de inclusão e exclusão, a filtragem dos artigos aconteceu da seguinte maneira: Após a leitura dos títulos 982 foram excluídos, posteriormente foi realizado

a leitura dos resumos dos artigos restantes, nessa etapa, foram excluídos 391 artigos. Dos 276 artigos restantes, foram excluídos 255 por não estarem disponíveis gratuitamente, estarem fora da temática ou serem revisão da literatura, por fim, foram selecionados 21 artigos de acordo com os critérios de inclusão (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma mostrando as etapas da pesquisa bibliográfica nas bases de dados.



Total de artigos excluídos: 1628

No presente estudo foram analisados vinte e um artigos científicos que tratavam de compostos naturais bioativos indutores da produção de colágeno na pele. Os artigos selecionados relatam o tema proposto de forma clara e objetiva, e tiveram seus objetivos e principais resultados descritos no quadro 1.

Quadro 1 – Compostos naturais bioativos da produção de colágeno cutâneo de acordo com as publicações de 2018-2022

Nº	Autor	Agente indutor	Principais resultados
1º	Seo <i>et al.</i> , 2018	<i>Borago officinalis</i> L. (BO)	O BO reduziu a formação de rugas e o eritema na pele exposta a UVB. Melhorou a hidratação da pele e a síntese de colágeno. Diminuiu a expressão das metaloproteinases MMP-1 e MMP-3, também foi capaz de aumentar a liberação de TGF- β 1.
2º	Hu <i>et al.</i> , 2019	Exossomos derivados de esferoides de culturas tridimensionais de fibroblastos dérmicos humanos 3D (3D HDF-XOs) e de monocamadas (2D HDF-XOs).	Os (3D HDF-XOs) provocaram aumento na expressão de pró-colágeno tipo I. Provocaram uma diminuição significativa na expressão da MMP-1. Demonstraram um nível maior de depósito de colágeno dérmico.
3º	Lorz <i>et al.</i> , 2019	<i>Pradosia mutisii</i>	O extrato de <i>Pradosia mutisii</i> demonstrou atividade protetora contra os raios UVB e H ₂ O ₂ , suprimiu a expressão de MMPs e aumentou a expressão do gene do colágeno tipo I (Col1A1).
4º	Schütz <i>et al.</i> , 2019	Ácido hidroxiesteárico (HSA).	O HSA inibiu a expressão do gene de MMP-1. Aumentou os níveis de

			colágeno tipo I e III dose dependente (96% e 244%, $P < 0,01$). HSA mostrou uma redução significativa da superfície e do volume dos poros da pele após 8 semanas.
5°	Suzuki <i>et al.</i> , 2019	Extrato etanólico do âmbar Kuji (EtOH ext.) Extrato fluido de dióxido de carbono supercrítico do âmbar Kuji (scCO₂ ext.)	Os dois extratos promoveram a produção de colágeno em células de fibroblastos de pele humana. Mas o scCO ₂ ext. teve uma atividade mais significativa na promoção da síntese de colágeno.
6°	Cui <i>et al.</i> , 2020	Injeções de ácido hialurônico (CL-HÁ).	As injeções de CL-HÁ promoveram o preenchimento dos espaços da MEC. E aumento da expressão de genes de colágeno que induzem a produção e o depósito de colágeno na matriz extracelular.
7°	Fang <i>et al.</i> , 2020	<i>Poria cocos</i>	O extrato de <i>Poria cocos</i> reduziu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e consequentemente inibiu de forma significativa a expressão gênica das MMPs.
8°	Gref <i>et al.</i> , 2020	Vitamina C Lipofílica	A Vitamina C aumentou significativamente a espessura epidérmica e principalmente a produção de colágeno tipo III.
9°	Her <i>et al.</i> , 2020	<i>Aronia melanocarpa</i> .	Os danos epidérmicos induzidos por UVB aos camundongos tratados com o extrato de <i>Aronia melanocarpa</i> foram significativamente melhorados em comparação aos que não

			receberam o tratamento. O extrato também atenua a ruptura do colágeno causado por UVB reduzindo assim o dano causado a esse tecido.
10°	Hwang <i>et al.</i> , 2020	Peptídeo humano derivado de COL1A2.	O peptídeo demonstrou melhorar a síntese de colágeno tipo I, e a proliferação e migração celular.
11°	Song <i>et al.</i> , 2020	Emodina (composto que pode ser isolado de diversas ervas chinesas)	As análises demonstraram que a emodina contribui de maneira bastante significativa para a produção de colágeno tipo I.
12°	Zhang <i>et al.</i> , 2020	Coativador gama coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α)	Perceberam que PGC-1 α impediu a ativação da autofagia pelo fator de crescimento beta (TGF β), consequentemente houve a redução dos fibroblastos para miofibroblastos, logo ocorreu a diferenciação e liberação de colágeno no meio.
13°	Andrade <i>et al.</i> , 2021	Cramoll livre e aprisionada em uma membrana de xyloglucana extraída de <i>Hymenaea courbaril</i> (HcXM).	Observaram que a Cramoll livre induz a retração da ferida de forma superior em relação aos outros grupos. Observaram também que a Cramoll e a HcXM provoque o depósito de colágeno separadamente.
14°	Chae <i>et al.</i> , 2021	Peptídeos de colágeno AP, hidrolisados ricos em tripeptídeos de colágeno contendo 3% de glicina-prolinahidroxiprolina (Gly-Pro-Hyp, GPH) da pele do peixe.	Observaram que o peptídeo de colágeno AP recupera a inibição do colágeno tipo I mediada pelo cortisol em fibroblastos humanos senescentes. Os peptídeos ingeridos por via oral aumentam também a quantidade de peptídeos essenciais

			para a formação do colágeno no organismo.
15°	Chowdhury et al., 2021	Polifenóis	Com a exposição a raios UV a deposição de elastina insolúvel foi de 30 a 45 vezes maior. Além disso, o tratamento com a exposição aos raios solares também aumentou a deposição de colágeno nos fibroblastos dérmicos humanos.
16°	Hwang et al., 2021	Proteínas derivadas do gene da cadeia α -1 de colágeno tipo I (hCOL1A1)	Identificaram que o gene hCOL1A1-CED recombinante induz a síntese de colágeno nesses fibroblastos e estimula também a proliferação celular.
17°	Solomonov et al., 2021	Lumenato	O Lumenato foi capaz de impedir os danos causados por neutrófilos ativados ao colágeno III de forma dose dependente. Também foi capaz de estimular baixa síntese de colágeno tipo III, podendo ser indicado como um agente protetor da pele humana.
18°	Yurina et al., 2021	Angiogenina recombinante isolada de leveduras <i>Pichia pastoris</i>	A angiogenina estimulou a proliferação de fibroblastos, um aumento na densidade dos vasos sanguíneos e também estimulou a formação das fibras de colágeno e aumento da densidade das fibras.
19°	Aly et al., 2022	Proteína 50kDa 100% de levedura idêntica ao N-	A proteína demonstrou estimular a produção de colágeno tipo I e III por fibroblastos dérmicos humanos

		terminal do colágeno tipo III humano.	primários. Também demonstrou ser segura para administrações tópicas em pele humana e compatibilidade com a maioria das formulações existentes.
20°	Lee <i>et al.</i> , 2022	extrato de <i>Aronia melanocarpa</i>	O extrato de <i>Aronia melanocarpa</i> aumentou a transcrição de mRNA Col1A1 (Gene responsável pela síntese do colágeno tipo I) dose dependente. Inibiu a expressão de MMP-1 e MMP-3.
21°	Sanada <i>et al.</i> , 2022	Exossomos de células-tronco/progenitoras dérmicas (DSPC)	Com os exossomos a expressão de mRNA COL1A1 foi regulada positivamente e dependente de Akt. Já com exossomos de fibroblastos essa regulação não foi significativa.

O colágeno é fundamental para a sustentação da pele, para o preenchimento da matriz extracelular e também para o processo cicatricial de feridas. Pesquisas voltadas para o estímulo da sua síntese possuem um grande valor científico, pois em determinada fase da vida todos os seres humanos tendem a iniciar a redução da sua produção, com isso cada vez mais o indivíduo irá perder o preenchimento da MEC e terá uma pele menos firme, mais enrugada e uma menor capacidade de cicatrização (Solomonov *et al.*, 2021).

Dentro das possibilidades de indução de colágeno, percebe-se que existem diversos estudos promissores que utilizam-se de várias estratégias para tentar estimular a síntese. Algumas utilizam produtos derivados de plantas, extratos e moléculas, outros microrganismos como fungos e também a utilização de moléculas endógenas do organismo, como peptídeos e genes produzidos por células humanas para estimular a síntese de colágeno (Hwang *et al.*, 2021).

É comum também a utilização de ácidos na pele para reduzir as manchas aparentes ao envelhecimento. Em seu estudo Schütz e colaboradores (2019) analisaram a capacidade do ácido hidroxiesteárico (HSA) em reduzir as manchas

aparentes na pele, causadas pelo envelhecimento. O HSA foi capaz de reduzir as manchas, também reduzir os poros da pele. Além disso, inibiu a expressão do gene de MMP-1, enzima essa muito importante na degradação das fibras de colágeno e aumentou os níveis de colágeno tipo I e III.

A análise de extratos de plantas é algo bastante difundido na ciência, muitos deles, derivados de várias plantas e de partes diferentes apresentam atividades biológicas. Ao analisar a atividade de uma lectina extraída das sementes da planta *Cratilya mollis*, Andrade e colaboradores (2021) identificaram que essa lectina a (Cramoll) além de acelerar o processo cicatricial de feridas cutâneas, também estimula o depósito de colágeno tipo I.

O estudo de fungos também é muito importante para o desenvolvimento de medicamentos, Fang e colaboradores (2020) investigaram o efeito protetor da pele pelo extrato de *Poria cocos* induzido por estresse oxidativo. O extrato reduziu o acúmulo de ROS e a morte celular induzida por H₂O₂ de forma significativa. E suprimiu a expressão genica de MMPs.

Existem vários estudos com peptídeos de colágeno voltados a estimular a produção ou formação das fibras de colágeno. Chae e colaboradores (2021) analisaram a capacidade do colágeno AP, hidrolisados ricos em tripeptídeos de colágeno contendo 3% de glicina-prolinahidroxiprolina (Gly-Pro-Hyp, GPH) da pele do peixe em impedir que o cortisol iniba a síntese de colágeno em fibroblastos humanos. Como mencionado, alterações no ciclo circadiano podem afetar a produção do colágeno e acelerar o envelhecimento da pele, por isso é importante uma proteção para o colágeno contra o cortisol. O peptídeo AP foi capaz de recuperar a inibição do colágeno realizada pelo cortisol em fibroblastos humanos senescentes.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, percebe-se que existe uma variedade de estudos voltados a busca de produtos que induzem a produção de colágeno na literatura. Dentre esses, essa revisão demonstrou que existem vários compostos que apresentaram resultados promissores, com propriedades tanto de estímulo, quanto de proteção e também que inibem substâncias importantes para a degradação do colágeno como as MMPs.

REFERÊNCIAS

- ALY, N.; BENOIT, E.; CHAUBARD, J.; CHINTALAPUDI, K.; CHOUNG, S.; LEEUW, M.; DIAZ, M.; DUEPPEN, D.; FERRARO, B.; FISCHETTI, V.; GASSAWAY, E.; HANSENNE-CERVANTES, I.; HEERES, A.; KARAS, C.; KHAN, M.; KRAL, J. M.; LAM, S.; LARTEY, R.; LEONARD, M.; LUE, S. W.; MCDANIEL, J.; RAMIREZ, K.; RAUW, B.; RAYMOND, K. A.; ROGGERO-LOVISI, C.; RUBIN, S.; RUEBLING-JASS, K.; SPIEGELHOFF, Z.; STEWART, M. C.; VAJPEYI, S.; VICENTE, A.; VINCENT, K. E.; WANG, J.; WILLIAMSON, D.; DAI, Z. Y. L. Cosmetic potential of a recombinant 50 kda protein. **Cosmetics**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1-13, 5 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cosmetics9010008>.
- ANDRADE, F. M.; NEVES, F. P.A.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; ARAGÃO-NETO, A. C.; JANDÚ, J. J. B.; COELHO, L. C. B. B.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; TEIXEIRA, Á. A. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Healing activities of Cramoll and xyloglucan membrane in cutaneous wounds of diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 13, 21 mai. 2021
- BOLKE, L.; SCHLIPPE, G.; GERSS, J.; VOSS, W. and. A collagen supplement improves skin hydration, elasticity, roughness, and density: Results of a randomized, placebo-controlled, blind study. **Nutrients**, [S. l.], v. 11, p. 1-14, 17 out. 2019. DOI <https://doi.org/10.3390/nu11102494>.
- CHAE, M.; BAE, I.; LIM, S.; JUNG, K.; ROH, J.; KIM, W. AP Collagen peptides prevent cortisol-induced decrease of collagen type i in human dermal fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, p. 1-14, 30 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms22094788>.
- CHOWDHURY, A.; NOSOUDI, N.; KARAMCHED, S.; PARASARAM, V.; VYAVAHARE, N. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; Implications to improve skin health. **Journal of dermatological science**, [S. l.], p. 94-100, 1 maio 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2021.03.002>.
- CSEKES, E.; RAČKOVÁ, L. and. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 23, p. 1-51, 23 nov. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms222312641>.
- CUI, Y.; WANG, F.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. rejuvenation of aged human skin by injection of cross-linked hyaluronic acid. **Journal of the american society of plastic surgeons**, [S. l.], p. 43-49, 28 set. 2020. DOI [10.1097/PRS.00000000000007620](https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000007620).
- FANG, C.; PAUL, C. R.; DAY, C. H.; CHANG, R.; KUO, C.; HO, T. J.; HSIEH, D. J.; VISWANADHA, V. P.; KUO, W.; HUANG, C. Poria cocos (Fuling) targets TGFβ/Smad7 associated collagen accumulation and enhances Nrf2-antioxidant mechanism to exert anti-skin aging effects in human dermal fibroblasts. **Wiley periodicals llc. environmental toxicology**, [S. l.], v. 36, p. 729–736, 27 nov. 2020. DOI [10.1002/tox.23075](https://doi.org/10.1002/tox.23075).

GRAF, R.; DELOMÉNIE, C.; MAKSIMENKO, A.; GOUADON, E.; PERCOCO, G.; LATI, E.; DESMAËLE, D.; ZOUHIRI, F.; COUVREUR, P. Vitamin C–squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, p. 1-12, 9 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72704-1>

HER, Y.; LEE, T.; KIM, J. D.; KIM, B.; SIM, H.; LEE, J. C.; AHN, J. H.; PARK, J. H.; WON, J.; HONG, J.; KIM, S. Topical application of aronia melanocarpa extract rich in chlorogenic acid and rutin reduces uvb-induced skin damage via attenuating collagen disruption in mice. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 19, p. 1-14, 7 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules25194577>

HU, S.; LI, Z.; CORES, J.; HUANG, K.; SU, T.; DINH, P.; CHENG, K. Needle-Free injection of exosomes derived from human dermal fibroblast spheroids ameliorates skin photoaging. **Author manuscript**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 11273–11282, 22 out. 2019. DOI [10.1021/acsnano.9b04384](https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04384).

HWANG, S. J.; HA, G. H.; SEO, W. Y.; KIM, C. K.; KIM, K. J.; LEE, S. B. Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs). **BMB Reports**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 539-544, 20 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.10.120>.

HWANG, S. J.; KIM, S. H.; SEO, W.; JEONG, Y.; SHIN, M. C.; RYU, D.; LEE, S. B.; CHOI, Y. J.; KIM, K. J. Effects of human collagen α -1 type I-derived proteins on collagen synthesis and elastin production in human dermal fibroblasts. **BMB Reports**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 329-334, 26 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.6.038>.

KISIEL, M. A.; KLAR, A. S. Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. **Skin Tissue Engineering Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1993, p. 71-78, 1 maio 2019. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_6.

LEE, H. R.; RYU, H. G.; LEE, Y.; PARK, J. A.; KIM, S.; LEE, C. E.; JUNG, S.; LEE, K. H. Effect of Aronia Extract on Collagen Synthesis in Human Skin Cell and Dermal Equivalent. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, p. 1-10, 8 ago. 2022. DOI <https://doi.org/10.1155/2022/4392256>.

LORZ, L. R.; YOO, B. C.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-wrinkling and anti-melanogenic effect of pradosia mutisii methanol extract. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, p. 1-18, 27 fev. 2019. DOI [10.3390/ijms20051043](https://doi.org/10.3390/ijms20051043).

SANADA, A.; YAMADA, T.; HASEGAWA, S.; ISHII, Y.; HASEBE, Y.; IWATA, Y.; ARIMA, M.; SUGIURA, K.; AKAMATSUB, H. enhanced type I collagen synthesis in fibroblasts by dermal stem/progenitor cell-derived exosomes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 45, p. 872-880, 15 abr. 2022. DOI <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-01084>.

SCHÜTZ, R.; RAWLINGS, A. V.; WANDERLER, E.; JACKSON, E.; TREVISAN, S.; BENDIK, E.; MASSIRONI, M.; IMFELD, D. Bio-derived hydroxystearic acid improves

age spots visible skin and pores. **International Journal of Cosmetic Science**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 240-256, 7 abr. 2019. DOI <https://doi.org/10.1111/ics.12529>.

SEO, S. A.; PARK, B.; HWANG, E.; PARK, S. Borago officinalis L. attenuates UVB-induced skin photodamage via regulation of AP-1 and Nrf2/ARE pathway in normal human dermal fibroblasts and promotion of collagen synthesis in hairless mice. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 107, p. 178-186, 1 jul. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.02.017>.

SHIN, J. W.; KWON, S. H.; CHOI, J. Y.; NA, J. I.; HUH, C. H.; CHOI, H. R.; PARK, K. C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, [S. l.], v. 20, p. 1-16, 29 abr. 2019. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>.

SOLOMONOV, Y.; HADAD, N.; PIKOVSKYI, O.; LEVY, R. Lumenato protects normal human dermal fibroblasts from neutrophil-induced collagen-3 damage in co-cultures. **Plos one**, [S. l.], p. 1-17, 17 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248183>.

SONG, P.; JO, H.; SHIM, W.; KWON, Y. W.; BAE, S.; KWON, Y.; AZAMOV, B.; HUR, J.; LEE, D.; RYU, S. H.; YOON, J. H. Emodin induces collagen type I synthesis in Hs27 human dermal fibroblasts. **Experimental and therapeutic medicine**, [S. l.], v. 21, n. 420, p. 1-8, 17 dez. 2020. DOI [10.3892/etm.2021.9864](https://doi.org/10.3892/etm.2021.9864)

SUZUKI, S.; ABE, J.; KUDO, Y.; SHIRAI, M.; KIMURA, K. Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 84, p. 518-525, 22 nov. 2019. DOI <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1693251>.

YURINA, N. V.; AGEEVA, T. A.; GORYACHKIN, A. M.; VARAKSIN, N. A.; RYABICHEVA, T. G.; OSTANIN, A. A.; CHERNYKH, E. R.; ROMASHCHENKO, A. V.; PROSKURINA, A. S.; BOGACHEV, S.; PURTOV, A. V. Effects of recombinant angiogenin on collagen fiber formation and angiogenesis in the dermis of wistar rats. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, [S. l.], v. 14, p. 187–196, 2 fev. 2021. DOI <https://doi.org/10.2147/CCID.S294825>.

ZHANG, Y.; SHEN, L.; ZHU, H.; DREISSIGACKER, K.; DISTLER, D.; ZHOU, X.; GYÖRFI, A. H.; BERGMANN, C.; MENG, X.; DEES, C.; TRINH-MINH, T.; LUDOLPH, I.; HORCH, R.; RAMMING, A.; SCHETT, G.; DISTLER, J. H. W. PGC-1 α regulates autophagy to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. **Translational science**, [S. l.], v. 79, p. 1227–1233, 16 maio 2020. DOI [10.1136/annrheumdis-2020-216963](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-216963).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Cramoll é uma lectina com atividades biológicas comprovadas, apresentando dentro dessas atividades a capacidade de acelerar a cicatrização de feridas promovendo uma maior deposição de colágeno tipo 1. Quando essa lectina está imobilizada no gel de Galactomanana, mantém a sua atividade e se torna estável dentro de um período de 30 dias, além disso o gel permite que ela seja liberada gradativamente no meio. A Cramoll estimulou a síntese de fibras de colágeno por células Vero em todas as concentrações analisadas. Além disso, o tempo de exposição interferiu diretamente nessa síntese, apresentando valores próximos de concentração de colágeno entre as dosagens de 0,2mg/ml e 0,4mg/ml no tempo mais prolongado (72 horas). Imobilizada no gel de galactomana manteve a sua atividade indutora e se mostrou mais eficaz na maior concentração analisada (0,4mg/ml). Comprovando a sua atividade bioestimuladora de colágeno e com isso ser uma excelente candidata a fármaco antienvelhecimento da pele. A literatura mostra o estudo de diversos compostos e a busca crescente por fármacos com essa característica, exaltando a importância da atividade dessa lectina.

REFERÊNCIAS

ALAM, M.; HUGHART, R.; CHAMPLAIN, A.; GEISLER, A.; PAGHDAL, K.; WHITING, D.; HAMMEL, J. A.; MAISEL, A.; RAPCAN, M. J.; WEST, D. P.; POON, E. Effect of Platelet-Rich Plasma Injection for Rejuvenation of Photoaged Facial Skin: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Dermatology** [S. l.], v. 154, n. 12, p. 1447–1452., 7 nov. 2018. DOI 10.1001/jamadermatol.2018.3977.

ALBANO, R. P. S.; PEREIRA, L. P.; ASSIS, I. B. Microagulhamento: a terapia que induz a produção de colágeno – revisão de literatura. **Revista Saúde em Foco**, [S. l.], n. 10, p. 1-19, 12 jun. 2018. Disponível em: <https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/07/058>

ALBUQUERQUE, P. B. S.; BARROS, W. Jr.; SANTOS, G. R. C.; CORREIA, M. T. S.; MOURÃO, P. A. S.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 104, p. 127-134, 10 jan. 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.010>.

ALBUQUERQUE, P. B. S.; SILVA, C. S.; SOARES, P. A.G.; BARROS, W. J.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CUNHA, M. G. C. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 454-461, 1 fev. 2016.

ALBUQUERQUE, P. B. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Immobilization of bioactive compounds in *Cassia grandis* galactomannan-based films: Influence on physicochemical Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 96, p. 727-735, 1 jan. 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.081>.

ALY, N.; BENOIT, E.; CHAUBARD, J.; CHINTALAPUDI, K.; CHOUNG, S.; LEEUW, M.; DIAZ, M.; DUEPPEN, D.; FERRARO, B.; FISCHETTI, V.; GASSAWAY, E.; HANSENNE-CERVANTES, I.; HEERES, A.; KARAS, C.; KHAN, M.; KRAL, J. M.; LAM, S.; LARTEY, R.; LEONARD, M.; LUE, S. W.; MCDANIEL, J.; RAMIREZ, K.; RAUW, B.; RAYMOND, K. A.; ROGGERO-LOVISI, C.; RUBIN, S.; RUEBLING-JASS, K.; SPIEGELHOFF, Z.; STEWART, M. C.; VAJPEYI, S.; VICENTE, A.; VINCENT, K. E.; WANG, J.; WILLIAMSON, D.; DAI, Z. Y. L. Cosmetic Potential of a Recombinant 50 kDa Protein. **Cosmetics**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1-13, 5 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cosmetics9010008>.

ANDRADE, F. M.; NEVES, F. P.A.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; ARAGÃO-NETO, A. C.; JANDÚ, J. J. B.; COELHO, L. C. B. B.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; TEIXEIRA, Â. A. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Healing activities of Cramoll and xyloglucan membrane in cutaneous wounds of diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 100045, 21 mai. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.regen.2021.100045>

ARAVIISKAIA, E.; BERARDESCA, E.; BIEBER, T.; GONTIJO, G.; VIERA, M. S.; CHUBERRE, Skin damage by tropospheric ozone. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 33, p. 1496–1505, 18 jan. 2019. DOI <https://doi.org/10.1007/s00105-018-4319-y>.

BOLKE, L.; SCHLIPPE, G.; GERSS, J.; VOSS, W. and. A Collagen Supplement Improves Skin Hydration, Elasticity, Roughness, and Density: Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Blind Study. **Nutrients**, [S. l.], v. 11, n. 2494, 17 out. 2019. DOI <https://doi.org/10.3390/nu11102494>.

BOO, Y. C. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 9, n. 1663, 26 ago. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/antiox11091663>.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, And G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature**, [S. l.], v. 6, p. 328–340, 1 abr. 2005. DOI 10.1038/nrm1619

CARLA, B. Y. PHD lança linha de Bioestimuladores com Hidroxiapatita de Cálcio 10%. **Phd do brasil**, 14 abr. 2020. Disponível em: <https://phddobrasil.com.br/phd-lanca-linha-de-bioestimuladores-com-hidroxiapatita-de-calcio-10/>.

CARNEIRO, M. A. M. S.; SILVA, L. S.; DINIZ, R. M.; SAMINEZ, W. F. S.; OLIVEIRA, P. V.; MENDONÇA, J. S. P.; CALOSSO, A. H. M.; SILVA, I. S. S.; JANDÚ, J. J. B.; SÁ, J. C.; FIGUEIREDO, C. S. S. S.; CORREIRA, M. T. S.; SILVA, L. C. N. Immunomodulatory and anti-infective effects of Cratylia mollis lectin (Cramoll) in a model of wound infection induced by Staphylococcus aureus. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 100, p. 108094, 8 set. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108094>.

CHAE, M.; BAE, I; LIM, S; JUNG, K; ROH, J; KIM, W. AP Collagen Peptides Prevent Cortisol-Induced Decrease of Collagen Type I in Human Dermal Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 4788, 30 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms22094788>.

CHOWDHURY, A.; NOSOUDI, N.; KARAMCHED, S.; PARASARAM, V.; VYAVAHARE, N. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts: Implications to improve skin health. **Journal of dermatological science**, [S. l.], p. 94-100, 1 maio 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2021.03.002>.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S; OLIVEIRA, W. F.; MOURA, M. C.; PONTUAL, E. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIRA, M. T. S. Lectins as Antimicrobial Agents. **Applied Microbiology**, [S. l.], v. 125, p. 1238-1252, 1 nov. 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/jam.14055>.

COLE, M. A.; QUAN, T.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 12, p. 35-43, 17 fev. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0459-1>.

CORREIA, M. T.; COELHO, L. C. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol**, [S. l.], v. 55, p. 261-273, 31 jan. 1995. DOI: 10.1007/BF02786865

CSEKES, E.; RAČKOVÁ, L. and. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 12641, p. 1-51, 23 nov. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms222312641>.

CUI, Y.; WANG, F.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of Cross-linked Hyaluronic Acid. **Journal of The American Society of Plastic Surgeons**, [S. l.], p. 43-49, 28 set. 2020. DOI 10.1097/PRS.00000000000007620.

CUNHA, C. R. A.; SILVA, L. C. N.; ALMEIDA, F. J. F.; FERRAZ, M. S.; VAREJÃO, N.; CARTAXO, M. F. S.; MIRANDA, R. C. M.; AGUIAR JR, F. C. A.; SANTOS, N. P. S.; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CORREIRA, M. T. S. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 7, p. 1-11, 16 set. 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.01355.

DAYAN, S. H.; BACOS, J. T.; HO, T. T.; GANDHI, N. D.; GUTIERREZ-BORST, S.; KALBAG, A. Topical skin therapies in subjects undergoing full facial rejuvenation. **Journal of cosmetic dermatology**, [S. l.], p. 798-805, 1 abr. 2019. DOI 10.1111/jocd.12977.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **Resolução nº 58, de 24 de fevereiro de 2023**. PLC 70/2014. [S. l.]: IMPRENSA NACIONAL, ano 41, p. 1-8, 1 mar. 2023. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-58-de-24-de-fevereiro-de-2023-466792333?trk=public_post_comment-text.

DISNER, G. R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. **Evidência: Biociências, Saúde e Inovação**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 259-274, 1 dez. 2019. DOI <https://orcid.org/000-0002-4561-1361>.

FALLAH, H.; RADEMAKER, M. Isotretinoin in the management of acne vulgaris: practical prescribing. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 451-460, 29 ago. 2020. DOI 10.1111/ijd.15089.

FANG, C.; PAUL, C. R.; DAY, C. H.; CHANG, R.; KUO, C.; HO, T. J.; HSIEH, D. J.; VISWANADHA, V. P.; KUO, W.; HUANG, C. Poria cocos (Fuling) targets TGFβ/Smad7 associated collagen accumulation and enhances Nrf2-antioxidant mechanism to exert anti-skin aging effects in human dermal fibroblasts. **Wiley Periodicals LLC. Environmental Toxicology**, [S. l.], v. 36, p. 729–736, 27 nov. 2020. DOI 10.1002/tox.23075.

GAUTAM, A. K.; SHARMA, D.; SHARMA, J.; SAINI, K. C. Legume lectins: Potential use as diagnostics and therapeutics against the cancer. **Journal Pre-proofs**, [S. l.], v. 142, n. 1, p. 474-483, 16 set. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119>.

GEAHCHAN, S.; BAHARLOUEI, P.; RAHMAN, A. Marine collagen: A promising biomaterial for wound healing, skin anti-aging, and bone regeneration. **Marine drugs**, [S. l.], v. 20, p. 1-16, 10 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/md20010061>.

REF, R.; DELOMÉNIE, C.; MAKSIMENKO, A.; GOUADON, E.; PERCOCO, G.; LATI, E.; DESMAËLE, D.; ZOUHIRI, F.; COUVREUR, P. Vitamin C–squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. **Scientific reports**, [S. l.], v. 10, n. 16883, 9 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72704-1>.

HEINZ, A. Elastic fibers during aging and disease. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], v. 66, n. 101255, 9 jan. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101255>.

HER, Y.; LEE, T.; KIM, J. D.; KIM, B.; SIM, H.; LEE, J. C.; AHN, J. H.; PARK, J. H.; WON, J.; HONG, J.; KIM, S. Topical application of aronia melanocarpa extract rich in chlorogenic acid and rutin reduces UVB-Induced skin damage via attenuating collagen disruption in mice. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 4577, 7 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules25194577>

HO, C. Y.; DREESSEN, O. Faces of cellular senescence in skin aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, [S. l.], v. 198, n. 111525, 21 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111525>.

HU, S.; LI, Z.; CORES, J.; HUANG, K.; SU, T.; DINH, P.; CHENG, K. Needle-Free injection of exosomes derived from human dermal fibroblast spheroids ameliorates skin photoaging. **Author manuscript**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 11273–11282, 22 out. 2019. DOI 10.1021/acsnano.9b04384.

HUANG, Y.; CHENG, Y. C. Isotretinoin treatment for acne and risk of depression: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 1068-1076, 9 mar. 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.12.028>.

HULDANI, H.; RASHID, A. I.; TURAEV, K. N.; OPULENCIA, M. J. C.; ABDELBASSET, W. K.; BOKOV, D. O.; MUSTAFA, Y. F.; AL-GAZALLY, M. E.; HAMMID, A. T.; KADHIM, M. M.; AHMADI, S. H. Concanavalin A as a promising lectin-based anti-câncer agent: The molecular mechanisms and therapeutic potential. **Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 20, n. 167, 28 out. 2022. DOI <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00972-7>.

HWANG, S. J.; HA, G. H.; SEO, W. Y.; KIM, C. K.; KIM, K. J.; LEE, S. B. Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs). **BMB Reports**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 539-544, 20 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.10.120>.

HWANG, S. J.; KIM, S. H.; SEO, W.; JEONG, Y.; SHIN, M. C.; RYU, D.; LEE, S. B.; CHOI, Y. J.; KIM, K. J. Effects of human collagen α -1 type I-derived proteins on collagen synthesis and elastin production in human dermal fibroblasts. **BMB Reports**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 329-334, 26 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.6.038>.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Os componentes fibrilares e fibrosos (colágenos e elastina) da matriz desempenham várias funções nos tecidos. *In*: JUNQUEIRA, L. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koonga, 2012. cap. 12, p. 240-255.

KOVACIK, A.; TVRDA, E.; JAMBOR, T.; FULOPOVA, D.; KOVACIKOVA, E.; HLEBA, L.; KOŁODZIEJCZYK, L. M.; HLEBOVA, M.; GREN, A.; MASSANYI, P. Cytotoxic effect of aminoglycoside antibiotics on the mammalian cell lines. **Journal of Environmental Science and Health**, [S. l.], p. 1-8, 10 out. 2020. DOI 10.1080/10934529.2020.1830653.

KISIEL, M. A.; KLAR, A. S. Isolation and culture of human dermal fibroblasts. **Skin Tissue Engineering Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1993, p. 71-78, 1 maio 2019. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_6.

LAING, S.; BIELFELDT, S.; EHRENBURG, C.; WILHELM, K. A dermonutrient containing special collagen peptides improves skin structure and function: a randomized, placebo-controlled, triple-blind trial using confocal laser scanning microscopy on the cosmetic effects and tolerance of a drinkable collagen supplement. **Journal Of Medicinal Food**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 147-152, 31 jan. 2020. DOI 10.1089/jmf.2019.0197.

LEE, H. R.; RYU, H. G.; LEE, Y.; PARK, J. A.; KIM, S.; LEE, C. E.; JUNG, S.; LEE, K. H. Effect of aronia extract on collagen synthesis in human skin cell and dermal equivalent. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, n. 4392256, 8 ago. 2022. DOI <https://doi.org/10.1155/2022/4392256>.

LENIO ALVARENGA (Brasil). 28, out, 2015. Risco de teratogenicidade associado ao uso de Roacutan (isotretinoína)., São Paulo, p. 1-4, 28 out. 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/cartas-aos-profissionais-de-saude/2015/roacutan-r-isotretinoina-2013-risco-de-teratogenicidade-associada-ao-uso-do-medicamento-roche-29-de-outubro-de-2015/view>.

LORZ, L. R.; YOO, B. C.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-wrinkling and anti-melanogenic effect of pradosia mutisii methanol extract. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1043, 27 fev. 2019. DOI 10.3390/ijms20051043.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [S. l.], v. 25, p. 283-289, 25 ago. 2017. DOI 10.1016/j.fsc.2017.03.001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 28 mai. 1951.

LUBOV, J. E.; KEMP, W. C. The impact of the circadian clock on skin physiology and cancer development. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 6112, 6 jun. 2021. DOI 10.3390/ijms22116112.

MANTUANO, N. R.; NATOLI, M.; ZIPPELIUS, A.; LÄUBLI, H. Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [S. l.], v. 8, p. 1-12, 28 ago. 2020. DOI 10.1136/jitc-2020-001222.

MARINHO, A.; NUNES, C.; REIS, De S. Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the therapy of Inflammation. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, p. 1-34, 15 out. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/biom11101518>.

MELO, C. M. L.; PIAM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], p. 163-169, 30 abr. 2010. DOI 10.1007/s11010-010-0480-z.

MELO A, C. M. L.; PORTO, C. S. P.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEÃO, A. M. A. C.; CORREIA, M. T. S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 408, p. 113-119, 16 fev. 2011. DOI 10.1016/j.ijpharm.2011.02.011.

MICHALAK, M. Plant-Derived Antioxidants:: Significance in Skin Health and the Ageing Process. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], p. 1-29, 6 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms23020585>.

MONTEIRO, M. R.; TERSARIO, I. L. S.; LUCENA, S. V.; MOURA, G. E. D. D.; STEINER, D. Culture of human dermal fibroblasts in the presence of hyaluronic acid and polyethylene glycol: Effects on cell proliferation, collagen production, and related enzymes linked to the remodeling of the extracellular matrix. **Surgical & cosmetic dermatology (Impresso)**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 222-225, 10 set. 2013.

MOON, S; KIM, D. H.; SHIN, And J. U. In Vitro Models Mimicking Immune Response in the Skin. **Yonsei Medical Journal**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. 969-980, 24 set. 2021. DOI 10.3349/ymj.2021.62.11.969.

NASCIMENTO, C. O.; COSTA, R. M. P. B.; SOARES, P. A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, T. P.; LIMA, C. A.; BEZERRA, R. P.; TEIXEIRA, J. A.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, T. S.; CARNEIRODA- CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F. Purification of a lectin from *Cratylia mollis* crude extract seed by a single step PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 1-10, 18 fev. 2020. DOI 10.1080/10826068.2020.1725771.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, p. 1-53, 12 abr. 2019. DOI 10.3390/ijms20081811.

OLIVEIRA, C. **Efeitos colaterais do Roacutan e contraindicações do remédio para acne**. [S. l.]: área de mulher, 3 maio 2021. Disponível em: <https://areademulher.r7.com/saude/efeitos-colaterais-do-roacutan/>.

OLIVEIRA, P. S. S.; RÊGO, M. J. B. M.; SILVA, R. R.; CAVALCANTI, M. B.; GALDINO, S. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PITTA, M. G. R. Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, [S. l.], n. 263968, 18 mar. 2013. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2013/263968>.

PEREIRA, D. S. T.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-FILHO, N. T.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; CORREIA, M. T. S. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], n. 184538, 14 fev. 2012. DOI 10.1155/2012/184538.

PIMENTEL, J. C. **Um sistema eletroquímico para monitoramento de interações das lectinas de folhas de Bauhinia monandra e de sementes de Cratylia mollis com carboidratos em diferentes meios eletrolíticos**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife, 2006.

PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, RIO DE JANEIRO, v. 1, n. 19, p. 153-164, 17 fev. 2016. DOI <https://doi.org/10.1590/1809-9823.2016.14145>.

PROSSER, I. W.; WHITEHOUSE, L. A.; PARKS, W. C.; STAHL-BACKDAH, M.; HINEK, A.; PARK, P. W.; MECHAM, R. P. Polyclonal antibodies to tropoelastin and the specific detection and measurement of tropoelastin in vitro. **Connective Tissue Research**, [S. l.], v. 25, p. 267-679, 13 jul. 1991. DOI <https://doi.org/10.3109/03008209109029162>.

QUEIROZ, R. T. Fabaceae - Cratylia mollis Mart. ex Benth: Legume plano-achatado, tomentoso. *In*: **Fabaceae - Cratylia mollis Mart. ex Benth**. Fortaleza, 16 jun. 2015. Disponível em: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2011/10/cratylia-mollis-mart-ex-benth.html>.

QUEIROZ, R. T. Novos fenólicos do caule de Cratylia mollis. *In*: **Fabaceae - Cratylia mollis Mart. ex Benth**. Fortaleza, 23 jun. 2015. Disponível em: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2011/10/cratylia-mollis-mart-ex-benth.html>.

RITTIE, L.; FISHER, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], n. 5, n. a015370, 15 jan. 2015. DOI 10.1101/cshperspect.a015370.

ROBERT, L.; ROBERT, A. M.; FULOP, T. Rapid increase in human life expectancy: Will it soon be limited by the aging of elastin?. **Biogerontology**, [S. l.], v. 9, p. 119-133, 4 jan. 2008. DOI 10.1007/s10522-007-9122-6.

ROGER, M.; FULLARD, N.; COSTELLO, L.; BRADBURY, S.; MARKIEWICZ, E.; O'REILLY, S.; DARLING, N.; RITCHIE, P.; MAATTA, A.; KARAKESISOGLOU, L.; NELSON, G.; ZGLINICKI, T. V.; DICOLANDREA, T.; ISFORT, R.; BASCOM, C.; PRZYBORSKI, S. Bioengineering the microanatomy of human skin. **Journal of anatomy**, [S. l.], v. 234, p. 438-455, 10 fev. 2019. DOI 10.1111/joa.12942.

SANADA, A.; YAMADA, T.; HASEGAWA, S.; ISHII, Y.; HASEBE, Y.; IWATA, Y.; ARIMA, M.; SUGIURA, K.; AKAMATSUB, H. Enhanced type I collagen synthesis in fibroblasts by dermal stem/progenitor cell-derived exosomes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 45, p. 872-880, 15 abr. 2022. DOI <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-01084>.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from myracrodruon urundeuva on aedes aegypti. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 149, p. 300-306, 15 ago. 2008. DOI 10.1016/j.cbpc.2008.08.004.

SCARANO, A.; SBARBATI, A.; AMORE, R.; IORIO, E. L.; FERRARO, G.; MARCHETTI, M.; AMUSO, D. The role of hyaluronic acid and amino acid against the aging of the human skin. **A clinical and histological study**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 2296-2304, 21 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1111/jocd.13811>.

SCHMELZE, E. H.; DUC, L. Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. **The FEBS Journal published by John Wiley**, [S. l.], v. 289, n. 13, p. 1-27, 22 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1111/febs.15899>.

SCHÜTZ, R.; RAWLINGS, A. V.; WANDERLER, E.; JACKSON, E.; TREVISAN, S.; BENDIK, E.; MASSIRONI, M.; IMFELD, D. Bio-derived hydroxystearic acid improves age spots visible skin and pores. **International Journal of Cosmetic Science**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 240-256, 7 abr. 2019. DOI <https://doi.org/10.1111/ics.12529>.

SEO, S. A.; PARK, B.; HWANG, E.; PARK, S. Borago officinalis L. attenuates UVB-induced skin photodamage via regulation of AP-1 and Nrf2/ARE pathway in normal human dermal fibroblasts and promotion of collagen synthesis in hairless mice. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 107, p. 178-186, 1 jul. 2018. DOI 10.1016/j.exger.2018.02.017

SHIN, J. W.; KWON, S. H.; CHOI, J. Y.; NA, J. I.; HUH, C. H.; CHOI, H. R.; PARK, K. C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, [S. l.], v. 20, n. 2126, 29 abr. 2019. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>.

SILVA, L. M.; ARAÚJO, L. F. S.; ALVEZ, R. C.; ONO, L.; SÁ, D. A. T.; CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; MACIEL, J. S. Promising alternative gum: Extraction, characterization, and oxidation of the galactomannan of Cassia fistula. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, p. 436-444, 24 set. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.164>.

SILVA, N. C. da; BEZERRA, B. J. da S.; SANTOS, E. de A.; OLIVEIRA, A. G. de A.; PATRICIO, A. da C.; NASCIMENTO, J. M. dos; BEZERRA, L. A.; SANTOS, N. P. da S.; CORREIRA, M. T. dos S.; ANDRADE, F. M. Procedimentos que retardam o envelhecimento cutâneo e modelos experimentais para análise de atividade antienvhecimento. *In: Pesquisas aplicadas em farmácia*. 1. ed. Campina Grande: Editora Science, 2024. cap. 7. Disponível em: 10.56001/22.9786500466386.07.

SILVA, N. C. da; BEZERRA, B. J. da S.; SIMÃO, S. P.; TENÓRIO, F. das C. A. M.; NETO, A. C. A.; SANTOS, N. P. da S.; CORREIRA, M. T. dos S.; ANDRADE, F. M. de. Morfofisiologia da pele e o processo de envelhecimento cutâneo. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S. l.], v. 24, n. 4, n. e16051, 18 abr. 2024. DOI 10.25248/reas.e16051.2024.

SOLOMONOV, Y; HADAD, N.; PIKOVSKYI, O.; LEVY, R. Lumenato protects normal human dermal fibroblasts from neutrophil-induced collagen- 3 damage in co-cultures. **Plos One**, [S. l.], n. e0248183, 17 mar. 2021. DOI 10.1371/journal.pone.0248183.

SONG, P.; JO, H.; SHIM, W; KWON, Y. W.; BAE, S.; KWON, Y; AZAMOV, B; HUR, J.; LEE, D.; RYU, S. H.; YOON, J. H. Emodin induces collagen type I synthesis in Hs27 human dermal fibroblasts. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [S. l.], v. 21, n. 420, n. 420, 17 dez. 2020. DOI 10.3892/etm.2021.9864

SUZUKI, S.; ABE, J.; KUDO, Y.; SHIRAI, M.; KIMURA, K. Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 84, p. 518-525, 22 nov. 2019. DOI <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1693251>.

TAUB, A. F.; PHAM, K. Stem cells in dermatology and anti-aging care of the skin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 425-437, 19 nov. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2018.06.004>.

WILLIAMS, F. M. In vitro studies: how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption?. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 21, p. 199-203, 25 ago. 2006. DOI 10.1016/j.etap.2005.07.009.

WOHLRAB, J.; HILPERT, K.; WOLFF, L. Epidermale Alternsprozesse und Anti-Aging-Strategien. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, [S. l.], v. 67, p. 107-111, 3 dez. 2015. DOI 10.1007/s00105-015-3734-6.

YURINA, N. V.; AGEEVA, T. A.; GORYACHKIN, A. M.; VARAKSIN, N. A.; RYABICHEVA, T. G.; OSTANIN, A. A.; CHERNYKH, E. R.; ROMASHCHENKO, A. V.; PROSKURINA, A. S.; BOGACHEV, S.; PURTOV, A. V. Effects of recombinant angiogenin on collagen fiber formation and angiogenesis in the dermis of wistar rats. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, [S. l.], v. 14, p. 187–196, 2 fev. 2021. DOI <https://doi.org/10.2147/CCID.S294825>.

ZHANG, Y.; SHEN, L.; ZHU, H.; DREISSIGACKER, K.; DISTLER, D.; ZHOU, X.; GYÖRFI, A. H.; BERGMANN, C.; MENG, X.; DEES, C.; TRINH-MINH, T.; LUDOLPH, I.; HORCH, R.; RAMMING, A.; SCHETT, G.; DISTLER, J. H. W. PGC-1 α

regulates autophagy to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. **Translational science**, [S. l.], v. 79, p. 1227–1233, 16 maio 2020. DOI 10.1136/annrheumdis-2020-216963.

ZOUBOULIS, C. C.; GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A. I.; THEODORIDIS, A.; ELEWA, R.; MAKRANTONAKI, E. Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. **Clinics in dermatology**, [S. l.], v. 37, p. 365-372, 1 jul. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.04.002>.

APÊNDECE A - MORFOFISIOLOGIA DA PELE E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO CUTÂNEO



Morfofisiologia da pele e o processo de envelhecimento cutâneo

Skin morphophysiology and the skin aging process

Morfofisiología de la piel y proceso de envejecimiento de la piel

Natan Cordeiro da Silva¹, Bruno José da Silva Bezerra¹, Estefani Pontes Simão², Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório¹, Adelmo Cavalcanti Aragão Neto³, Noemia Pereira da Silva Santos¹, Maria Tereza dos Santos Correia², Fernanda Miguel de Andrade¹.

RESUMO

Objetivo: Este trabalho objetivou descrever a morfofisiologia da pele e o processo do envelhecimento cutâneo. **Revisão bibliográfica:** A pele é o maior órgão do corpo humano e além de proteção, desempenha diversas funções fisiológicas. Com o passar dos anos, tende a entrar no processo de envelhecimento natural, porém, alguns agentes externos ao corpo podem acelerar esse envelhecimento e provocar um aparecimento antecipado das rugas e flacidez, característicos do envelhecimento. Os sinais e características do envelhecimento da pele se dão principalmente pela degradação das fibras de colágeno, onde sua ausência provoca uma perda de preenchimento da matriz extracelular e a perda das fibras elásticas, fazendo com que o tecido perda elasticidade. **Considerações finais:** Entre os fatores indutores extrínsecos ao corpo, estão a exposição aos raios solares, tabaco, poluição e má alimentação, esses fatores, levam a formação de espécies reativas de oxigênio e essas espécies ativam cascatas de reações que degradam fibras de colágeno e fibras elásticas induzindo assim o envelhecimento precoce da pele.

Palavras-chave: Pele, Envelhecimento, Matriz extracelular, Colágeno, Elastina.

ABSTRACT

Objective: This work aimed to describe the morphophysiology of the skin and the process of skin aging. **Literature review:** The skin is the largest organ in the human body and, in addition to protection, it performs several physiological functions. Over the years, it tends to enter the natural aging process, however, some agents external to the body can accelerate this aging and cause an early appearance of wrinkles and sagging, characteristic of aging. The signs and characteristics of skin aging are mainly due to the degradation of collagen fibers, where their absence causes a loss of filling in the extracellular matrix and the loss of elastic fibers, causing the tissue to lose elasticity. **Final considerations:** Among the inducing factors extrinsic to the body are exposure to sunlight, tobacco, pollution and poor diet, these factors lead to the formation of reactive oxygen species and these species activate cascades of reactions that degrade collagen fibers and elastic bands, thus inducing premature aging of the skin.

Keywords: Skin, Aging, Extracellular matrix, Collagen, Elastin.

¹Universidade Federal de Pernambuco – PE.

²Centro Universitário Unifavip, Wyden. Caruaru – PE.

³Faculdade Cespu Europa. Jaboatão dos Guararapes – PE.

RESUMEN

Objetivo: Este trabajo tuvo como objetivo describir la morfofisiología de la piel y el proceso de envejecimiento cutáneo. **Revisión de la literatura:** La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y, además de proteger, cumple varias funciones fisiológicas. Con el paso de los años tiende a entrar en el proceso natural de envejecimiento, sin embargo, algunos agentes externos al organismo pueden acelerar este envejecimiento y provocar la aparición temprana de arrugas y flacidez, características del envejecimiento. Los signos y características del envejecimiento de la piel se deben principalmente a la degradación de las fibras de colágeno, donde su ausencia provoca una pérdida de relleno en la matriz extracelular y la pérdida de fibras elásticas, provocando que el tejido pierda elasticidad. **Consideraciones finales:** Entre los factores inductores extrínsecos al organismo se encuentran la exposición a la luz solar, el tabaco, la contaminación y la mala alimentación, estos factores conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno y estas especies activan cascadas de reacciones que degradan las fibras de colágeno y bandas elásticas, induciendo así envejecimiento prematuro de la piel.

Palabras clave: Piel, Envejecimiento, La matriz extracelular, Colágeno, Elastina.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha diversas funções como controle de homeostase e proteção. É responsável ainda pela regulação da temperatura corporal, além de diversas outras funções (LORZ LR, et al., 2019). É constituída por duas camadas, a epiderme e a derme. Os principais tipos de células presentes na epiderme são os queratinócitos e os melanócitos, já na derme são os fibroblastos (ARAVIISKAIA E, et al., 2019). Os fibroblastos produzem e mantêm a matriz extracelular (MEC). A MEC é responsável pelo preenchimento, elasticidade e sustentação da pele. Entre os constituintes da MEC, estão as fibras de colágeno, que fornecem sustentação ao tecido, as fibras elásticas responsáveis por conferir elasticidade, e o ácido hialurônico (AH) que contribui com a hidratação da pele. Os fibroblastos produzem ainda enzimas que degradam esses componentes quando estão danificados ou velhos, realizando o controle homeostático (ARAVIISKAIA E, et al., 2019).

O envelhecimento da pele está diretamente ligado a diminuição da produção dos componentes da MEC ou a degradação acelerada deles. Estima-se que aproximadamente aos 25 anos o indivíduo inicie um declínio gradativo dos constituintes da MEC de forma fisiológica. Porém, diversos agentes externos como os raios solares e a poluição, tendem a acelerar esse processo e provocar o aparecimento de rugas e flacidez de forma precoce (LUBOV JE, et al., 2021). A indução do envelhecimento da pele de forma extrínseca acontece por vezes devido a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas substâncias provocam um desequilíbrio na homeostase do tecido, desencadeando diversas reações simultaneamente e degradando ou danificando diversos compostos (HO CY e DREESEN O, 2021). Com isso, este trabalho teve como objetivo descrever a morfofisiologia da pele e o processo do envelhecimento cutâneo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

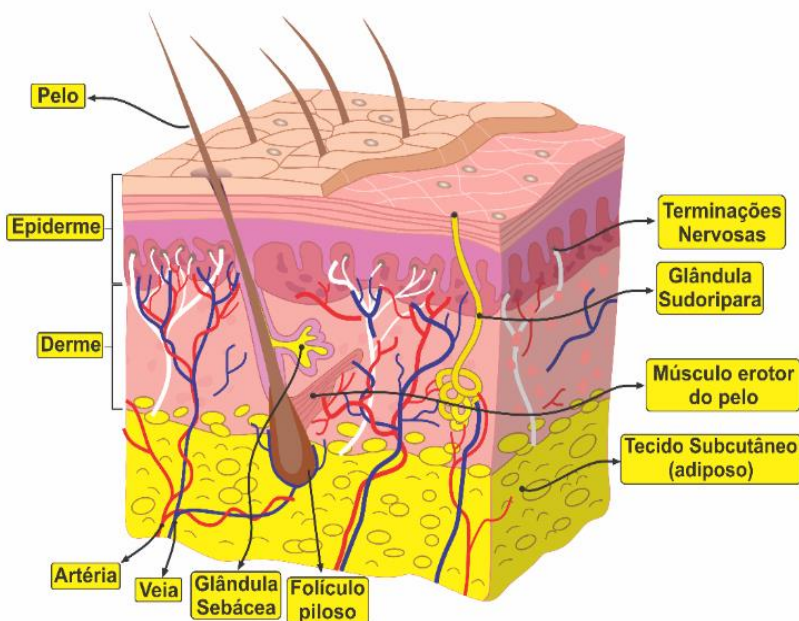
Morfofisiologia da Pele

Juntamente com seus apêndices e várias outras estruturas, a pele atua como uma barreira, responsável por proteger o organismo de fatores externos, sejam eles químicos, físicos ou biológicos. Esse grande escudo de proteção constitui cerca de 12% a 15% do peso corporal de um indivíduo (LORZ LR, et al., 2019).

Além de possuir a função de defesa, a pele também desempenha um papel importante como regulador fisiológico. Contribui com a homeostase por ser termorreguladora, pois controla a temperatura corporal através da produção de suor pelas glândulas sudoríparas e dilatação dos capilares próximos a superfície da pele quando a temperatura está alta. Para elevar a temperatura, inibe a liberação de suor, provoca vasoconstrição dos capilares para manter a temperatura sanguínea e elevação dos pelos (arrepio) para manter a camada de ar quente próxima ao corpo (WOHLRAB J, et al., 2016).

O equilíbrio hídrico do corpo também é uma função exercida pela pele, através deste a barreira hidro lipídica impede a perda de água do corpo por evaporação. Esse órgão também é responsável pela síntese de vitamina D, proteção contra os raios UV, atividades sensoriais dentre outras inúmeras funções (NGUYEN AV e SOULIKA AM, 2019). Histologicamente a pele é dividida em duas camadas distintas, a epiderme, camada mais superficial e a derme, a camada mais interna que é altamente vascularizada e responsável por nutrir a epiderme. Embaixo delas está o tecido subcutâneo, a hipoderme, que não é considerada parte da pele (**Figura 1**) (ARAVIISKAIA E, et al., 2019).

Figura 1 – Principais estruturas da pele.



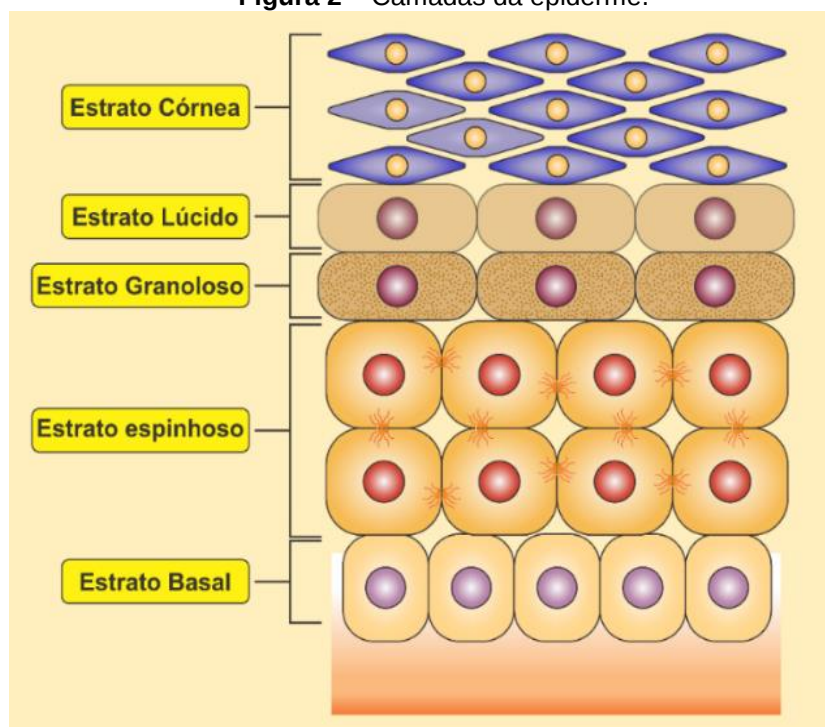
Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

A epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, não possui vascularização e é constantemente renovada, onde as células mais superficiais (células mortas) são descamadas. Seu principal tipo celular são os queratinócitos, porém, também são encontradas as células de Langerhans que fazem parte do sistema imune e realizam fagocitose nesse tecido, os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, pigmento da pele que age como protetor natural contra os efeitos nocivos de raios UV. As células de Merkel também são encontradas na epiderme, se localizam na base da camada e em contato com fibras nervosas, são mecanorreceptoras (ROGER M, et al., 2019).

De acordo com as características morfológicas e citoplasmáticas apresentadas pelos queratinócitos, a epiderme é dividida em cinco subcamadas ou estratos, e pode-se dizer que está mais bem relacionado ao tempo de vida celular, onde quanto mais superficial for a camada, mais velhas são as células (JUNQUEIRA LCU e CARNEIRO J, 2017; RITTIÉ L e FISHER GJ, 2015). Essas subcamadas, da mais externa para a mais interna, são (**Figura 2**).

Estrato córneo: constituído por células mortas, sem núcleo, citoplasma cheio de queratina, que são descartadas pela descamação da pele. Estrato Lúcido: constituído por queratinócitos com os núcleos citoqueratinizados, suas organelas estão sendo destruídas por enzimas e é a subcamada mais delgada da epiderme. Estrato granuloso: composto por células achatadas e com grânulos, elas secretam substâncias no meio intercelular, como lipídeos que são responsáveis pela formação da barreira impermeável de compostos e água. Estrato espinhoso: composto por células ligeiramente achatadas com núcleo central, ligam-se entre si através de desmossomos. Estrato Basal: constituído por células em formato semelhante a cubos, e existe grande atividade mitótica, responsáveis pela renovação celular (RITTIÉ L e FISHER GJ, 2015).

Figura 2 – Camadas da epiderme.



Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

A diferenciação da epiderme consiste na migração dos queratinócitos da camada basal para a camada córnea. Esse processo é conhecido como diferenciação terminal, onde essas células perdem atividade mitótica, sofrem modificações morfológicas e bioquímicas, e transformam-se em estruturas multilamelares de queratinócitos envolvidos por MEC lipídica (JUNQUEIRA LCU e CARNEIRO J, 2017). Todo esse processo permite que a camada córnea forneça um obstáculo mecânico contra patógenos invasores e seus produtos tóxicos, e contra desidratação, enquanto as camadas mais profundas da epiderme são observadas de perto pelo sistema imunológico (ARIOTTI S e VELDHOFEN M, 2019).

A Derme é constituída por tecido conjuntivo é responsável por apoiar e nutrir a epiderme. É caracterizada por dar sustentação e elasticidade à pele devido a presença de fibras colágenas e elásticas na MEC, também contribui com o combate a invasão de patógenos por possuir células de defesa do sistema imune na sua composição (ROGER M, et al., 2019). A derme se divide em camada papilar e reticular. A camada papilar é a mais externa, constituída de tecido conjuntivo frouxo, é mais delgada, altamente vascularizada e possui as papilas dérmicas. Já a derme reticular é a maior parte da derme e fica abaixo das papilas dérmicas, é formada principalmente das fibras conjuntivas não remodeladas, e ambas são ricas em fibras elásticas e colágenas (RITTIÉ L e FISHER GJ, 2015).

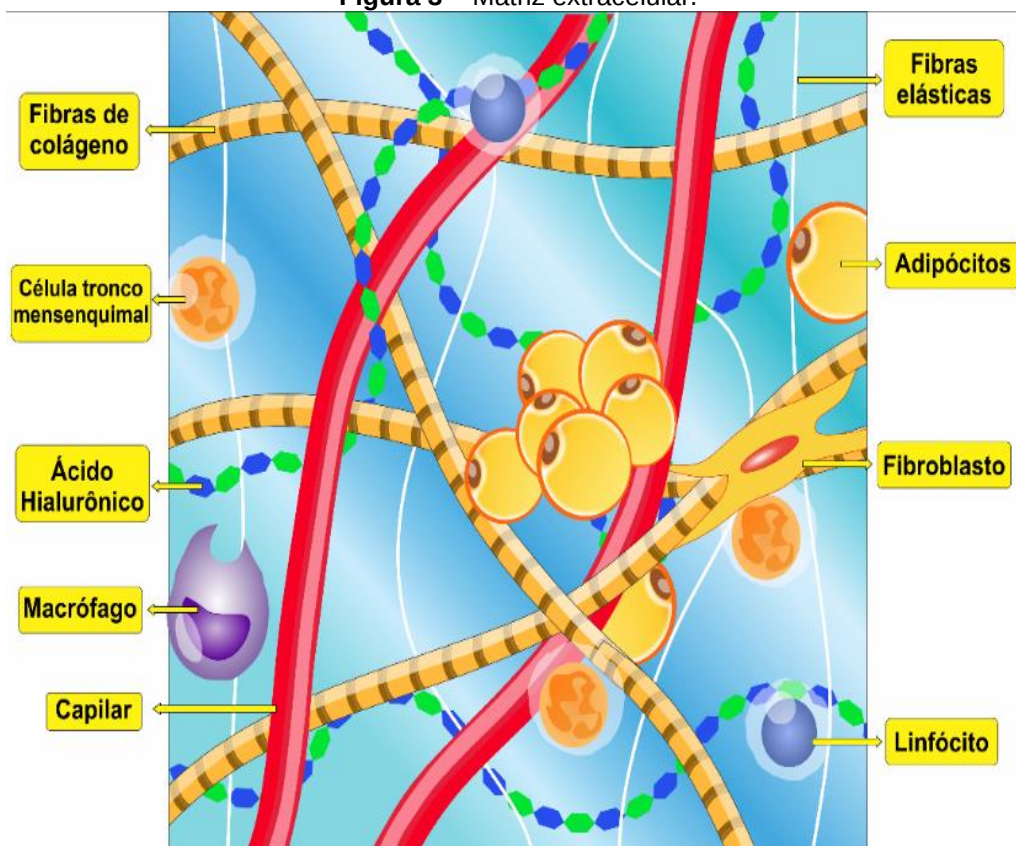
O principal tipo celular e o mais abundante existente na derme é o fibroblasto. Ele é responsável pela produção das fibras colágenas e elásticas da MEC. São eles que fazem toda a manutenção da MEC e controlam o volume de fibras mantendo a integridade do tecido. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que permitem comunicações intercelulares e quando existem ferimentos na pele, eles conseguem migrar para o tecido lesionado para auxiliar na cicatrização (LAING S, et al., 2020). Os fibroblastos são essenciais para o funcionamento normal da pele, participando de diversos processos metabólicos. Produzindo enzimas como as metaloproteinases (MMPs) e assim degradando fibras de colágenos produzidas pelo próprio, mantendo uma homeostase no ambiente. Produzem também AH, contribuindo para a hidratação da pele (SHIN JW, et al., 2019).

Além dos fibroblastos, outras células se encontram presentes na derme, como os macrófagos, mastócitos e células dendríticas. Os macrófagos são as células fagocitárias do sistema imune. Os mastócitos são os

responsáveis por ativação de ações inflamatórias, ativação das células do sistema imune e regulação do fluxo sanguíneo capilar, através da liberação de diversas substâncias como citocinas, histamina, prostaglandinas entre outras. Além das citadas, estão presentes as células dendríticas dérmicas responsáveis pela apresentação dos antígenos desempenhando importante papel de defesa (LAING S, et al., 2020).

A MEC compreende grande parte desse tecido e desempenha várias funções importantes que caracterizam a derme. Essa matriz forma uma malha de conectividade entre as células, composta principalmente por fibras de colágeno e fibras elásticas (**Figura 3**) (COLE MA, et al., 2018).

Figura 3 – Matriz extracelular.



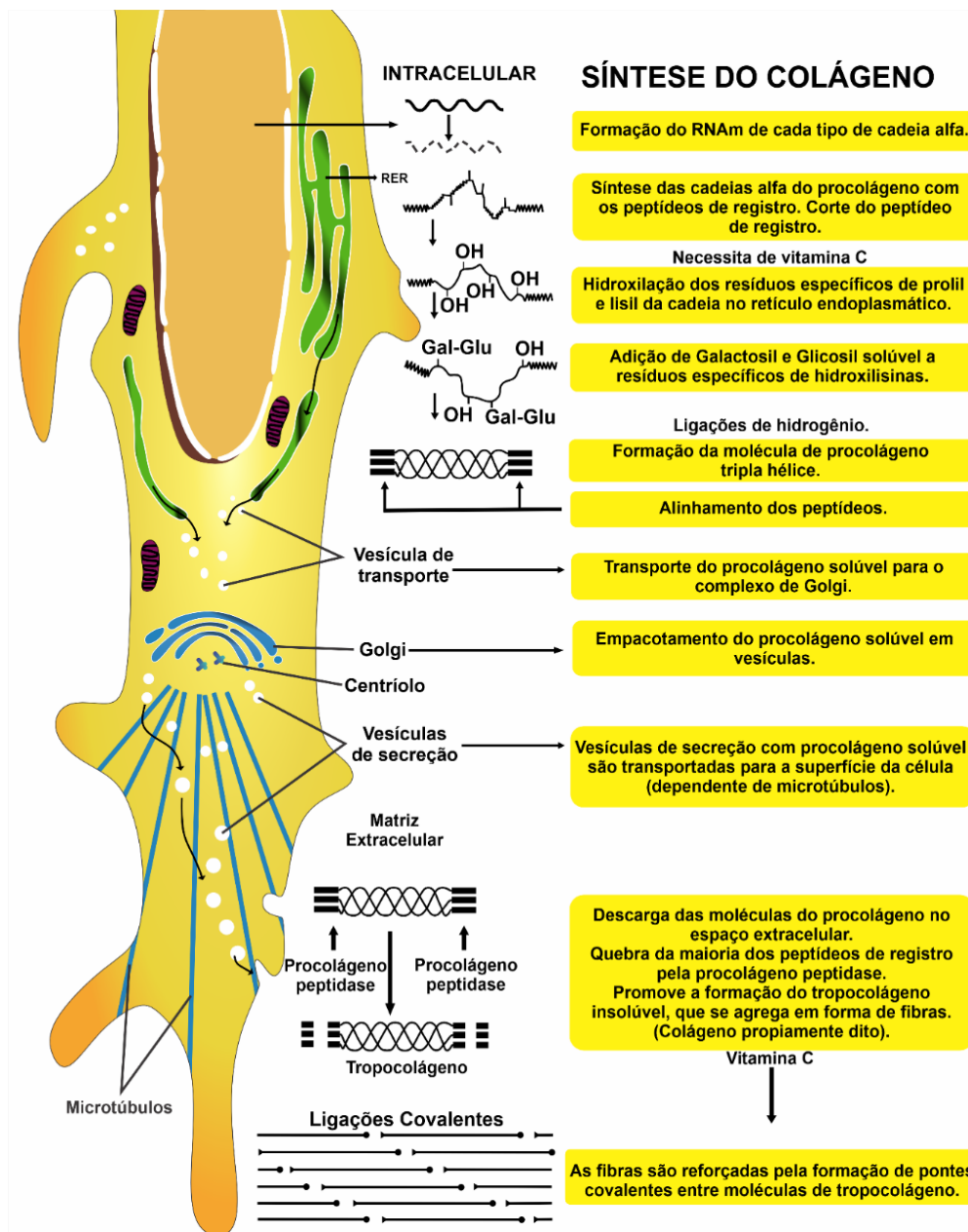
Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

As fibras de colágeno são responsáveis principalmente pela sustentação do tecido, enquanto as fibras elásticas vão garantir a elasticidade da pele. Além das fibras, ela também possui vasos sanguíneos, terminações nervosas e receptores sensoriais (COLE MA, et al., 2018).

O colágeno é a proteína presente em maior quantidade na MEC, onde está em formas de fibras na conformação de tripla-hélice de vários colágenos ligados uns aos outros. Ele é formado principalmente pelos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina, hidroxilisina. Basicamente na sua formação, acontece a liberação do RNAm para os ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, com a tradução do gene, acontece a formação do pré-pro-colágeno (apenas a fita de aminoácidos) e depois procolágeno (fitas em tripla-hélice), essa molécula de colágeno é conhecida como colágeno solúvel devido as suas terminações.

Posteriormente é liberada no meio extracelular e uma enzima chamada procolágeno peptidase cliva as suas terminações, com isso temos a formação do tropocolágeno (colágeno propriamente dito), posteriormente, as moléculas se agregam em forma de fibrilas (**Figura 4**) (JUNQUEIRA LCU e CARNEIRO J, 2017; CSEKES E e RACKOVÁ L, 2021; CHEN Q, et al., 2022).

Figura 4 – Síntese de colágeno.



Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

Envelhecimento da Pele

O envelhecimento é um fator cronológico que acontece naturalmente. Trata-se de um processo que consiste na perda de funcionalidade das células e dos tecidos. A forma como se dá depende de muitos fatores, de certo modo a idade biológica é comum para todos, porém a forma como o corpo responde com o passar do tempo é diretamente ligada à individualidade, onde fatores genéticos e estilo de vida influenciam (SHIN JW, et al., 2019).

Se tratando de fatores genéticos, é difícil evitar as características, pois é comum que com o tempo elas se expressem. Já os fatores do dia a dia, a exposição a agentes que aceleram o envelhecimento, como luz solar, má alimentação, cigarro entre outros, podem ser evitados em boa parte das vezes e torna-se o ponto chave dessa premissa (HO CY e DREESEN O, 2021).

Outro fator marcante no processo do envelhecimento são as variações hormonais que afetam a maioria dos órgãos do corpo humano. Com a redução de hormônios importantes perde-se várias funcionalidades, como a menor produção da melatonina que causa alteração do ciclo circadiano, consequentemente perda de sono e alteração do estado de alerta. Logo provoca estresse oxidativo pela formação excessiva de EROs e ativação das MMPs. As MMPs em excesso levam a uma perda desordenada das fibras de colágeno (COLE MA, et al., 2018).

Os hormônios sexuais, como o estrogênio, quando em níveis baixos provocam uma redução significativa no número de vasos sanguíneos na derme, redução da produção de colágeno e aumento de sua degradação. O hormônio do crescimento, também tem influência direta no envelhecimento da pele, que quando reduzido, promove perda de massa muscular e fraqueza (LUBOV JE et al., 2021).

Entre os vilões do envelhecimento precoce da pele, destaca-se os raios solares como um dos principais agentes externos que provocam as degradações das fibras de colágeno. A luz solar traz benefícios para o organismo, como a produção de Vitamina D e prevenção de algumas doenças, porém, o seu excesso no dia a dia pode trazer prejuízos à saúde, como câncer e fotoenvelhecimento (COLE MA, et al., 2018). O fotoenvelhecimento da pele é provocado pelos raios UV, que trazem diversos problemas para esse órgão, como por exemplo, o aparecimento de manchas, rugas e flacidez. As rugas e a flacidez acontecem principalmente pela perda das fibras de colágeno e fibras elásticas na MEC, o grau de envelhecimento é medido por uma escala muito utilizada na área da harmonização facial, a classificação de GLOGLAU (ALAM M et al., 2018).

A classificação de GLOGLAU classifica o envelhecimento em 4 graus, de acordo com a idade e relaciona as alterações aparentes na pele. No grau I estão as pessoas entre 20 e 30 anos, normalmente sem rugas ou com linhas mínimas, algumas alterações pigmentares leves, mas consideradas precoce. No grau II, considerado moderado estão pessoas entre 30 e 40 anos, e há o surgimento de algumas queratoses discretas (alterações na coloração da pele), linhas de expressão paralelas ao sorriso, aparecimento de rugas principalmente ao sorrir. O grau III normalmente acontece com pessoas entre 50 e 60 anos e as rugas são visíveis mesmo com a pele relaxada, existem manchas (lentigos senis) e a presença de queratoses (vasos visíveis). Já o último, o grau IV acomete normalmente pessoas acima dos 60 anos, quando a pele já se apresenta bem enrugada, flácida devido à diminuição da derme e há aumento da espessura da camada córnea, o que leva a uma pele acinzentada. Também é comum o aparecimento de lesões que podem se tornar cancerígenas (CSEKES E e RACKOVÁ L, 2021).

Perda de colágeno

Com o passar dos anos a produção de colágeno tende a diminuir naturalmente. Como já mencionado, além da fisiologia comum do envelhecimento (redução da produção e aumento na degradação), o colágeno tende a diminuir também devido a fatores externos. Isso acontece porque esses hábitos levam à produção de radicais livres, o que provoca uma cascata de ativação de MMPs e inibição da sinalização do fator de transformação de crescimento β (TGF- β), consequentemente uma redução da produção de colágeno pelos fibroblastos (LUBOV JE, et al., 2021). As MMPs são uma família de enzimas que degradam a MEC. Existem diversos tipos e desempenham diversas atividades fisiológicas diferentes. As MMPs que degradam o colágeno (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são denominadas collagenases, elas clivam a tripla-hélice das fibras de colágeno desestruturando a MEC. Normalmente, esse processo ocorre de forma controlada, faz parte do processo fisiológico, o desequilíbrio ocorre com o passar da idade e com a exposição aos fatores determinantes (COLE MA, et al., 2018).

Existem vários componentes da MEC que sofrem alterações durante o processo do envelhecimento, como por exemplo, as fibras elásticas, os glicosaminoglicanos entre vários outros. Porém, o colágeno, como principal componente da MEC merece uma atenção especial, pois além de estar presente em maior quantidade, é uma proteína funcional que interage com a maioria dos outros componentes (SUZUKI S, et al., 2020). A redução dessa proteína tão importante na pele leva a uma perda perceptível da MEC. Com isso,

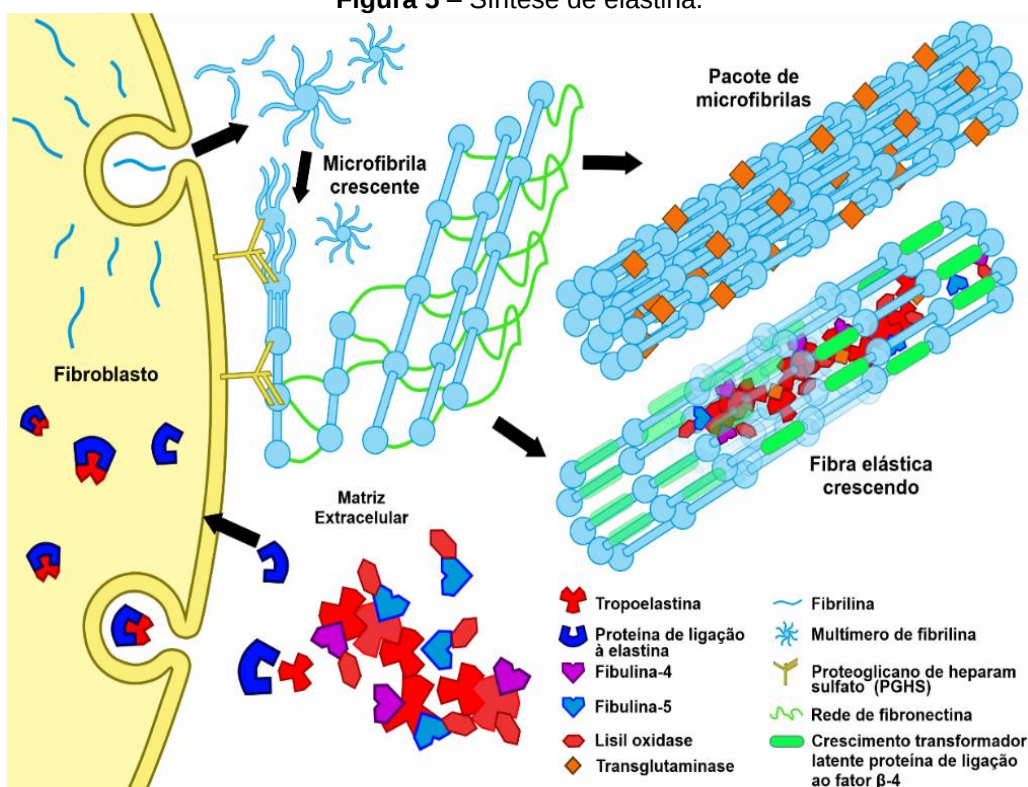
ocorre a redução dos espaços preenchidos e então tornam-se aparentes as rugas e a flacidez da pele. Com a exposição a fatores externos ao corpo, esse processo se acelera e a tendência é que a pele se mostre aparentemente mais velha do que já é (BOLKE L, et al., 2019).

Perda das fibras elásticas

As fibras elásticas são componentes extracelulares presentes em diversos tecidos. Possuem a função de dar elasticidade e retração aos órgãos como os pulmões, os vasos sanguíneos e a pele. São extremamente duráveis, compostas por um invólucro de microfibrilas ricas em fibrilina e um núcleo de elastina que é correspondente a aproximadamente 90% das fibras maduras (HEINZ A, 2021).

Antes da formação das fibras elásticas maduras definitivamente, existem dois processos distintos, de forma sucinta, um é a formação das microfibrilas através da multimerização das moléculas de fibrilina liberadas na MEC e formação de uma rede fibrilar com depósito de fibronectina. O outro é a liberação da tropoelastina na MEC e a sua deposição na rede fibrilar, onde são alinhadas e reticuladas formando as fibras elásticas propriamente ditas (**Figura 5**) (SCHMELZER EH e DUCA L, 2022).

Figura 5 – Síntese de elastina.



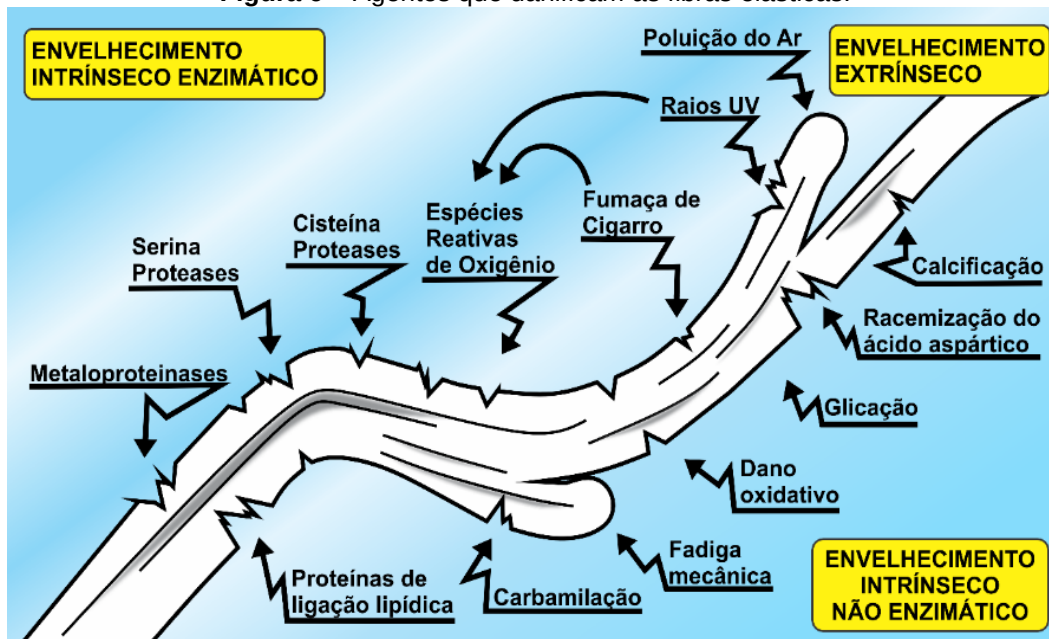
Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

Essas fibras passam por diversos estresses de agentes distintos que podem prejudicar as suas estruturas ou inativá-las, porém não são substituídas e permanecem no tecido mesmo danificadas ou inativadas devido ao seu baixo turnover. Se tratando da pele, esses danos fazem com que o tecido perda a elasticidade provocando flacidez (HEINZ A, 2021).

Existem diversos agentes que causam o envelhecimento e perda das fibras elásticas. Esses também são classificados como intrínsecos e extrínsecos, sendo os intrínsecos os fatores genéticos que aparecem com o tempo e é individual. Já os extrínsecos, são os quais o indivíduo é exposto no decorrer da vida, como a radiação UV, o tabagismo e a poluição. Esses fatores se somam e potencializam os danos a essas fibras (SCHMELZER EH e DUCA L, 2022).

Os fatores que danificam as fibras elásticas provocam diversos mecanismos distintos, como degradação enzimática, calcificação, ligação lipídica, fadiga mecânica, entre outros. Com o avançar da idade, os danos se tornam acentuados, pois são cumulativos, e além de serem muitos, não acontecem reparos nas fibras. Mesmo indivíduos com estilos de vida saudáveis não estão isentos de sofrerem os danos desses agentes (Figura 6) (CUI Y, et al., 2021).

Figura 6 – Agentes que danificam as fibras elásticas.



Fonte: Silva NC, et al., 2024. **Nota:** Imagem elaborada por meio do software gratuito inkscape-1.3.2_2023-11-25_091e20e-x64 (1).

Perda do ácido hialurônico (AH)

O AH é um polímero natural pertencente à classe dos glicosaminoglicanos, tem estrutura simples formado por unidades dissacarídicas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina ligados através de ligações glicosídicas. É um composto de caráter polar e através dessa característica desempenha sua principal função na pele, que é reter moléculas de água ao seu redor, controlando a hidratação da pele. Cada molécula tem a capacidade de conter até dez mil vezes seu peso em moléculas de água (SCARANO A, et al., 2021).

Esse polímero é sintetizado por diversas células, porém as principais são as células mesenquimais. A formação acontece na membrana plasmática pelas proteínas hialuronanas sintases (HAS-1, HAS-2 e HAS-3), que ligam o ácido D-glucurônico e o N-acetil-D-glucosamina repetidamente para a formação de uma grande molécula. Uma característica interessante é que o AH é sintetizado e excretado simultaneamente (MARINHO A, et al., 2021).

A degradação de AH também é um processo fisiológico comum que acontece para controle da homeostase do organismo. Aproximadamente aos 25 anos de idade iniciasse um processo de decaimento acelerado das concentrações de AH na MEC, através de processos endógenos comuns, mas também por fatores exógenos como os raios UV, má alimentação e poluição (SCARANO A, et al., 2020).

Existem dois mecanismos que levam a degradação do AH, um é mediado por enzimas específicas, as hialuronidases que clivam as ligações glicosídicas fragmentando as moléculas e permitindo que sejam fagocitadas. O outro é através do estresse oxidativo que leva a formação de EROs, o segundo é potencializado através dos estímulos exógenos como os raios UV. Essa degradação leva a uma perda de preenchimento na MEC, desidratação do tecido e consequentemente formação das rugas (MARINHO et al., 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pele é um órgão extremamente importante para a fisiologia humana de forma geral. Por proteger o corpo de diversos agentes externos, acaba sofrendo as consequências desses agressores. Ela possui um processo de envelhecimento fisiológico que acontece no decorrer da vida do indivíduo, porém, ele é acelerado devido ao aumento de EROs. Percebe-se que apesar da existência de diversos agentes que podem induzir o envelhecimento precoce, a exposição aos raios solares mostra-se um dos principais vilões. Tendo em vista que essa exposição é quase que inevitável, assim como a exposição à poluição, é importante a busca por terapias que possam reverter ou retardar esse processo do envelhecimento precoce.

REFERÊNCIAS

1. ALAM M, et al. Effect of Platelet-Rich Plasma Injection for Rejuvenation of Photoaged Facial Skin: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatology*, 2018; 154(12): 1447-1452.
2. ARAVIISKAIA E, et al. The impact of airborne pollution on skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019; 33(8): 1496-1505.
3. ARIOTTI S, VELDHOEN M. Immunology: Skin T Cells Switch Identity to Protect and Heal. *Current Biology*, 2019; 29(6): 220-223.
4. BOLKE L, et al. A Collagen Supplement Improves Skin Hydration, Elasticity, Roughness, and Density: Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Blind Study. *Nutrients*, 2019; 11(10): 2494.
5. CHEN Q, et al. Metformin Attenuates UVA-Induced Skin Photoaging by Suppressing Mitophagy and the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23(13): 6960.
6. COLE MA, et al. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2018; 12(1): 35-43.
7. CSEKES E, RAČKOVÁ, L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(23): 12641.
8. CUI Y, et al. Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of Cross-linked Hyaluronic Acid. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2021; 147(1S-2): 43S-49S.
9. HEINZ A. Elastic fibers during aging and disease. *Ageing Research Reviews*, 2021; 66: 101255.
10. HO CY, DRESEN O. Faces of cellular senescence in skin aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2021; 198: 111525.
11. JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. *Histologia básica: texto e atlas*. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017; 554.
12. LAING S, et al. Dermonutrient Containing Special Collagen Peptides Improves Skin Structure and Function: A Randomized, Placebo-Controlled, Triple-Blind Trial Using Confocal Laser Scanning Microscopy on the Cosmetic Effects and Tolerance of a Drinkable Collagen Supplement. *Journal of Medicinal Food*, 2020; 23(2): 147-152.
13. LUBOV JE, et al. The Impact of the Circadian Clock on Skin Physiology and Cancer Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(11): 6112.
14. LORZ LR, et al. Anti-Wrinkling and Anti-Melanogenic Effect of *Pradosia mutisii* Methanol Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(5): 1043.
15. MARINHO A, et al. Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. *Biomolecules*, 2021; 11(10): 1518.
16. NGUYEN AV, SOULIKA AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(8): 1811.
17. RITTIÉ L, FISHER GJ. Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015; 5(1): a015370.
18. ROGER M, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J of Anatomy*, 2019; 234(4): 438-455.
19. SHIN JW, et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20(9): 2126.
20. SUZUKI S, et al. Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2020; 84(3): 518-525.
21. SCHMELZER EH, DUCA L. Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease. *The FEBS Journal*, 2022; 289(13): 3704-3730.
22. SCARANO A, et al. The role of hyaluronic acid and amino acid against the aging of the human skin: A clinical and histological study. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2021; 20(7): 2296-2304.
23. WOHLRAB J, et al. Epidermale Alternsprozesse und Anti-Aging Strategien. *Die Derm*, 2016; 67: 107-111.

**APÊNDECE B – PROCEDIMENTOS QUE RETARDAM O
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E MODELOS EXPERIMENTAIS PARA
ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIENVELHECIMENTO**

CAPÍTULO 7

PROCEDIMENTOS QUE RETARDAM O ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIENVELHECIMENTO

PROCEDURES THAT DELAY SKIN AGING AND EXPERIMENTAL MODELS FOR ANALYSIS OF ANTI-AGING ACTIVITY

DOI: <https://doi.org/10.56001/22.9786500466386.07>

Submetido em: 15/01/2024

Revisado em: 22/01/2024

Publicado em: 25/01/2024

Natan Cordeiro da Silva

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia – Recife, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/5861102020265570>

Bruno José da Silva Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/5524038913919195>

Eliandra de Andrade Santos

Faculdade Santíssima Trindade – Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/8406652015335811>

Alyce Gabrielle de Araújo Oliveira

Faculdade Santíssima Trindade – Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/3672804570727587>

Aureliany da Conceição Patricio

Faculdade Santíssima Trindade – Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil.

<https://lattes.cnpq.br/4961901146283930>

José Manoel do Nascimento

Faculdade Santíssima Trindade – Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/4868187494735855>

Luciana Ângelo Bezerra

Faculdade Santíssima Trindade – Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/1514594071254110>

Noemia Pereira da Silva Santos

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia – Recife, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/1521392734944183>

Maria Tereza dos Santos Correia

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/7863845087003953>

Fernanda Miguel de Andrade

Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, Departamento de Histologia e Embriologia – Recife, Pernambuco, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/8915203118340030>

Resumo

Apesar de fisiológico, as consequências do envelhecimento da pele são indesejadas por boa parte da população. Principalmente se esse processo for acelerado por fatores externos como a poluição e os raios solares, levando os sinais característicos do envelhecimento a aparecerem precocemente. O prelúdio de

rugos, flacidez e manchas na pele leva cada vez mais pessoas a procurarem profissionais capazes de tratar esses problemas e revertê-los. O objetivo deste trabalho é descrever os procedimentos utilizados atualmente para retardar o envelhecimento da pele e explicar os modelos experimentais disponíveis para a análise de atividade antienvelhecimento. Existem diversos métodos utilizados para retardar o envelhecimento da pele ou revertê-lo, boa parte deles estão voltados para induzir a produção de colágeno, como o microagulhamento e os bioestimuladores de colágeno. Existem alguns problemas relacionados a utilização dos produtos atuais, como reações adversas graves, procedimentos invasivos e baixa durabilidade. Por isso, existe a necessidade da busca de novos compostos estimulantes da produção de colágeno, assim como a análise dos métodos experimentais utilizados para a análise de atividade antienvelhecimento. Entre os métodos experimentais utilizados para esse tipo de análise, existem os testes em animais, que vem cada vez menos sendo utilizados e os *in vitro*, com a utilização de células, que hoje, são mais indicados por questões éticas e terem boa comparabilidade com o organismo humano.

Palavras-chave: Envelhecimento da pele. Colágeno. Matriz Extracelular.

Abstract: Despite being physiological, the consequences of skin aging are unwanted by a large part of the population. Especially if this process is accelerated by external factors such as pollution and sunlight, causing the characteristic signs of aging to appear prematurely. The prelude to wrinkles, sagging and blemishes on the skin leads more and more people to look for professionals capable of treating these problems and reversing them. The objective of this work is to describe the procedures currently used to delay skin aging and explain the experimental models available for the analysis of anti-aging activity. There are several methods used to stop skin aging or reverse it, most of them are aimed at inducing collagen production, such as microneedling and collagen bio-stimulators. There are some problems related to the use of current products, such as serious adverse reactions, invasive procedures and low durability. Therefore, there is a need to search for new compounds that stimulate collagen production, as well as the analysis of experimental methods used to analyze anti-aging activity. Among the experimental methods used for this type of analysis, there are animal tests, which are being used less and less, and *in vitro* tests, using cells, which today are more recommended for ethical reasons and have good comparability with the organism. human.

Keywords: Skin aging. Collagen. Extracellular Matrix.

Introdução

O envelhecimento da pele é um processo fisiológico que acomete todos os indivíduos humanos no decorrer da vida. Estima-se que aproximadamente aos vinte e cinco anos de idade inicia-se o declínio das atividades biológicas da pele e conseqüentemente o início do desgaste natural. Ignorando os fatores externos que induzem esse processo, a pele levaria anos para apresentar marcas de expressões características do envelhecimento, pois esse processo é lento (Csekes; Racková, 2021).

O problema, é que existem diversos agentes externos que aceleram a degradação desse tecido, como o tabaco, má alimentação, raios solares e até mesmo a poluição. Quanto maior o nível de exposição, mais rápido torna-se a deterioração de substâncias importantes para a pele e inicia-se o aparecimento precoce das rugas e flacidez (Cui *et al.*, 2021).

A pele é subdividida em epiderme e derme, sendo a derme a parte mais profunda desse tecido. Nela está presente a matriz extracelular (MEC), composta por fibras

colágenas e elásticas, ácido hialurônico (AH) e outros componentes. A MEC possui várias funcionalidades e entre elas, é responsável pelo preenchimento da pele, pela elasticidade e sustentação do tecido (Nguyen; Soulika, 2019; Shin *et al.*, 2019).

Com o envelhecimento, temos uma degradação desordenada dos componentes da MEC sem substituição. Os fatores extrínsecos que levam a essa degradação, basicamente induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e esses compostos provocam diversas cascatas de reações que degradam substâncias. Um exemplo é que as EROs induzem a produção de enzimas metaloproteinases (MMPs), que degradam as fibras de colágeno, além disso, também inibem diretamente a síntese de colágeno pelos fibroblastos (Ho; Dreesen, 2021).

Existem diversos métodos utilizados para tentar retardar o envelhecimento da pele. A maioria voltado para a renovação das fibras de colágeno, onde os mais eficazes tendem a ter baixa durabilidade, serem invasivos e em alguns casos apresentam efeitos colaterais graves. Por esse motivo, diversos estudos buscam métodos alternativos e novas substâncias que possam ser mais eficazes e seguras para retardarem o envelhecimento da pele (Csekes; Racková, 2021).

Com base no descrito, o objetivo deste trabalho é descrever os procedimentos utilizados atualmente para retardar o envelhecimento da pele e explicar os modelos experimentais disponíveis para a análise de atividade antienvhecimento.

Revisão Bibliográfica

• Estratégias para retardar o envelhecimento da pele

Com o aumento da valorização da aparência pela sociedade como um todo, tem-se buscado cada vez mais procedimentos e substâncias que retardem o envelhecimento da pele. A utilização de processos mecânicos, como o microagulhamento, e de bioestimuladores de colágeno, como a hidroxiapatita de cálcio, são exemplos de procedimentos que induzem a produção de colágeno e logo retardam ou reverterem a flacidez da pele (Zouboulis *et al.*, 2019).

A busca por produtos antienvhecimento da pele tende a focar principalmente no colágeno. Vendo que após o início do envelhecimento existe um ciclo de destruição das fibras de colágeno de forma mais acentuada, onde a degradação se torna maior que a reposição. (Dayan *et al.*, 2019). Uma das possibilidades é a busca de agentes que inibam as enzimas degradadoras de colágeno, as (MMPs) MMP-1, MMP-8 e MMP-13

(colagenases). Essa inibição faria com que essas enzimas ficassem impedidas de degradar as fibras de colágeno existentes, logo a pele permaneceria com os espaços da MEC bem preenchidos. Porém, esse mecanismo não levaria em consideração a renovação dos componentes da MEC, e se os fibroblastos pararem ou reduzirem a liberação de colágeno, com o passar do tempo a pele continuará envelhecendo por falta de renovação (Shin *et al.*, 2019).

Outra opção, seria inibir a produção EROs ou degradá-las, como a vitamina C atua. Com isso, existiria uma redução da formação de MMPs e logo uma menor degradação das fibras de colágeno. Porém, inibir a produção das EROs se torna algo muito improvável, levando em consideração que vários mecanismos celulares liberam essas espécies e que ações extrínsecas ao corpo promovem a formação dessas espécies, como os hábitos alimentares e a própria exposição aos raios solares, por exemplo (Boo, 2022).

Atualmente, sabe-se que um fator muito importante para a estimulação da produção de colágeno pelos fibroblastos é a indução da inflamação da região. Essa indução controlada faz com que os fibroblastos voltem a sua atividade normal e comecem a sintetizar colágeno (Taub; Pham, 2018). Fica claro que entre as possibilidades de mecanismos, a indução da reativação da produção do colágeno pelos fibroblastos seria a ideal. Essa indução faz com que os espaços intercelulares sejam novamente preenchidos e que a ligação entre os fibroblastos e a MEC seja retomada (Shin *et al.*, 2019).

- **Retinóides**

Os retinóides, são a vitamina A e seus derivados, normalmente utilizados para o tratamento da acne, manchas e rugas. De forma geral, para o tratamento de rugas esses medicamentos atuam através de receptores do ácido retinóico (RARs) e receptores X (RXRs) e acabam aumentando a quantidade de procolágeno e consequentemente colágeno do tipo I, III e VII, além de estimular a produção, eles também contribuem para a organização das fibras colágenas (Shin *et al.*, 2019).

A principal utilização dessas substâncias é para o tratamento de acne. A isotretinoína, o medicamento mais famoso dessa classe é utilizado com muita frequência para a redução da oleosidade da pele e consequentemente o fim das acnes. Possui uma grande efetividade e atua basicamente provocando uma descamação da camada córnea, afinando a pele e atrofiando as glândulas sebáceas, impedindo a produção de oleosidade (Fallah; Rademaker, 2021).

Apesar da sua eficácia, esses produtos apresentam efeitos colaterais bem incômodos. A isotretinoína, por exemplo, por ser utilizada de forma sistêmica provoca um ressecamento em toda a pele, os lábios ressecam, aparecem rachaduras e podem apresentar sangramento. A pele fica sensível ao sol, podendo os usuários apresentarem irritações e existem várias evidências de casos de depressão relacionados ao uso (Huang; Cheng, 2017).

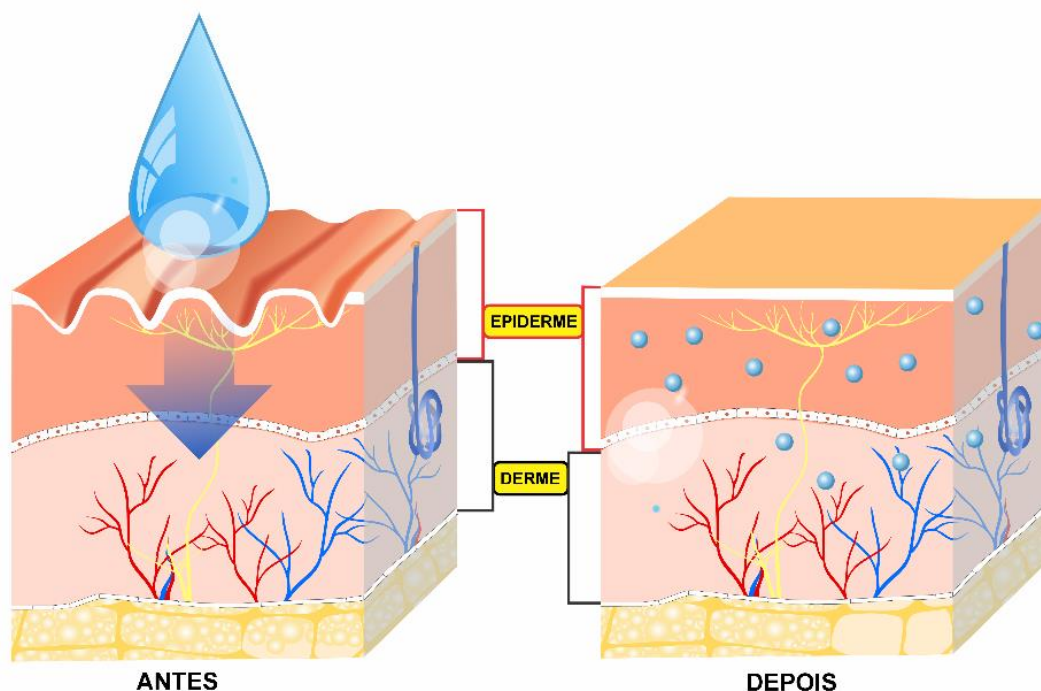
Já um dos efeitos colaterais mais graves acontece em mulheres que fazem uso desses produtos na gestação, pois podem provocar abortos espontâneos além de teratogênias graves aos bebês. Por esse motivo, retinóides de uso sistêmico fazem parte das substâncias de controle especial e existe todo um protocolo estabelecido por lei para que se autorize a utilização dessas substâncias (Alvarenga, 2015).

- **Ácido Hialurônico**

Outra estratégia antienvhecimento bastante utilizada é o preenchimento, que consiste em utilizar um produto, por exemplo o (AH) para preencher os espaços da MEC, o que leva a uma interação melhorada entre os fibroblastos e a MEC. Além disso, o AH induz a produção de colágeno pelos fibroblastos através da via de sinalização TGF- β (Scarano *et al.*, 2021).

O AH é um glicosaminoglicano, polissacarídeos de preenchimento da MEC de vários tecidos, que também está presente na derme, sofre redução com aumento da idade e sua ausência também contribui para o aparecimento de rugas. Essa molécula consegue reter uma grande quantidade de água, mantém a região preenchida e a pele bem hidratada (Figura 1). O preenchimento com o gel de AH na pele se dá de forma invasiva por administração com agulhas diretamente na derme (Cui *et al.*, 2021).

Figura 1 – Efeito de preenchimento do ácido hialurônico.



Fonte: Autoria própria (2023).

Existem alguns cosméticos que utilizam outras formas de administração, como na forma de sal, o hialuronato de sódio. Quando o sal tem baixo peso molecular como no caso do Oligo AH ele consegue penetrar com maior facilidade e chegar à derme. Já quando tem um peso molecular elevado só penetra a primeira camada da pele, absorve grande quantidade de água e dá um preenchimento temporário de algumas horas. Um exemplo de utilização desse tipo de AH é a utilização em gloss ou batons que dão um inchaço temporário aos lábios (Wohlrab; Hilpert; Wolff, 2016; Dayan *et al.*, 2019).

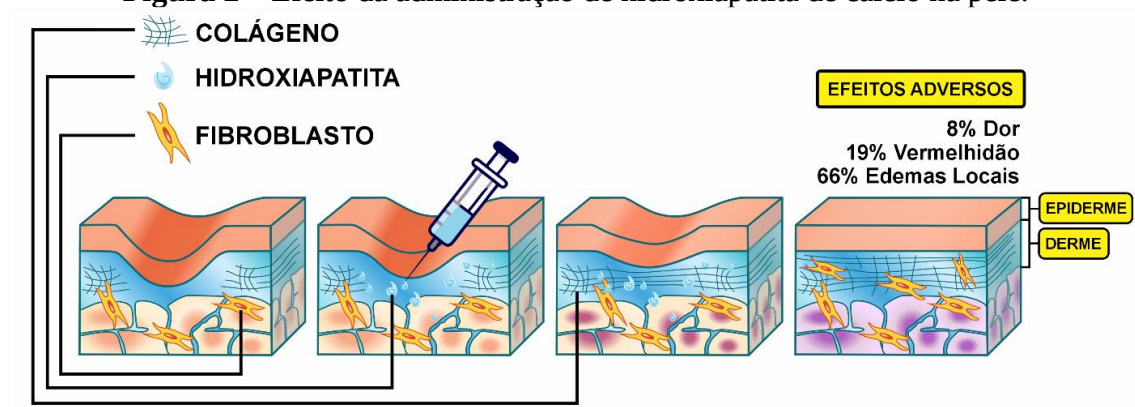
- **Hidroxiapatita de cálcio**

Os bioestimuladores de colágeno são também produtos utilizados com a finalidade antienvhecimento que tem uma ótima aceitação comercial. Entre esses produtos, destaca-se a hidroxiapatita de cálcio como um dos mais utilizados. Consiste em uma molécula sintética biocompatível composta por fosfato de cálcio cristalino, são pequenas esferas que possuem a capacidade de serem biodegradáveis com o tempo (Csekes; Racková, 2021).

Logo após a administração, ele provoca um preenchimento imediato e momentâneo da região da aplicação, removendo assim as rugas. Devido a uma reação inflamatória provocada de forma controlada, os fibroblastos se dirigem a região da aplicação e são estimulados a produzir colágeno tipo I e III. Com o passar do tempo essas esferas começam a ser degradadas e fagocitadas lentamente e ao mesmo tempo o colágeno

tipo I vai sendo produzido e substituindo o espaço dessas esferas no tecido (Figura 2). Esse processo é lento, inicia-se dentro de um mês e pode durar até um ano, já os efeitos da aplicação, podem ter uma durabilidade de três anos (Wohlrab; Hilpert; Wolff, 2016).

Figura 2 – Efeito da administração de hidroxiapatita de cálcio na pele.



Fonte: Autoria própria (2023).

Esses bioestimuladores são normalmente seguros, e raramente apresentam efeitos adversos graves. No caso da hidroxiapatita de cálcio são comuns edemas e pequenas manchas pós aplicação, mas que desaparecem em alguns dias. Pode acontecer a formação de granulomas na região da aplicação devido à má aplicação e eles podem ser revertidos com massagem (Dayan *et al.*, 2019).

• Ácido ascórbico

Uma substância que tem um papel essencial na síntese do colágeno é o ácido ascórbico (Vitamina C), uma molécula natural importante na promoção da bioestimulação do colágeno pelos fibroblastos. Ele é um excelente antioxidante, impede a oxidação de duas enzimas precursoras do colágeno, a prolil e a lisil hidroxilase, duas enzimas férricas que oxidam facilmente na ausência da vitamina C. Além de contribuir com essa síntese, contribui também na desativação de EROs, provocando a sua redução e logo uma redução na formação das MMPs (Gref *et al.*, 2020).

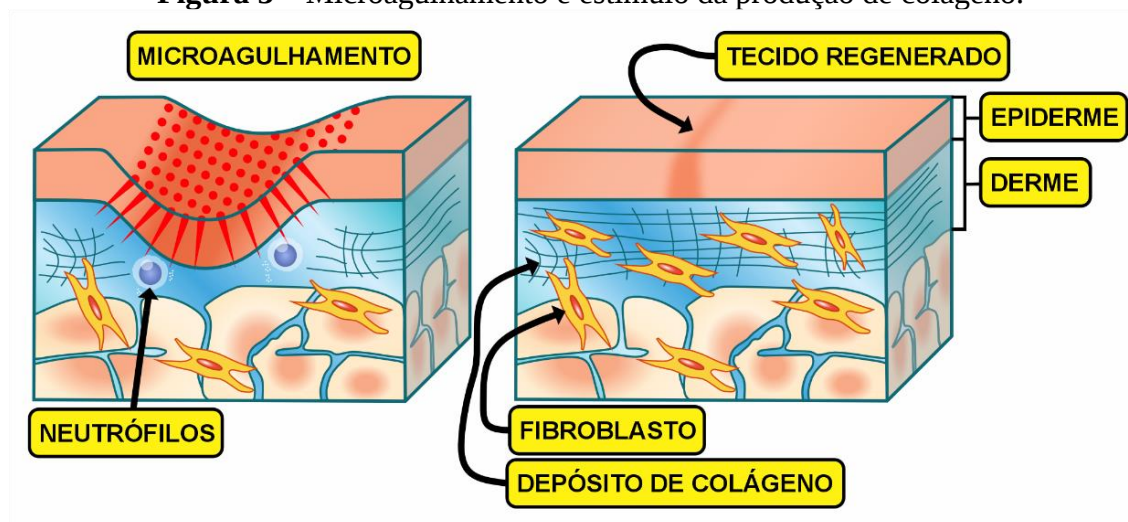
Existem vários cosméticos a base de vitamina C no mercado que tem como foco especial a pele. Como a biodisponibilidade do ácido ascórbico na pele não é efetiva quando ele é administrado por via oral, os produtos voltados para essa finalidade são normalmente tópicos. Um problema enfrentado para essa administração é a permeabilidade da Vitamina C à camada córnea, devido a sua baixa lipofilicidade, o que faz com que esse composto tenha que ser conjugado com agentes lipofílicos para facilitar a passagem por essa barreira (Boo, 2022).

Além da dificuldade de permeabilidade, a vitamina C apresenta uma instabilidade em condições normais de temperatura e ambiente. Existe todo um cuidado e cautela com os produtos cosméticos a base desse produto e ainda assim, muitos podem perder a qualidade devido às más condições de armazenamento (Dayan *et al.*, 2019).

- **Microagulhamento**

O microagulhamento ou indução percutânea de colágeno é uma técnica simples que busca provocar pequenos furos (lesões) com várias agulhas para estimular a inflamação e consequentemente a produção de colágeno e elastina pelos fibroblastos de forma natural (Figura 3). É uma técnica minimamente invasiva que apresenta ótimos resultados, provoca a redução das rugas, da flacidez da pele, estrias e até de melasma. Essa técnica pode ser associada ao uso de alguns cosméticos após as microperfurações, como por exemplo a vitamina C para potencializar o estímulo (Albano; Pereira; Assis, 2018).

Figura 3 – Microagulhamento e estímulo da produção de colágeno.



Fonte: Autoria própria (2023).

O estímulo de produção ocorre por essas micro-lesões provocarem a liberação de citocinas, fatores de crescimento e neutrófilos, que por sua vez sinalizam e estimulam os fibroblastos a migrarem e iniciarem a produção das fibras elásticas e de colágeno na região lesionada. No início a produção de colágeno é principalmente do tipo III e em menor quantidade tipo I, essa conformação dura alguns meses até um processo de remodelação do tecido, onde o colágeno tipo III é convertido no tipo I e esse permanece por vários anos (Albano; Pereira; Assis, 2018).

- **Colágeno**

Além de vários produtos voltados para o estímulo da produção de colágeno, existe ainda também o próprio colágeno, que é comercializado em diversas formas. Entre esses produtos, alguns se apresentam como moléculas de colágeno inteiras e outras como moléculas de colágeno fragmentadas, ditos peptídeos de colágeno. Para isso, é realizado uma reação de hidrólise da molécula para que aconteça a quebra dos peptídeos, resultando no famoso colágeno hidrolisado. As diferentes formas de apresentação modificam apenas o tempo de absorção, onde o colágeno hidrolisado será absorvido mais rapidamente (Porfírio; Fanaro, 2016).

O colágeno administrado por via oral é considerado um nutracêutico seguro, sua suplementação principalmente para idosos é muito bem recomendada, pois contribui para uma revitalização da pele, o fortalecimento das cartilagens e prevenção da osteoporose ou da sua progressão, doença essa que atinge principalmente a população idosa (Zouboulis *et al.*, 2019).

Uma das desvantagens da administração oral do colágeno é que a sua molécula não é absorvida inteira, antes que aconteça a absorção, quando não hidrolisado, ela precisa ser hidrolisada e esse processo ocorre quase que por completo no duodeno e no jejuno pelo suco pancreático, viram pequenos peptídeos ou aminoácidos. Depois de absorvidos essas substâncias são distribuídas para diversas reações, uma quantidade infinitesimal pode ser direcionada para a formação de colágeno, o restante se perde em outras reações ou são excretadas (Porfírio; Fanaro, 2016).

- **Modelos experimentais que buscam analisar atividades antienvhecimento**

Na ciência, existem diversos métodos experimentais para a realização de testes sobre eficácia de fármacos. Sabe-se que nada substitui os testes realizados diretamente no ser humano, porém para esses testes são levantadas diversas questões éticas devido à possibilidade de que substâncias desconhecidas podem levar ao surgimento de sequelas graves e até a morte (Williams, 2006). Por isso, antes das testagens em humanos, são buscadas possibilidades de estudos em outras formas e modelos semelhantes, que possam trazer resultados fidedignos e representem teoricamente o que aconteceria no homem. Só depois de vários estudos que comprovem a eficácia e a sua segurança é que esses protótipos podem ser testados nos seres humanos (Moon *et al.*, 2021).

Dentre esses métodos utilizados que possam ser confiáveis existem a utilização de animais como cobaias para testes de toxicidade e eficácia, esse é um dos métodos mais

utilizados, mas vem perdendo espaço gradativamente por também envolver vidas (Monteiro *et al.*, 2013). O avanço da ciência tem permitido que a utilização dos animais em pesquisas científicas possa ser reduzida. Com a pressão da sociedade e os avanços tecnológicos várias indústrias têm buscado métodos alternativos espontaneamente para a realização de experimentos, com a finalidade de abolir a utilização de animais. Recentemente, o Senado Brasileiro aprovou o projeto de lei PLC 70/2014 que proíbe a utilização de animais em pesquisas e testes para a produção de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes; a lei entrou em vigor em 24 de fevereiro de 2023 através da resolução nº58, esse marco torna-se um grande avanço para o fim dos testes em animais no Brasil (Disner, 2019; Diario Oficial Da União, 2023).

Estudos *in vitro* representam o funcionamento celular e os processos bioquímicos, sendo capazes de apresentarem boa comparabilidade com os estudos com o corpo humano. Ademais, não trazem prejuízos para vidas, sendo assim um método eficaz e seguro para a realização de estudos tanto para atividade de protótipos quanto de toxicidade. Dentro da área de cultura celular, existem possibilidades de estudos como (Disner, 2019):

- Monoculturas: culturas celulares que utilizam apenas um tipo celular no meio, como por exemplo, apenas fibroblastos;
- Co-culturas: culturas celulares que utilizam mais de um tipo celular no meio como por exemplo, a utilização de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos;
- Culturas 2D: culturas celulares que ficam em superfície plana, as células interagem apenas lado a lado e se multiplicam uma ao lado das outras de forma horizontal;
- Culturas 3D: modelo que possibilita uma maior representatividade do modelo fisiológico original, possibilita que as células interajam com o ambiente em todas as direções. Permite uma maior interação célula-célula.

Então, principalmente para estudos preliminares, modelos *in vitro* devem ser os métodos adotados em estudos de descoberta de novos fármacos. Ficando os estudos com seres humanos para etapas finais do desenvolvimento (Williams, 2006).

A utilização de modelos *in vitro* é uma alternativa ideal para realização de experimentos preliminares levando em consideração a confiabilidade desse modelo, a humanização do processo e a possibilidade de repetições simultâneas dos testes (Suzuki *et al.*, 2020). Esses modelos utilizam células de animais que reproduzem os processos

fisiológicos e com isso, possibilita a visualização das respostas celulares a possíveis fármacos. Os testes com culturas celulares não substituem totalmente os testes com o ser humano, pois trata-se de um organismo complexo, que possibilita muitas variáveis. Porém além de respostas semelhantes, pode-se destacar também como vantagem a reprodutibilidade, a rapidez em que os testes podem ser realizados e a necessidade de uma quantidade de amostras reduzida (Moon *et al.*, 2021).

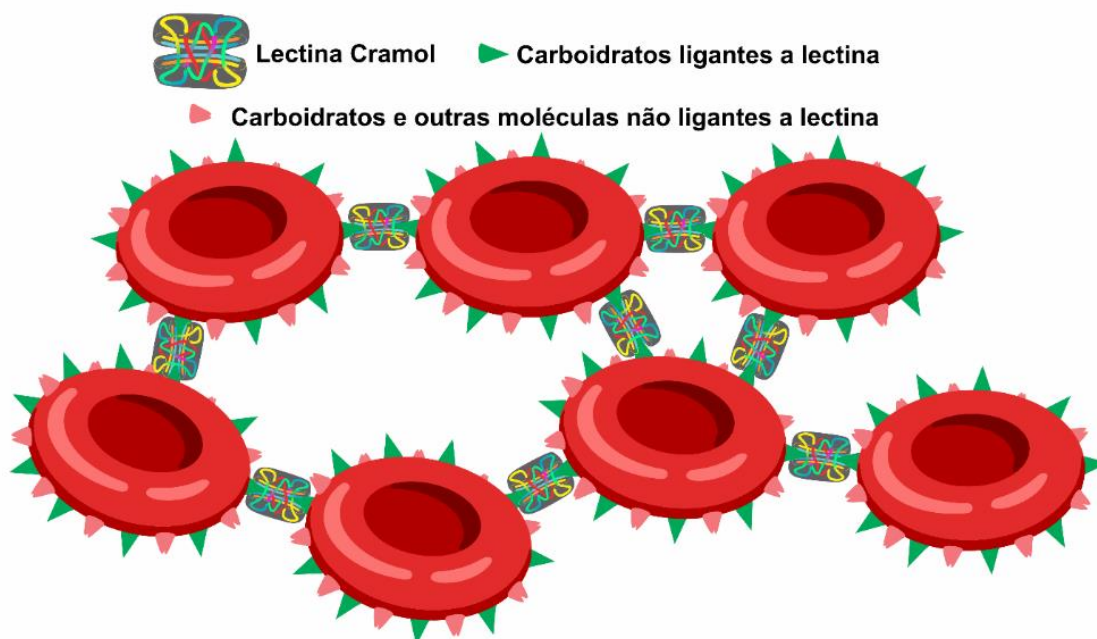
- **Lectina de *Cratylia mollis***

As lectinas são proteínas bioativas de origem não imunológica com capacidades moduladoras para diversos mecanismos fisiológicos. Elas se ligam reversivelmente a carboidratos e por isso desempenham papéis importantes em mecanismos celulares, como capacidades mitogênicas e indutores de síntese de proteínas. Podem ser encontradas em diversas formas de vidas, como plantas, animais e microrganismos (Gautam *et al.*, 2020).

A primeira lectina identificada foi a ricina, extraída da *Ricinus communis* L. (mamona) em 1888 por Stillmark, quando ele observou a atividade hemoaglutinante do extrato. Apesar de ter sido descoberta a muito tempo, a pouco menos de um século é que se começou a estudar de forma mais difundida as lectinas existentes e as suas atividades. Existem diversas lectinas conhecidas que são extraídas principalmente de plantas leguminosas, entre elas a que está mais bem caracterizada até o momento é a Concanavalina A (Con A) que é uma lectina extraída da planta *Canavalia ensiformis* (Huldani *et al.*, 2022).

Por serem seletivas a carboidratos, apresentam capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos da parede celular de eritrócitos em sistemas sanguíneos ABO e MN, através de ligações hidrofóbicas e de hidrogênio. Essa propriedade permite as lectinas a capacidade de aglutinar os eritrócitos de forma seletiva e isso distingue as mesmas de outras moléculas como as glicotransferases. Através dessa ligação às proteínas da parede celular dos eritrócitos é possível a realização do teste de hemoaglutinação para verificar a presença e/ou atividade de lectinas (Figura 4) (Sá *et al.*, 2009).

Figura 4 – Hemoaglutinação mediada por uma lectina.



Fonte: Autoria própria (2023).

Elas podem ser encontradas naturalmente ligadas reversivelmente a proteínas de paredes celulares, pois muitas dessas proteínas são glicosiladas e se tornam um sítio de ligação para essas lectinas através do seu “sítio de ligação a carboidrato” (Domínio de Reconhecimento a Carboidrato – CDR) um mecanismo conhecido como encaixe induzido (Nascimento *et al.*, 2020).

A Cramoll 1,4 é uma lectina muito semelhante a Con A e possui diversos efeitos fisiológicos já conhecidos. Essa lectina é extraída das sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratu), uma leguminosa nativa do nordeste brasileiro, predominante do bioma Caatinga, que se apresenta em formas de arbustos. Quando a extração é realizada, é obtido diversas formas moleculares da lectina: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. A Cramol 1,4 é uma associação das duas formas moleculares específica para glicose/manose (Melo *et al.*, 2011).

Dentre as atividades observadas até o momento da Cramoll 1,4 pode-se destacar as atividades imunomoduladoras e anti-infecciosas (Carneiro *et al.*, 2021), pró-inflamatórias e mitogênicas (Melo *et al.*, 2010), antitumoral (Cunha *et al.*, 2016), e cicatrizante (Melo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2021). Podendo ela mediar processos infecciosos contra agentes invasores, contribuindo com ativações de citocinas importantes para estimulação de células do sistema imune, como as interleucinas e fatores de crescimento (Oliveira *et al.*, 2013).

Recentemente Andrade e colaboradores (2021) ao analisar a atividade cicatrizante da Cramoll 1,4 em camundongos diabéticos, conseguiram observar que ao final do experimento de 12 dias além da Cramoll ter acelerado a reepitelização, ocorreu também um maior depósito de colágeno tipo I nas feridas do grupo em que foi utilizado essa lectina, mostrando que ela atua acelerando a cicatrização mesmo em situações adversas.

Levando em consideração que a Cramoll apresenta atividade pró-inflamatória e atua acelerando a deposição de colágeno tipo I no processo cicatricial, e sendo esse o principal tipo de colágeno na pele humana, o que melhor se organiza e preenche de forma moduladora a pele, essa lectina pode se tornar uma excelente candidata a um produto cosmético antienvelhecimento.

- **Galactomananas**

Os polissacarídeos são carboidratos formados por grandes polímeros de monossacarídeos ligados covalentemente uns aos outros. Esses compostos extraídos de fontes naturais têm ganhado cada vez mais destaque em várias indústrias por apresentar diversas vantagens como sua biocompatibilidade, baixo custo e fácil obtenção (Silva *et al.*, 2020).

As galactomananas são polissacarídeos extraídos do endosperma de sementes de plantas, principalmente leguminosas com diversas aplicabilidades em vários setores, como na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Por terem alto peso molecular, serem solúveis em água e não iônicas possuem as características ideais para a formação de sistemas altamente viscosos e em baixas concentrações. Assim, podem ser utilizados para a preparação de filmes cosméticos, estabilizadores de emulsão e para a formação de hidrogéis (Albuquerque *et al.*, 2017).

É importante destacar também a capacidade de imobilização de biomoléculas. No estudo de Albuquerque e colaboradores (2016) foi realizada imobilização da Cramoll 1,4 no hidrogel de Galactomanana extraído de *Cassia grandis*, uma árvore nativa brasileira. Além de ter permitido uma liberação controlada Cramoll 1,4, o hidrogel permitiu estabilidade que manteve as características naturais até 30 dias e sem contaminações microbiológicas.

Uma vantagem da utilização do hidrogel de Galactomanana como imobilizador da Cramol para os fins cosméticos é a sua intimidade com o estrato córneo da pele. Já que a Cramol necessita ultrapassar o estrato para induzir a produção de colágeno dérmico,

estar associado a um hidrogel que facilite esse transporte pode ser fundamental para que aconteça de forma definitiva esse processo (Albuquerque *et al.*, 2016).

Considerações Finais

Existem diversos procedimentos e substâncias que são utilizadas para retardar ou reverter o processo do envelhecimento da pele, voltados para a remoção de rugas, flacidez e manchas, mas muitos apresentam desvantagens como a necessidade de reaplicações recorrentes, necessidade de profissionais qualificados para aplicação, riscos de contaminações e efeitos colaterais graves. Por isso, busca-se novos compostos e procedimentos que possam se tornar inovadores na área, com maior durabilidade ou maior facilidade de aplicação. Uma alternativa de origem natural poderia ser a Cramol 1,4, que apresenta a capacidade de induzir a produção de colágeno. Contudo, existe a necessidade de realização de novos testes por modelos experimentais fidedignos, como as culturas celulares, que além de apresentarem boa representatividade e segurança, está dentro das conformidades das leis vigentes.

Referências

- ALBANO, R. P. S; PEREIRA, L. P.; ASSIS, I. B. Microagulhamento: a terapia que induz a produção de colágeno - revisão de literatura. **Revista Saúde em Foco**, n. 10, p. 455-473, 2018. Disponível em: <https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/07/058>
- ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 454-461, 2016. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.107.
- ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. Immobilization of bioactive compounds in *Cassia grandis* galactomannan-based films: Influence on physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 727-735, 2017. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.081.
- ALVARENGA L. (Brasil). **Risco de teratogenicidade associado ao uso de Roacutan (isotretinoína)**. São Paulo, 2015. Disponível em: [Roacutan® \(isotretinoína\) – Risco de teratogenicidade associada ao uso do medicamento, Roche, 29 de outubro de 2015 — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa \(www.gov.br\)](#)
- ANDRADE, F. M. et al. Healing activities of Cramoll and xyloglucan membrane in cutaneous wounds of diabetic mice. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 13, 100045, 2021. Doi: 10.1016/j.regen.2021.100045.

- BOO, Y. C. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, 1663, 2022. Doi: 10.3390/antiox11091663.
- CSEKES, E.; RACKOVÁ, L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 12641, 2021. Doi: 10.3390/ijms222312641.
- CARNEIRO, M. A. M. S. et al. Immunomodulatory and anti-infective effects of *Cratylia mollis* lectin (Cramoll) in a model of wound infection induced by *Staphylococcus aureus*. **International Immunopharmacology**, v. 100, 108094, 2021. Doi: 10.1016/j.intimp.2021.108094.
- CUI, Y.; WANG, F.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of Cross-linked Hyaluronic Acid. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 147, p. 43S-49S, 2021. Doi: 10.1097/PRS.00000000000007620.
- CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 1355, 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01355.
- DAYAN, S. H. et al. Topical skin therapies in subjects undergoing full facial rejuvenation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 3, p. 798-805, 2019. Doi: 10.1111/jocd.12977.
- DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **RESOLUÇÃO nº 58, de 24 de fevereiro de 2023**. PLC 70/2014. [S. l.]: IMPRENSA NACIONAL, ano 41, p. 1-8, 1 mar. 2023. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-58-de-24-de-fevereiro-de-2023-466792333?trk=public_post_comment-text
- DISNER, G. R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. **Evidência: Biociências, Saúde e Inovação**, v. 19, n. 2, p. 259-274, 2019. Doi: 10.18593/eba.v19i2.20964.
- FALLAH, H.; RADEMAKER, M. Isotretinoin in the management of acne vulgaris: practical prescribing. **International Journal of Dermatology**, v. 60, n. 4, p. 451-460, 2021. Doi: 10.1111/ijd.15089.
- GAUTAM, A. K.; SHARMA, D.; SHARMA, J.; SAINI, K. C. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the Cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 474-483, 2020. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119.
- GREF, R. et al. Vitamin C-squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 16883, 2020. Doi: 10.1038/s41598-020-72704-1.
- HO, C. Y.; DREESEN, O. Faces of cellular senescence in skin aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 198, 111525, 2021. Doi: 10.1016/j.mad.2021.111525.

HUANG, Y. C.; CHENG, Y. C. Isotretinoin treatment for acne and risk of depression: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 6, p. 1068-1076, 2017. Doi: 10.1016/j.jaad.2016.12.028.

HULDANI, H. et al. Concanavalin A as a promising lectin-based anti-c102âncer agent: the molecular mechanisms and therapeutic potential. **Cell Communication and Signaling**, v. 20, 167, 2022. Doi: 10.1186/s12964-022-00972-7.

MELO, C. M. L. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 342, p. 163-169, 2010. Doi: 10.1007/s11010-010-0480-z.

MELO, C. M. L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113-119, 2011. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.011.

MOON, S; KIM, D. H.; SHIN, J. U. *In Vitro* Models Mimicking Immune Response in the Skin. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 11, p. 969-980, 2021. Doi: 10.3349/ymj.2021.62.11.969.

MONTEIRO, M. R. et al. Cultura de fibroblastos dérmicos humanos na presença de ácido hialurônico e polietilenoglicol: efeitos na proliferação celular, produção de colágeno e enzimas relacionadas à remodelação da matriz extracelular. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 3, p. 222-225, 2013.

NASCIMENTO, C. O. et al. Purification of a lectin from *Cratylia mollis* crude extract seed by a single step PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 7, p. 655-663, 2020. Doi: 10.1080/10826068.2020.1725771.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, 1811, 2019. Doi: 10.3390/ijms20081811.

OLIVEIRA, P. S. S. et al. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, 263968, 2013. Doi: 10.1155/2013/263968.

PEREIRA, D. S. T. et al. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 184538, 2012. Doi: 10.1155/2012/184538.

PORFÍRIO, E.; FANARO, G. B. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 1, p. 153-164, 2016. Doi: 10.1590/1809-9823.2016.14145.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009. Doi: 10.1016/j.cbpc.2008.08.004.

SCARANO, A. et al. The role of hyaluronic acid and amino acid against the aging of the human skin: A clinical and histological study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 7, p. 2296-2304, 2021. Doi: 10.1111/jocd.13811.

SHIN, J. W. et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 9, 2126, 2019. Doi: 10.3390/ijms20092126.

SILVA, L. M. et al. Promising alternative gum: Extraction, characterization, and oxidation of the galactomannan of *Cassia fistula*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 436-444, 2020. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.164.

SUZUKI, S. et al. Inhibition of melanin production and promotion of collagen production by the extract of Kuji amber. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 84, n. 3, p. 518-525, 2020. Doi: 10.1080/09168451.2019.1693251.

TAUB, A. F.; PHAM, K. Stem cells in Dermatology and Anti-aging Care of the Skin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 425-437, 2018. Doi: 10.1016/j.fsc.2018.06.004.

WILLIAMS, F. M. *In vitro* studies - how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 199-203, 2006. Doi: 10.1016/j.etap.2005.07.009.

WOHLRAB, J.; HILPERT, K.; WOLFF, L. Epidermal aging and anti-aging strategies. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 67, n. 2, p. 107-111, 2016. Doi: 10.1007/s00105-015-3734-6.

ZOUBOULIS, C. C. et al. Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 365-372, 2019. Doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.04.002.

AENXO A – ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR

EXPERIMENTAL THERAPEUTIC STRATEGIES FOR THE TREATMENT OF PULMONARY FIBROSIS

Bruno José da Silva Bezerra¹
Júlia Yone da Silva Pereira²
Natan Cordeiro Silva³
Thaís Alves dos Santos⁴
Maria Eunice Siqueira Lira⁵
Jannyson José Braz Jandú⁶
Fernanda Miguel de Andrade⁷
Maria Tereza dos Santos Correia⁸

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.2

1 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: bruno.bjsb@ufpe.br, <http://lattes.cnpq.br/5524038913919195>

2 Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: juliayone64@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/3077465386884652>

3 Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: cordeironatan71@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5861102020265570>

4 Departamento de Farmácia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: thaisaquino31@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/2013581069276851>

5 Departamento de Farmácia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: mariaeunicelira1@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5859234758930507>

6 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: jannysonjose@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0003751583176190>

7 Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: fernanda_miguel3@yahoo.com.br, <http://lattes.cnpq.br/8915203118340030>

8 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: mtscorreia@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7863845087003953>

RESUMO

A Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) é uma doença progressiva, de caráter fibrosante que acomete os pulmões gerando prejuízos nas trocas gasosas. Apresenta um prognóstico difícil em decorrência do tratamento farmacológico limitado que possui. O objetivo deste estudo foi fazer um levantamento das estratégias terapêuticas experimentais desenvolvidas para o tratamento e/ou controle da FPI. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, onde foram analisados artigos publicados no período de 2002 a 2021 disponíveis nas seguintes bases de dados: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e JAMA Network (AMA). De acordo com os artigos analisados, os corticosteroides são os mais usados nas fases avançadas da FPI, apesar da literatura apontar poucos ou nenhum benefício desse fármaco. Também foi analisado o comportamento de anti-inflamatórios, beta-bloqueadores e estatinas frente a FPI. Entre as terapias estudadas, a oxigenoterapia é citada como sendo usual em indivíduos acometidos pela doença uma vez que há comprometimento importante na respiração observado através da saturação periférica de oxigênio e desconforto da musculatura respiratória. Os resultados encontrados ainda não são totalmente favoráveis, havendo a necessidade de serem desenvolvidos novos estudos com terapias que possam minimizar a progressão da FPI.

Palavras-chave: Fibrose, Pirfenidona, Nintedanibe, Corticosteroides, Oxigenoterapia.

ABSTRACT

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a progressive, fibrosing disease that affects the lungs, causing losses in gas exchange. It has a difficult prognosis due to the limited pharmacological treatment it has. The aim of this study was to survey the experimental therapeutic strategies developed for the treatment and/or control of IPF. This is an integrative literature review, where articles published between 2002 and 2021 available in the following databases were analyzed: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) and JAMA Network (AMA). According to the articles analyzed, corticosteroids are the most used in the advanced stages of IPF, despite the literature indicating little or no benefit of this drug. The behavior of anti-inflammatory drugs, beta-blockers and statins against IPF was also analyzed. Among the therapies studied, oxygen therapy is mentioned as usual in individuals affected by the disease, since there is significant impairment in breathing observed through peripheral oxygen saturation and respiratory muscle discomfort. The results found are still not entirely favorable, and there is a need to develop new studies with therapies that can minimize the progression of IPF.

Keywords: Fibrosis, Pirfenidone, Nintedanib, Corticosteroids, Oxygen Therapy.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) é uma doença que acomete o interstício pulmonar, se manifestando por fibrose progressiva, de etiologia desconhecida, que ocorre principalmente em adultos de idade avançada, e que apesar de ser rara, é o quadro clínico mais prevalente das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas. É acompanhada por perda funcional, dispneia progressiva e comprometimento da qualidade de vida (MANCUZO; SOARES E PEREIRA, 2018; PEREIRA 2016). A prevalência de FPI é estimada em 20 casos por 100.000 habitantes, e aproximadamente 10% dos casos são de Fibrose Pulmonar Familiar (BORIE E CRESTANI, 2019). Geralmente se apresenta na 6ª ou 7ª década de vida de fumantes e ex-fumantes, sendo mais comum em homens (PEREIRA et al., 2019).

Do ponto de vista fisiopatológico, a FPI é resultante de uma resposta reparativa anormal (ainda que o estímulo não seja completamente elucidado) evocada pelo acúmulo e persistência dos miofibroblastos. As interações viciosas entre epitélio alveolar lesado, miofibroblastos e matriz extracelular neodepositada levam à fibrose e disfunção tecidual. No tecido pulmonar fibrótico é possível identificar aspecto irregular, com distribuição temporal heterogênea, áreas de pulmão preservado ao lado de outras comprometidas por fibrose, remodelamento do parênquima pulmonar e presença de focos fibroblásticos (COLETTA, 2003; DOURADO; KAIRALLA; CARVALHO, 2013; PEREIRA 2016).

A FPI possui sinais e sintomas semelhantes com a Fibrose Cística (FC), no entanto são doenças diferentes. A FC é uma doença genética autossômica recessiva, rara, caracterizada por infecção pulmonar crônica e comprometimento de glândulas exócrinas (FEITEN et al., 2016; RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2002; ROSA et al., 2008). Nessas doenças ocorre o processo de autofagia, que é quando o organismo entende que o corpo está escasso de nutrientes (CARMO et al., 2021).

O mecanismo da autofagia ocorre por via catabólica, degradando as organelas e componentes que deixaram de ser essenciais da própria célula nos lisossomos, o material celular é envolto por uma membrana e decomposto. Estudos recentes demonstram que a autofagia minimiza os efeitos patológicos do acúmulo de proteína nos sistemas hepático, cardiovascular e respiratório (HIDVEGI et al., 2015).

Desde dezembro de 2019, um surto inesperado de uma nova pneumonia por coronavírus altamente contagiosa (COVID-19) varreu rapidamente o mundo. Em

novembro de 2020, o surto havia crescido por infectar mais de 57 milhões de pessoas, com mais de 1,3 milhão de mortes em mais de 200 países. Estima-se que aproximadamente 13,8% das infecções evoluíram para doença grave e 6,1% em estado crítico (PAN et al., 2021). De acordo com a literatura uma proporção considerável de pacientes com covid-19 pode evoluir com FPI, uma consequência do processo de reparação da lesão pulmonar. É possível observar a presença de sequelas tomográficas persistentes que podem estar relacionadas com comprometimento funcional (AMARAL et al., 2021; BALDI, TANNI 2021; SANTANA, FONTANA, PITTA 2021).

Nas últimas décadas, diversas modalidades terapêuticas farmacológicas, com variados mecanismos de ação, foram investigadas para o tratamento dessa doença, com um número substancial de estudos resultando em desfechos negativos. Apesar disso, novos fármacos têm mostrado benefícios para o tratamento da FPI e alguns deles já estão disponíveis no mercado para essa indicação (MARTINEZ et al., 2020).

Após anos de ensaios decepcionantes, a Pirfenidona e o Nintedanibe surgiram como os primeiros fármacos efetivos para controle dessa doença, no qual ambos bloqueiam a formação de cicatrizes, diminuindo a taxa de declínio da função pulmonar nos indivíduos acometidos. Além disso, a suplementação de oxigênio e a reabilitação pulmonar têm sido indicadas para minimizar os episódios de dispneia, uma vez que esse é um dos principais agravos da FPI (GULER et al., 2021; MARTINEZ et al., 2015).

Diante da escassez de alternativas farmacológicas, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver tratamentos alternativos eficazes e não tóxicos para indivíduos com FPI. Esta pesquisa objetiva fazer um levantamento das estratégias terapêuticas experimentais que estão sendo desenvolvidas para o tratamento e/ou controle dessa patologia.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa, realizada a partir de buscas nas seguintes bases de dados: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e JAMA Network (AMA). Onde foram levados em consideração os seguintes critérios de inclusão: artigos de pesquisa, publicações dos últimos vinte anos (janeiro/2002 a julho/2021), texto integral disponível no idioma inglês; e os seguintes critérios de exclusão: revisões de literatura e trabalhos que não tratavam da temática proposta neste estudo. Descritores utilizados: “Fibrosis”, “Pulmonary Fibrosis”, “Drug Therapy”.

Após a coleta dos artigos, os títulos e resumos dos mesmos foram lidos, aqueles que não atendiam os critérios de inclusão e as repetições foram excluídos. Os artigos selecionados, após a leitura dos títulos e resumos, foram lidos na íntegra, os que não atendiam os critérios de inclusão foram excluídos, e os selecionados tiveram seus resultados analisados e comparados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há algumas décadas pesquisadores tentam reproduzir doenças pulmonares intersticiais em modelos experimentais, principalmente a FPI. Nisso vários protocolos farmacológicos e diferentes modalidades ventilatórias foram propostos para o tratamento dessas patologias, contudo o uso de corticosteroides, além da oxigenoterapia nas fases mais avançadas ainda é o usual (CABRAL, 2013).

Os corticosteroides (também chamados de glicocorticoides e esteroides) são fármacos com potencial anti-inflamatório amplamente utilizados na prática clínica, com apresentação imediata ou tardia. Do ponto de vista bioquímico são compostos derivados do colesterol, cuja estrutura consiste em três anéis com seis átomos de carbono e um anel com cinco átomos de carbono (COUTINHO et al., 2020). De acordo com a literatura estudos investigaram o uso de corticosteroides na FPI (LUPPI et al., 2004).

O estudo de Pereira et al. (2006) utilizou corticosteroides isolados, e imunossupressores e corticosteroides combinados em indivíduos com FPI. Ao final 59% dos voluntários evoluíram a óbito por complicações respiratórias. Ainda assim foi observado que os fármacos combinados promoveram uma maior sobrevida em comparação aos isolados. Em um estudo realizado na França com indivíduos com FPI em estágio grave, 27% eram tratados com corticosteroides isolados, e 22% com a terapia combinada (COTTIN et al., 2014). No entanto para Rodrigues (2007), esse tipo de terapia conhecida como tradicional tem se mostrado de pouco ou nenhum benefício.

O fracasso de terapias anti-inflamatórias visando minimizar a progressão da FPI ou retardar a mortalidade tem promovido o estudo de terapias antifibróticas. Portanto, a descoberta de novos alvos terapêuticos para essa doença é crucial. Estudos que exploram os mecanismos envolvidos na FPI identificaram vários alvos possíveis para intervenções terapêuticas (ZHANG et al., 2021). Segundo Hidvegi et al., (2015), o excesso de deposição de colágeno produz mudanças significativas na função pulmonar, tais como: diminuição da complacência, aumento da resistência tecidual e alteração da histerese. Seu estudo realizado com camundongos concluiu

que o aumento do processo de autofagia com uso de drogas intensificadoras (CBZ / Flu) e de transferência de genes aos pulmões é capaz de reverter os efeitos tóxicos da proteinopatia respiratória e reduzir a infiltração de leucócitos, sendo um mecanismo importante de proteostase endógena e uma boa alternativa para a terapia.

Em um estudo de caso realizado durante trabalho de parto em uma gestante diagnosticada na pré adolescência com hemossiderose pulmonar idiopática (HPI) que é uma condição rara associada a fibrose pulmonar, foi aplicado suporte de oxigênio (O₂) através de máscara facial (10litros). Na tentativa de melhorar sua oxigenação durante o trabalho de parto, instituíram a ventilação não invasiva (VNI). A gestante não descompensou, em via normal, reduzindo-se a oferta de O₂ para 1-3 litros/min, nesse caso com cateter nasal pós parto (ALLEN et al., 2008). Para Cabral (2013), o oxigenoterapia é um dos métodos considerados cruciais para os pacientes com FPI em estágios mais graves da doença.

Visando associar a relação entre estatinas e doença pulmonar intersticial, Ponnuswamy et al. (2009), realizaram um estudo de caso-controle em pacientes com diagnóstico de fibrose pulmonar. Dentre os medicamentos analisados estão: as aspirinas, diuréticos, antiinflamatórios, betabloqueadores, e estatinas. Concluíram que não há correlação entre o uso de estatinas e a doença. No entanto, relataram que há uma associação significativa entre doença isquêmica cardíaca e doença pulmonar intersticial independente dos medicamentos prescritos. Vale ressaltar que há inúmeras pesquisas sobre o sistema renina-angiotensina e seu papel na fisiopatologia da fibrose, foi observado que a inibição da angiotensina convertase (ACE) atenuou a fibrose pulmonar induzida, possibilitando o interesse na inibição da ACE como uma terapia potencial.

Murphy et al. (2010) avaliaram os fatores de ativação dos macrófagos nos pulmões de indivíduos portadores de fibrose cística nas condições de infecção pela *Pseudomonas aeruginosa* (PA), terapia com drogas imunomoduladores e função pulmonar. Os dados revelados no estudo sustentam a hipótese de que os macrófagos alternativamente ativados são relevantes na fisiopatologia da infecção crônica de PA, devido a capacidade da azitromicina de polarizar o macrófago em direção ao fenótipo. Além disso, as citocinas IL-4 e IL-13 desempenham um papel na ativação de macrófagos no processo da doença.

Para avaliar a eficácia da terapia com rituximabe em doença pulmonar, Marie et al. (2012), analisaram o prontuário de pacientes portadores de doença pulmonar intersticial, acompanhados durante um ano, sendo que esses indivíduos não responderam a terapia anterior com esteroides, drogas citotóxicas e imunoglobulinas

intravenosa. Com exceção da prednisona, foram suspensos para dar início ao tratamento com rituximabe. Ao longo do período analisado os pacientes apresentaram melhora significativa da sintomatologia clínica da doença incluindo dispnéia e tosse, concluindo que o medicamento é uma proposta adequada de tratamento para doenças pulmonares.

CONCLUSÃO

A FPI promove várias repercussões negativas no sistema respiratório dos indivíduos acometidos principalmente dispnéia que é causada pela dificuldade que os pulmões apresentam de realizar o processo de hematose eficazmente. Embora novas estratégias tenham sido testadas visando atuar na regressão e controle dessa doença, os resultados ainda não são totalmente favoráveis, diante disso é necessário que novos estudos sejam executados a fim de desenvolver terapias que promovam uma melhora no quadro de saúde dos pacientes, e consequentemente na sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. K. et al. Management of a parturient with an acute exacerbation of idiopathic pulmonary haemosiderosis and posterior spinal instrumentation. **British journal of anaesthesia**, v. 100, n. 2, p. 235-239, 2008.
- AMARAL, A. F. et al. Exacerbação aguda de fibrose pulmonar pós-COVID-19: viagens aéreas como um potencial gatilho. **Jorn. Bras. Pneum.**, v. 47, 2021.
- BALDI, B. G.; TANNI, S. E. Fibrose pulmonar e acompanhamento de sobreviventes da COVID-19: necessidade urgente de esclarecimento. 2021.
- BORIE, R.; CRESTANI, B. Fibrose pulmonar familiar: um mundo sem fronteiras. **Jorn. Bras. Pneum.**, v. 45, 2019.
- CABRAL, R. M. Modelos experimentais de doenças pulmonares fibrosantes. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2013.
- CARMO, T. I. T. et al. Análise dos efeitos terapêuticos do CAPE sobre a fisiopatologia da fibrose cística. **Revista da Semana Acadêmica do Curso de Medicina da UFFS-Campus Chapecó**, v. 4, n. 4, 2021.
- COLETTA, E.N.A.M et al. Achados histológicos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Pneu.**, v. 29, n.6, p. 371-378, 2003.
- COTTIN, V. et al. Management of idiopathic pulmonary fibrosis in France: a survey of 1244 pulmonologists. **Respiratory medicine**, v. 108, n. 1, p. 195-202, 2014.
- COUTINHO, I. A. et al. Hipersensibilidade a corticosteroides-Uma revisão. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 28, n. 3, p. 149-160, 2020.

DOURADO, L. K.; KAIRALLA, R. A.; CARVALHO, C. R. Fibrose pulmonar idiopática: uma atualização. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 1, p. 33-37, 2013.

FEITEN, T. S. et al. Fisioterapia respiratória: um problema de crianças e adolescentes com fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, p. 29-34, 2016.

GULER, S. A. et al. Pulmonary function and radiological features 4 months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. **European respiratory journal**, v. 57, n. 4, 2021.

HIDVEGI, T. et al. Enhancing Autophagy with Drugs or Lung-directed Gene Therapy Reverses the Pathological Effects of Respiratory Epithelial Cell Proteinopathy. **Journal of biological chemistry**, v. 290, p. 29742-29757, 2015.

LUPPI, F. et al. Corticosteroid and immunomodulatory agents in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory medicine**, v. 98, n. 11, p. 1035-1044, 2004.

MANCUZO, E. V.; SOARES, M. R.; PEREIRA, C. A. C. Distância no teste de caminhada de seis minutos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática no Brasil. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 44, p. 267-272, 2018.

MARIE, I. et al. Rituximab therapy for refractory interstitial lung disease related to antisynthetase syndrome. **Respiratory medicine**, v. 106, p. 581-587, 2012.

MARTINEZ, J. B. et al. Atualização do diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 41, n.5, p.454-466, 2015.

MARTINEZ, J. B. et al. Diretrizes brasileiras para o tratamento farmacológico da fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 46, n.2, 2020.

MURPHY, B. S. et al. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. **Journal of cystic fibrosis**, v. 9, p. 314-322, 2009.

PAN, S. et al. Airway resistance variation correlates with prognosis of critically ill COVID-19 patients: A computational fluid dynamics study. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 208, p. 106257, 2021.

PEREIRA, C. A. et al. Survival in idiopathic pulmonary fibrosis – cytotoxic agents compared to corticosteroids. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 2, p. 340-347, 2006.

PEREIRA, J. M. Fibrose Pulmonar Idiopática. **Act. Rad. Portuguesa**, v. 28, n. 108, 2016.

PEREIRA, C. A. C. et al. Segurança e tolerabilidade de Nintedanibe em pacientes com fibrose pulmonar idiopática no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, 2019.

PONNUSWAMY, A et al. Association between ischaemic heart disease and interstitial lung disease: A case-control study. **Respiratory medicine**. v. 103, issue 4, p. 503-507, 2009.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. O.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista. **Jornal de pediatria**, v. 78, p. 171-186, 2002.

RODRIGUES, M. Diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática:[revisão]. **Brasília méd**, p. 240-245, 2007.

ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 725-737, 2008.

SANTANA, A. V.; FONTANA, A. D.; PITTA, F. Reabilitação pulmonar pós-COVID-19. Vol 47, 2021.

ZHANG, T. et al. Salvianolic acid B inhalation solution enhances antifibrotic and anticoagulant effects in a rat model of pulmonary fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111475, 2021.

ANEXO B – PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVAS NO TRATAMENTO DO DIABETES

CAPÍTULO 4

PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DO DIABETES

Data de aceite: 01/06/2022

Data de submissão: 16/05/2022

Maria Eunice Siqueira Lira

Faculdade de Integração do Sertão
Serra Talhada, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5859234758930507>

Bruno José da Silva Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Biociências, Departamento de Bioquímica
Recife, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5524038913919195>

Natan Cordeiro Silva

Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Biociências, Departamento de Bioquímica
Recife, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5861102020265570>

André Santos de Almeida

Faculdade de Integração do Sertão
Serra Talhada, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5511324867247504>

Maria Eduarda Bezerra da Silva

Faculdade de Integração do Sertão
Serra Talhada, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4221578002891517>

Ana Vitória Tenório Lima

Faculdade de Integração do Sertão
Serra Talhada, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6130018630111555>

Paulo Sérgio Reginaldo Aires

Faculdade de Integração do Sertão
Serra Talhada, PE, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6347886149060286>

Fernanda Miguel de Andrade

Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Biociências, Departamento de Bioquímica
Recife, PE, Brasil
Universidade Federal de Campina Grande,
Departamento de Medicina
Campina Grande, PB, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8915203118340030>

RESUMO: O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico grave, crônico, complexo e de múltiplas etiologias, caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos. O desenvolvimento do DM está associado, com maior prevalência, a fatores genéticos e ambientais. Indivíduos diabéticos apresentam predisposição ao desenvolvimento de nefropatia, retinopatia, neuropatia, doenças cardiovasculares, deficiência no processo de cicatrização de feridas podendo até resultar em uma amputação de membros. Existe no mercado variedades de hipoglicêmicos, que é considerado o tratamento principal e eficaz, porém, é um tratamento que oferece riscos com suas diferentes complicações de reações adversas. Os avanços na pesquisa científica vêm proporcionando inovações significantes como os efeitos de plantas medicinais com propriedades antidiabéticas, sem efeitos colaterais prejudiciais, que é esperado dos medicamentos. Trata-se de uma revisão integrativa, que foi realizada a partir de buscas nos bancos de dados PubMed e Scielo, onde foram levadas em consideração

publicações no período de 2010 a 2021 referentes a ações antidiabéticas de plantas medicinais em relação ao diabetes tipo 1. Foram encontradas plantas medicinais ricas em flavanoides, taninos, alcalóides e outros compostos, que podem ser uma opção mais barata e que apresentam resultados satisfatórios no que se refere ao manejo do DM. Compostos produzidos e/ou extraídos a partir de plantas medicinais atuaram reduzindo os altos níveis de glicose e de lipídios no sangue, e também estimularam a regeneração do pâncreas. Durante a execução dessa pesquisa percebeu-se que as plantas medicinais desempenham um papel significativo no tratamento/controle do DM. Propriedades antidiabéticas significativas foram observadas, sem efeitos colaterais prejudiciais, mostrando a importância desse tipo de estudo para a comunidade científica e também para as indústrias farmacêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia. Doenças Crônicas. Hiperglicemia.

MEDICINAL PLANTS AS AN ALTERNATIVE IN THE TREATMENT OF DIABETES

ABSTRACT: Diabetes mellitus (DM) is a severe, chronic, complex and multi-etiological metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia, which results from a deficiency in insulin production or a resistance in peripheral tissues. The diabetic individual is predisposed to the development of other diseases and/or complications that affect their quality of life. There are varieties of hypoglycemics on the market, which is considered the main and effective treatment, however, it is a treatment that offers risks with its different complications of adverse reactions. Medicinal plants have been gaining prominence in scientific research with their satisfactory properties in different types of disease. This is an integrative review, which was carried out based on searches in the PubMed and Scielo databases, where publications in the period 2010 to 2021 referring to antidiabetic actions of medicinal plants in relation to type 1 diabetes. Medicinal plants rich in sources such as flavonoids, tannins, alkaloids and other compounds were found, which may be a cheaper option and which present satisfactory results regarding the management of DM. Compounds produced and/or extracted from medicinal plants acted by reducing the high levels of glucose and lipids in the blood, and also stimulating the regeneration of the pancreas. During the execution of this research, it was noticed that medicinal plants play a significant role in the treatment/control of DM. Significant antidiabetic properties were observed, without harmful side effects, showing the importance of this type of study for the scientific community and also for industries.

KEYWORDS: Phytotherapy. Chronic Diseases. Hyperglycemia.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico grave, crônico, complexo e de múltiplas etiologias, caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina (hormônio peptídeo que regula os níveis de glicose no sangue) e/ou quando o corpo não pode usa-la de maneira efetiva (BINDU, 2018; SOUMYA; SRILATHA, 2011). Pode se manifestar de duas formas principais: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2).

No DM1 ocorre destruição autoimune das células β do pâncreas que envolve fatores genéticos em combinação com gatilhos ambientais. O tratamento desse distúrbio é baseado

na administração de insulina exógena durante toda a vida do indivíduo acometido, porém, a oscilação da glicose sanguínea e comorbidades associadas resultam em complicações graves em longo prazo (MAAHS et al., 2010; KAWSER HOSSAIN et al., 2016; MILLMAN et al., 2016; CIERPKA-KMIEC; WRONSKA; KMIEC, 2019).

Já o DM2 está relacionado à resistência insulínica dos tecidos periféricos gerando uma liberação insuficiente ou suficiente de insulina, mas que não é reconhecida pelo tecido periférico. No tratamento, utilizam-se medicamentos que aumentam a secreção de insulina, sua sensibilidade tecidual, aumentam a excreção de glicose ou retardam a absorção de glicose no trato gastrointestinal (CIERPKA- KMIEC; WRONSKA; KMIEC, 2019).

Sabe-se que o DM predispõe a várias complicações, deixando o indivíduo acometido vulnerável a outras doenças e/ou condições que afetam drasticamente a qualidade de vida. Indivíduos diabéticos apresentam predisposição ao desenvolvimento de nefropatia, retinopatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e deficiência no processo de cicatrização de feridas podendo até resultar em uma amputação de membros (MIRHOSEINI et al., 2016).

Trata-se de um dos maiores problemas de saúde no mundo, o DM e suas complicações afetam pessoas tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, gerando um grande desafio socioeconômico. Estima-se que o Brasil está na 5ª posição do ranking mundial com 16,8 milhões de diabéticos adultos (20 a 79 anos), a incidência e mortalidade associada estão aumentando (DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

Atualmente o mercado possui um grande leque de medicamentos hipoglicêmicos, que é considerado o tratamento principal e eficaz, porém, é um tratamento que oferece riscos com suas diferentes complicações das reações adversas. Entre os medicamentos hipoglicêmicos pode-se citar a Glibenclamida, que está associada ao maior risco de morte cardiovascular, e a classe dos Tiazolidinedionas, que causam infecções no trato respiratório (ARAUJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

Os avanços na pesquisa científica vêm proporcionando inovações significantes na indústria farmacêutica, com ênfase em pesquisas relacionadas aos efeitos biológicos das plantas medicinais. Os estudos com plantas medicinais relatam a diminuição na incidência de diferentes doenças devido aos seus efeitos na proteção contra o dano oxidativo e na diminuição da inflamação (ASADI-SAMANI, 2017). Os produtos naturais, particularmente de origem vegetal, são a principal fonte para a descoberta de candidatos líderes promissores e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de medicamentos (SALEHI et al., 2019).

De acordo com estudos as plantas medicinais desempenham um papel significativo no tratamento do DM. As plantas tradicionais têm propriedades antidiabéticas significativas, sem efeitos colaterais prejudiciais, que é esperado dos medicamentos. São ricas em fontes de compostos antidiabéticos, como flavonóides, alcalóides, fenólicos e taninos que melhoram a eficiência dos tecidos pancreáticos, aumentando a secreção de insulina ou

diminuindo a absorção intestinal de glicose (KOOTI et al., 2016).

Diante do exposto, e levando em consideração toda a problemática do DM e o grande potencial biotecnológico das plantas medicinais para trata-lo, esta revisão tem como objetivo analisar as publicações referentes ao uso de plantas medicinais no tratamento do DM tipo 1 e descrever os principais resultados que comprovam a atividade antidiabética.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa, que foi realizada entre agosto e novembro de 2021, a partir de buscas nos bancos de dados PubMed e Scielo, onde foram levados em consideração os seguintes critérios de inclusão: publicações de 2010 a 2021, texto integral disponível nos idiomas português e inglês, e pesquisas experimentais *in vivo* que tratavam do tema proposto; e os seguintes critérios de exclusão foram aplicados: revisões de literatura, dissertações, teses. Para a obtenção das pesquisas nos bancos de dados foram utilizados os seguintes descritores: “Diabetes”, “Plantas medicinais”, “Plantas antidiabéticas”, “Fitoterapia”, “Diabetes”, “Medicinal plants”, “Antidiabetic plants”, “Phytotherapy”.

Após a coleta dos artigos nos bancos de dados os títulos e resumos foram lidos, e aqueles artigos que não estavam de acordo com os critérios de inclusão foram excluídos. Na segunda etapa os artigos selecionados foram baixados para serem lidos na íntegra, aqueles que não estavam disponíveis de forma gratuita foram excluídos; aqueles disponíveis foram lidos na íntegra e analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os critérios estabelecidos para pesquisa foi realizado um levantamento através de duas bases de dados onde 657 artigos foram localizados no PubMed e 13 no ScieLo, totalizando 670 artigos. Após a leitura dos títulos e resumos 517 artigos foram excluídos, desses 239 eram artigos de revisão, 224 estavam fora da temática e 54 tratavam-se de estudos *in vitro*. Os 153 artigos restantes passaram para a etapa da leitura do texto na íntegra, porém 133 artigos não estavam disponíveis de forma gratuita, e apenas 20 foram lidos na íntegra. Após a leitura do texto na íntegra, os 20 artigos foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão (Figura 1).

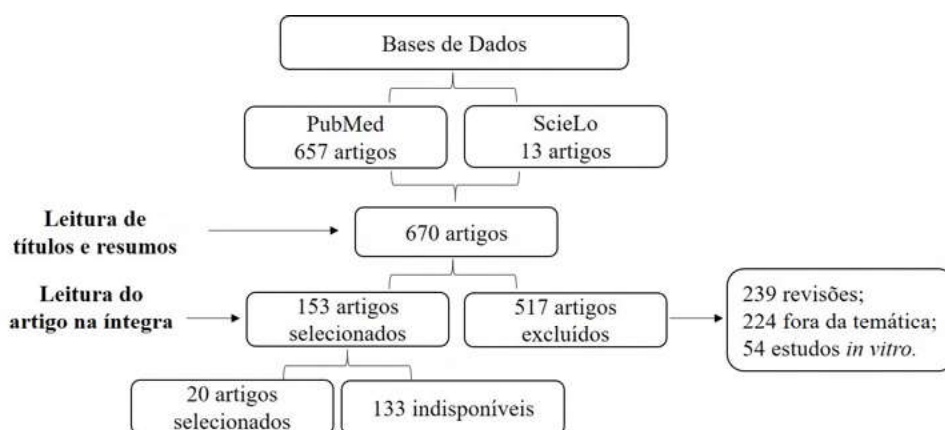


Figura 1. Fluxograma mostrando as etapas da pesquisa bibliográfica nas bases de dados.

Os artigos selecionados relatam o tema proposto de forma clara e objetiva, e tiveram seus objetivos e principais resultados descritos no quadro 1.

Autor	Objetivos	Principais resultados
AGWAYA et al., 2016	Avaliar a atividade antidiabética do extrato aquoso da casca da raiz de <i>Zanthoxylum chalybeum</i> (200 e 400 mg/Kg) em ratos Wistar, machos e fêmeas, diabéticos induzidos por aloxana.	Após 28 dias de tratamento o extrato aquoso da casca da raiz de <i>Z. chalybeum</i> foi capaz de regular os níveis de glicose no sangue na dose de 400 mg/Kg, mostrando ser essa ação dependente da dose; além disso essa dosagem foi capaz de induzir a regeneração das células β ; porém o número dessas células era baixo, o que sugere que o extrato também atua no aumento da resposta dos receptores de insulina à insulina.
MNAFGUI et al., 2016	Investigar as atividades antidiabética, antidiarreica e anti-hipertensiva do óleo essencial extraído das folhas de <i>Zygophyllum album</i> na dose de 200 mg/Kg em ratos Wistar machos diabéticos induzidos por aloxana.	Após 30 dias de tratamento o óleo essencial de <i>Z. album</i> diminuiu significativamente a atividade da α -amilase no pâncreas em 43% e no soro em 38%, resultando na redução do nível de glicose no sangue em 60% e na hemoglobina glicada em 17%.
SIQUEIRA et al., 2016	Investigar os mecanismos de ação hepática do extrato etanólico das flores de <i>Combretum lanceolatum</i> (500 mg/Kg) relacionados ao seu efeito anti-hiperglicêmico em ratos Wistar machos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 21 dias de tratamento o extrato etanólico das flores de <i>C. lanceolatum</i> diminuiu em 31% a glicemia pós-prandial e em 27% a glicemia em jejum.
BABUKUMAR et al., 2017	Avaliar o potencial anti-hiperglicêmico do geraniol (100, 200 e 400 mg/Kg) sobre as principais enzimas do metabolismo de carboidratos em ratos Wistar machos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 45 dias de tratamento o geraniol, em todas as dosagens, diminuiu significativamente a glicose no sangue e aumentou a insulina plasmática para quase o normal; porém os resultados mais expressivos foram nas dosagens de 200 e 400 mg/Kg; mostrando que a atividade anti-hiperglicêmica do geraniol aumenta de acordo com o aumento da dose.

YUSOFF et al., 2017	Avaliar os possíveis efeitos do extrato aquoso do vinagre de <i>Nypa fruticans</i> Wurmb. (250, 500 e 1000 mg/Kg) no pâncreas e no fígado de ratos Sprague-Dawley machos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 12 dias de tratamento o extrato aquoso do vinagre de <i>N. fruticans</i> Wurmb. na dose de 1000 mg/Kg reduziu o nível de glicose no sangue em 56,6%, enquanto que a dose de 500 mg/Kg reduziu em 49,2%; mostrando que o extrato tem um efeito dependente da dose.
ZIAMAJIDI et al., 2017	Avaliar os possíveis efeitos terapêuticos do extrato aquoso de <i>Allium sativum</i> (alho) (1mL/100g $\approx$ 2g/Kg) sobre o diabetes induzido por estreptozotocina + nicotinamida em ratos Wistar machos por meio do estudo da expressão do TNF- α e do estado de estresse oxidativo nos tecidos renais.	Após 33 dias de tratamento o extrato de alho diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue, os níveis de ureia, ácido úrico e de creatinina; além disso o estresse oxidativo, a produção de óxido nítrico e de TNF- α também foram reduzidos significativamente.
AKHTAR et al., 2018	Explorar o efeito antidiabético do extrato metanólico das raízes de <i>Ipomoea batatas</i> L. (4g/Kg) em ratos Wistar diabéticos induzidos por aloxana.	Após de 14 dias de tratamento o extrato metanólico das raízes de <i>I. batatas</i> L. diminuiu significativamente o nível de glicose no sangue, nível de glicação de proteínas e aumentou HDL.
BARBOSA et al., 2018	Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico da casca interna do caule de <i>Spondias tuberosa</i> em ratos Wistar machos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 21 dias de tratamento o extrato hidroetanólico da casca interna do caule de <i>Spondias tuberosa</i> diminuiu significativamente a glicose no sangue em jejum e a glicose pós- prandial; além disso também foi capaz de reduzir a ingestão de alimentos e água, o volume urinário e melhorou o ganho de peso corporal.
DRA et al., 2019	Avaliar a potencial atividade antidiabética do extrato metanólico de <i>Caralluma europaea</i> (250 e 500 mg/Kg) em camundongos Swiss albinos machos e fêmeas diabéticos induzidos por aloxana.	Após 10 h do tratamento o extrato metanólico de <i>C. europaea</i> exibiu uma redução acentuada continuados níveis de glicose no sangue; A dose de 250 mg/Kg apresentou redução de $386 \pm 6,35$ mg / dl para $157 \pm 10,39$ mg / dl em 8 h e para $87 \pm 0,28$ mg / dl em 10 h; Já a dose de 500 mg/Kg causou uma redução máxima na glicose sanguínea (de 355 ± 19 mg / dl para $96 \pm 17,03$ mg / dl em 8 h para $72 \pm 8,37$ mg / dl em 10 h.
NAZ et al., 2019	Avaliar o potencial antidiabético do extrato metanólico de <i>Sedum adenotrichum</i> (5 g/Kg) em ratos Sprague-Dawley machos diabéticos induzidos por aloxana.	O extrato metanólico de <i>S. Adenotrichum</i> reduziu significativamente o nível de glicose sanguínea após 4, 8, 12, 16 e 20 dias de tratamento; também observou-se uma redução significativa da hemoglobina glicada; após 20 dias de tratamento houve uma queda muito significativa no nível de ureia sérica, ALT, ALP e no colesterol sérico.

ALEMA et al., 2020	Investigar o efeito antidiabético do extrato bruto e das frações de solventes da casca do caule de <i>Terminalia brownie</i> Fresen (250, 500 e 750mg/Kg) em camundongos Swiss albinos machos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 15 dias de tratamento o extrato bruto reduziu significativamente o nível de glicose sanguínea em todas as dosagens testadas, porém na de 250 a redução ocorreu com 15 dias de tratamento, enquanto que as dosagens de 500 e 750 mg / kg a redução ocorreu a partir do dia 10 do experimento; após o tratamento com o extrato bruto de <i>T. brownii</i> (250, 500, 750 mg/kg) por 15 dias, a glicose sanguínea foi reduzida em 39,09%, 49,1%, 66,75% respectivamente. A administração do resíduo aquoso baixou o BGL significativamente no dia 5, dia 10 e dia 15 de tratamento. A fração de acetato de etila também reduziu o BGL de forma muito significativa no décimo quinto dia de tratamento. No entanto, a administração da fração de n- butanol não diminuiu significativamente o BGL. O resíduo aquoso, a fração de acetato de etila na dose de 500 mg / kg diminuíram o BGL em 55% e 40,6% após 15 dias de tratamento, respectivamente.
MAHMOOD et al., 2020	Investigar a eficácia dos extratos da raiz de <i>Rhazya stricta</i> em camundongos Swiss albinos diabéticos induzidos por aloxana.	Após 28 dias de administração oral das frações de extrato, ocorreu redução no nível de glicose e no perfil lipídico de quase todos os grupos; resultados semelhantes foram observados no nível de hemoglobina glicosilada. A atividade anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipídica máxima foi demonstrada pelo SCL-II (fração da segunda camada de clorofórmio na dosagem de 20 mg/ Kg), e seus efeitos de redução da glicose são comparáveis aos resultados do grupo tratado com o medicamento padrão glibenclâmida.
YOUNUS et al., 2020	Analisar os fitoconstituintes do extrato de <i>Euphorbia nivulia</i> (125, 250 e 500 mg/kg) e avaliar seu potencial antioxidante, efeitos inibitórios da α -glucosidase e anti-hiperglicêmicos em ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 28 dias de tratamento o extrato de <i>E. nivulia</i> apresentou efeito hipoglicêmico significativo nas três dosagens testadas, sendo a dose de 500 mg / kg a dosagem que mais reduziu o nível de glicose; essa dosagem também melhorou significativamente os níveis de TC, TG e HDL, e reduziu significativamente as áreas necróticas no pâncreas provocadas pela estreptozotocina.
ARAYA et al., 2021	Investigar a atividade antidiabética de isolados da folha de <i>Aloe megalacantha</i> Baker em camundongos Swiss albinos machos e fêmeas diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 21 dias de tratamento os animais tratados com 200 e 400mg/Kg do exsudato de <i>A. megalacantha</i> apresentaram diminuição significativa nos níveis de glicose sanguínea; os isolados também apresentaram resultados satisfatórios, a dose de 400 mg / kg de Ia e 200 mg / kg de Ib mostraram reduções significativas nos níveis de glicose no sangue.
EL-NEWARY et al., 2021	Determinar o efeito antidiabético do extrato etanólico de <i>Launaea nudicaulis</i> (250 e 500 mg/Kg) em ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina	Após 5 semanas de tratamento foi observado que a administração do extrato reduziu significativamente o nível de glicose sanguínea, maximizou significativamente o nível de insulina sérica; e reduziu os níveis de TC, TG, VLDL-C e LDL-C significativamente.

MECHCHATE et al., 2021 ^a	Investigar os efeitos antidiabético, antiinflamatório e antioxidante da fração polifenólica das sementes <i>Coriandrum sativum</i> (25 e 50 mg/Kg) em camundongos Swiss albinos e em ratos Wistar diabéticos induzidos por aloxana.	Após 28 dias de tratamento observou-se uma redução significativa do nível de glicose sanguínea; também reduziu o nível de LDL em 61% e 46% (25 e 50 mg/Kg, respectivamente), e o HDL em 20% para os grupos tratados com ambas as doses.
MECHCHATE et al., 2021b	Investigar atividade antidiabética e anti-hiperglicêmica das folhas de <i>Withania frutescens</i> (200 e 400 mg/Kg) em camundongos Swiss albinos diabéticos induzidos por aloxana.	Após 28 dias de tratamento ambas as doses reduziram significativamente o nível de glicose sanguínea, porém a dose 400 mg/Kg foi mais eficiente.
NAZIR et al., 2021	Avaliar o potencial antioxidante, antibacteriano e antidiabético de compostos isolados de bagas de <i>Elaeagnus. Umbellata</i> em ratos Sprague-Dawley induzidos por estreptozotocina.	Após 21 dias de tratamento houve diminuição do nível de glicose sanguínea. A administração oral do composto (30, 15, 50 mg / kg) causou uma diminuição significativa no nível de glicose no sangue. A redução do nível de glicose no sangue foi observada a partir do 7º dia em diante. O composto nas doses 2 e 5 mg / kg reduziu lentamente o nível de glicose no sangue.
SAADH., 2021	Avaliar os efeitos hipoglicêmicos e hipolipemiantes da administração oral de sementes de duas plantas medicinais, <i>Silybum marianum</i> e feno-grego, em ratos albinos machos diabéticos induzidos por aloxana.	Após 4 semanas de tratamento a administração oral de 0,5 g / kg de <i>Silybum marianum</i> e 2 g / kg de sementes de feno-grego por dia resultou em uma redução significativa da glicose, hemoglobina glicada, do colesterol dos níveis de triglicerídeos.
SHILL et al., 2021	Avaliar os efeitos antidiabéticos do extrato das folhas de <i>Colocasia affinis</i> (250 e 500 mg/Kg) em ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas diabéticos induzidos por estreptozotocina.	Após 28 dias de tratamento com o extrato observou-se que ocorreu a redução dos níveis de glicose no sangue em jejum de maneira dependente da dose; também foi observada a redução dos triglicerídeos séricos, do colesterol total e do LDL em ambas as dosagens.

Quadro 1 – Atividade antidiabética de plantas medicinais de acordo com publicações de 2010-2021.

Diante de todas as complicações que o diabetes pode provocar, uma série de pesquisas se concentram na busca de alternativas para minimizar seus efeitos. Vários desses estudos visam avaliar a atividade antidiabética de plantas medicinais ou de seus metabólitos isolados, analisando seus efeitos bioquímicos, citoprotetores e estimuladores da proliferação das células β do pâncreas.

As pesquisas *in vivo* utilizam-se de modelos animais com diabetes induzidos. Os resultados do presente estudo mostram a preferência pelo uso de roedores (ratos e camundongos) como modelos animais e a indução do DM1 em todos os trabalhos foi realizada através de compostos químicos.

Experimentalmente, o DM pode ser induzido por manipulação química, cirúrgica e genético-imunológica. Os compostos químicos mais importantes e mais frequentemente utilizados para a indução do DM1 são a Aloxana e a Estreptozotocina (STZ), e a via de administração mais segura é a intraperitoneal, pois evita efeitos tóxicos e reduz a

mortalidade geral. Os dois compostos são análogos da glicose e tóxicos as células β do pâncreas, causando a destruição das mesmas, consequentemente isso afeta a produção/liberação de insulina provocando a hiperglicemia (SZKUDELSKI, KANDULSKA; OKULICZ, 1998; FEDERIUK et al., 2004; RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016).

Foi possível verificar que existe uma discordância em relação ao sexo do modelo animal utilizado, alguns estudos trabalharam apenas com roedores machos, enquanto outros utilizaram de ambos os sexos. Vale ressaltar que uma padronização em relação ao sexo do modelo animal deve ser levada em consideração para obtenção de resultados fidedignos, pois sabe-se que os roedores mostram uma diferença substancial de gênero na sensibilidade de STZ, sendo os camundongos machos mais suscetíveis ao diabetes mellitus induzido por STZ do que as fêmeas (AHMAD et al., 2014; GOUD; DWARAKANATH; CHIKKA, 2015).

De acordo com as pesquisas analisadas observa-se que alguns critérios específicos foram levados em consideração para avaliar a atividade antidiabética, como parâmetros bioquímicos (principalmente o nível de glicose sanguínea), a histopatologia do pâncreas e o perfil lipídico. Sabe-se que o DM1 é caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina devido a destruição das células β do pâncreas, dessa forma é imprescindível analisar o nível de glicose sanguínea após jejum, justificando dessa maneira a utilização desse parâmetro para averiguar a atividade antidiabética.

Como o pâncreas é o órgão responsável pela produção de insulina, verificar sua estrutura histológica em estudos que buscam averiguar atividade antidiabética também é relevante, pois o surgimento de um composto que estimule a regeneração das células β e/ou estimule a produção de insulina por elas é de extrema importância para a indústria farmacêutica. Então os estudos referentes ao extrato aquoso da casca da raiz de *Zanthoxylum chalybeum*, que foi capaz de estimular a regeneração das células β (Agwava et al., 2016), ao geraniol, que aumentou a síntese de insulina (Babukumar et al., 2017) e ao extrato de *Euphorbia nivulia*, que reduziu significativamente as áreas necróticas no pâncreas (Younus et al., 2020), devem ser levados em consideração e uma análise referente aos mecanismos desses compostos são de extrema importância.

Sabe-se que a dislipidemia está associada à hiperglicemia e ambas aumentam a prevalência de complicações cardiovasculares (CHEHADE; GLADYSZ; MOORADIAN, 2013). Por isso é necessário averiguar o perfil lipídico dos animais em estudos onde se busca averiguar atividade antidiabética. Os resultados analisados são bem otimistas no que se refere ao perfil lipídico de roedores diabéticos, pois todos os estudos que avaliaram esse parâmetro obtiveram ações satisfatórias das plantas medicinais quando comparado com o grupo de roedores diabéticos controle, ou seja, as plantas atuaram diminuindo os níveis de lipídios no sangue.

Vale ressaltar os metabólitos presentes nas formulações dos estudos analisados, como flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos e taninos. Os flavonóides, alcalóides,

compostos fenólicos e taninos atuam melhorando a eficiência dos tecidos pancreáticos, aumentando a secreção de insulina ou diminuindo a absorção intestinal de glicose (KOOTI et al., 2016). Os flavonoides e taninos são discutidos pelas suas atividades satisfatórias no diabetes, são conhecidos por regenerar as células β danificadas, e por ajudar na regulação da concentração de glicose no sangue.

As plantas medicinais são ricas fontes de flavanoides, taninos, alcalóides e outros compostos, portanto, podem ser uma opção mais barata e apresentar menos resistência ao uso. O que foi percebido durante a execução dessa pesquisa é que as plantas medicinais desempenham um papel significativo no tratamento/controle do DM.

CONCLUSÃO

Conclui-se que propriedades antidiabéticas significativas foram observadas, sem efeitos colaterais prejudiciais, mostrando a importância desse tipo de estudo para a comunidade científica e também para as indústrias farmacêuticas. Esta revisão apresentou plantas que demonstraram reduzir não só os níveis de glicose no sangue, mas também os níveis de lipídios e os efeitos patológicos do pâncreas causados pelo diabetes mellitus, com poucos efeitos colaterais em modelos de roedores diabéticos induzidos.

REFERÊNCIAS

- AGWAYA, M. S.; VUZI, P. C.; NANDUTU, A. M. Hypoglycemic Activity of Aqueous Root Bark Extract *Zanthoxylum chalybeum* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, 8727590, 2016.
- AHMAD, W.; KHAN, I.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; SUBHAN, F.; KARIM, N. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Artemisia indica* linn (aerial parts) in streptozotocin induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, n. 1, p. 618-623, 2014.
- AKHTAR, N.; AKRAM, M.; DANIYAL, M.; AHMAD, S. Evaluation of antidiabetic activity of *Ipomoea batatas* L. extract in alloxan-induced diabetic rats. **Int. J. Immunopathol Pharmacol.**, 32:2058738418814678, 2018.
- ALEMA, N. M.; PERIASAMY, G.; SIBHAT, G. G.; TEKULU, G. H.; HIBEN, M. G. Antidiabetic Activity of Extracts of *Terminalia brownii* Fresen. Stem Bark in Mice. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 12, p. 61-71, 2020
- ARAUJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. S.; CRUZ, T.R. P. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 44, n. 6, 2000.
- ARAYA, T. Y.; KARIM, A.; HAILU, G. S.; PERIASAMY, G.; KAHSAY, G. Antihyperglycemic Activity of TLC Isolates from the Leaves of *Aloe megalacantha* Baker in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Diabetes Metab. Syndr. Obes.**, v. 14, p. 1153-1166, 2021.

ASADI-SAMANI, M.; MORADI, M. T.; MAHMOODNIA, L.; ALAEI, S.; ASADI-SAMANI, F.; LUTHER, T. Traditional uses of medicinal plants to prevent and treat diabetes; an updated review of ethnobotanical studies in Iran. **Journal of Nephrothol.**, v. 6, n. 3, 2017.

BABUKUMAR, S.; VINOTHKUMAR, V.; SANKARANARAYANAN, C.; SRINIVASAN, S. Geraniol, a natural monoterpene, ameliorates hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats- **Pharm. Biol.**, v. 55, n. 1, p. 1442-1449, 2017.

BARBOSA, H. M.; AMARAL, D.; NASCIMENTO, J. N.; MACHADO, D. C.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ROLIM, L. A.; LOPES, N. P.; GOMES, D. A.; LIRA, E. C. Spondias tuberosa inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 227, p. 248-257, 2018.

CHEHADE, J. M.; GLADYSZ, M.; MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in Type 2 Diabetes: Prevalence, Pathophysiology, and Management. **Drugs**, v. 73, p. 327–339, 2013.

CIERPKA-KMIEC, K.; WRONSKA, A.; KMIEC, Z. *In vitro* generation of pancreatic β -cells for diabetes treatment. I. β -like cells derived from human pluripotent stem cells. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 57, n. 1, p. 1-14, 2019.

DRA, L. A.; SELLAMI, S.; RAIS, H.; AZIZ, F.; AGHRAZ, A.; BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M.; LARHSINI, M. Antidiabetic potential of *Caralluma europaea* against alloxan-induced diabetes in mice. **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 26, n. 6, p. 1171-1178, 2019.

EL-NEWARY, S.; AFIFI, S. M.; ALY, M. S.; AHMED, R. F.; GENDY, A. E. N. G. E.; ABD-ELGAWAD, A. M.; FARAG, M. A.; ELGAMAL, A. M.; ELSHAMY, A. I. Chemical Profile of *Launaea nudicaulis* Ethanolic Extract and Its Antidiabetic Effect in Streptozotocin-Induced Rats. **Molecules**, v. 26, n. 4, 2021.

FEDERIUK, I. F.; CASEY, H.; QUINN, M. J.; WOOD, M. D.; WARD, W. K. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comp. Med.**, v. 54, n. 3, p. 252-257, 2004.

GOUD, B. J.; DWARAKANATH, V.; CHIKKA, B. K. Streptozotocin – A diabetogenic agent in animal models. **Int. J. Pharm.**, v. 3, n. 1, p. 253–269, 2015.

KAWSER HOSSAIN, M.; DAYEM, A. A.; HAN, J.; SAHA, S. K.; YANG, G. M.; CHOI, H. Y.; CHO, S. G. Recent advances in disease modeling and drug Discovery for diabetes mellitus using induced pluripotent stem cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 256, 2016.

KOOTI, W.; FAROKHIPOUR, M.; ASADZADEH, Z.; ASHTARY-LARKY, D.; ASADI-SAMANI, M. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. **Electron Physician**, v. 8, n. 1, p. 1832-1842, 2016.

MAAHS, D. M.; WEST, N. A.; LAWRENCE, J. M.; MAYER-DAVIS, E. J. Epidemiology of Type 1 Diabetes. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 39, n. 3, p. 481-497, 2010.

MAHMOOD, R.; KAYANI, W. K.; AHMED, T.; MALIK, F.; HUSSAIN, S.; ASHFAQ, M.; ALI, H.; RUBNAWAZ, S.; GREEN, B. D.; CALDERWOOD, D.; KENNY, O.; RIVERA, G. A.; MIRZA, B.; RASHEED, F. Assessment of antidiabetic potential and phytochemical profiling of *Rhazya stricta* root extracts. **BMC Complement. Med. Ther.**, v. 20, n. 1, p. 293, 2020.

MECHCHATE, H.; ES-SAFI, I.; AMAGHNOUJE, A.; BOUKHIRA, S.; ALOTAIBI, A. A.; EL-ZHARANI, M.; NASR, F. A.; NOMAN, O. M.; CONTE, R.; AMAL, H. Y.; BEKKARI, H.; BOUSTA, D. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antidiabetic Properties of LC- MS/MS Identified Polyphenols from Coriander Seeds. **Molecules**, v. 26, n. 2, 2021a.

MECHCHATE, H.; ES-SAFI, I.; LOUBA, A.; ALQAHTANI, A. S.; NASR, F. A.; NOMAN, O. M.; FAROOQ, M.; ALHARBI, M. S.; ALQAHTANI, A.; BARI, A.; BEKKARI, H.; BOUSTA, D. *In Vitro* Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity and *In Vivo* Antidiabetic Activity of *Withania frutescens* L. Foliar Extract. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 293, 2021b.

MILLMAN, J. R.; XIE, C.; VAN DERVORT, A.; GÜRTLER, M.; PAGLIUCA, F. W.; MELTON, D. A. Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes. **Nature Communications**, v. 7, p. 11463, 2016.

MIRHOSEINI, M.; SALEH, N.; MOMENI, A.; DERIS, F.; ASADI-SAMANI, M. A study on the association of diabetic dermopathy with nephropathy and retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Nephrothol.**, v. 5, n. 4, p. 139-143, 2016.

MNAFGUI, K.; KCHAOU, M.; SALAH, H. B.; HAJJI, R.; KHABBABI, G.; ELFEKI, A.; ALLOUCHE, N.; GHARSALLAH, N. Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 1326-1333, 2016.

NAZ, D.; MUHAMAD, A.; ZEB, A.; SHAH, A. *In vitro* and *in vivo* Antidiabetic Properties of Phenolic Antioxidants From *Sedum adenotrichum*. **Front Nutr.**, v. 6, p. 177, 2019.

NAZIR, N.; ZAHOOOR, M.; NISAR, M.; KHAN, I.; ULLAH, R.; ALOTAIBI, A. Antioxidants Isolated from *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) Protect against Bacterial Infections and Diabetes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Model. **Molecules**, v. 26, n. 15, 2021.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v. 78, p. 13-31, 2016.

SAADH, M. J. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of combined milk thistle and fenugreek seeds in alloxan-induced diabetic albino rats- **Veterinary World**, v. 13, n. 8, p. 1732–1736, 2021.

SALEHI, B.; ATA, A.; KUMAR, N. V. A.; SHAROPOV, F.; RAMÍREZ-ALARCÓN, K.; RUIZ-ORTEGA, A.; AYATOLLAHI, S. A.; FAKOU, P. V. T.; KOBARFARD, F.; ZAKARIA, Z. A.; IRITI, M.; TAHERI, Y.; MARTORELL, M.; SUREDA, A.; SETZER, . N.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SANTINI, A.; CAPASSO, R.; OSTRANDER, E. A.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; CHO, W. C.; SHARIFI-RAD, J. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. **Biomolecules**, v. 9, n.10, 2019.

SHILL, M.C.; BEPARI, A. K.; KHAN, M.; TASNEEM, Z.; AHMED, T.; HASAN, M. A.; ALAM, M. J.; HOSSAIN, M.; RAHMAN, M. A.; SHARKER, S. M.; SHARIAR, M.; RAHMAN, G. M. S.; REZA, H. M. Therapeutic Potentials of *Colocasia affinis* Leaf Extract for the Alleviation of Streptozotocin-Induced Diabetes and Diabetic Complications: In vivo and in silico-Based Studies. **J. Inflamm. Res.**, v. 14, p. 443-459, 2021.

SIQUEIRA, J. T.; BATISTELA, E.; PEREIRA, M. P.; DA SILVA, V. C.; DE SOUSA JUNIOR, P. T.; ANDRADE, C. M.; KAWASHITA, N. H.; BERTOLINI, G. L. Combretum lanceolatum flowers ethanol extract inhibits hepatic gluconeogenesis: an in vivo mechanism study. **Pharm. Biol.**, v. 54, n. 9, p. 1671-1679, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, p. 491, 2019-2020.

SOUMYA, D.; SRILATHA, B. Late Stage Complications of Diabetes and Insulin Resistance. **J. Diabetes Metab.**, v. 2, 2011.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiol. Res.**, v. 47, p. 343-346, 1998.

YOUNUS, M.; HASAN, M. M.; AHMAD, K.; SHARIF, A.; ASIF, H. M.; ASLAM, M. R.; HAQ, I.; AHMAD, Z. α -Glucosidase Inhibitory, Anti-Oxidant, and Anti-Hyperglycemic Effects of *Euphorbia nivulia*-Ham, in STZ-Induced Diabetic Rats. **Dose Response.**, v. 18, n. 3, 2020.

YUSOFF, N. A.; LIM, V.; AL-HINDI, B.; RAZAK, K. N. A.; WIDYAWATI, T.; ANGGRAINI, D. R.; AHMAD, M.; ASMAWI, M. Z. *Nypa fruticans* Wurm. Vinegar's Aqueous Extract Stimulates Insulin Secretion and Exerts Hepatoprotective Effect on STZ-Induced Diabetic Rats. **Nutrients.**, v. 9, n. 9, p. 925, 2017.

ZIAMAJIDI, N.; NASIRI, A.; ABBASALIPOUKABIR, R.; MOHEB, S. Effects of garlic extract on TNF- α expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ + nicotinamide-induced diabetes. **Pharm. Biol.**, v. 55, n. 1, p. 526-531, 2017.

ANEXO C – EFEITO TERATOGENICO DE PLANTAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA

EFEITO TERATOGENICO DE PLANTAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Data de aceite: 03/06/2024

Pamela Lais da Silva Oliveira

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/1258181433812766>

Natalício Ramos da Silva

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/8951021105542173>

Lorieli Vasconcelos de Queiroz

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/0590204969936334>

Adeilda da Silva Barbosa

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1704401323234541>

Maria Aparecida Espírito Santo da Silva

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<https://lattes.cnpq.br/9381460522783839>

Edivan Lourenço da Silva Júnior

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4267193642953382>

Danielle das Graças de Figueiredo Negromonte

Faculdade Santíssima Trindade – FAST,
Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2566840095955688>

Natan Cordeiro da Silva

Universidade Federal de Pernambuco –
Centro de Biociências – Departamento de
Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5861102020265570>

Bruno José da Silva Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco –
Centro de Biociências – Departamento de
Bioquímica – Recife, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5524038913919195>

Liciana Gondim Sampaio de Moraes

Faculdade de Medicina do Sertão – FMS,
Arcoverde, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7210520015996562>

Caroline Alves Arcanjo

Faculdade de Medicina do Sertão – FMS,
Arcoverde, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3605198233879422>

Fernanda Miguel de Andrade

Faculdade de Medicina do Sertão – FMS,
Arcoverde, Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8915203118340030>

RESUMO: Durante o período gestacional, a utilização das plantas medicinais é comum uma vez que o uso de uma grande quantidade de fármacos é proibido. No entanto, algumas espécies vegetais apresentam importantes efeitos nocivos ao desenvolvimento embrionário. Nessa revisão foram levantados dados referentes às plantas medicinais utilizadas e seus efeitos negativos durante a gestação. Realizou-se uma busca de artigos nas bases de dados Pubmed e Google Acadêmico, os resumos foram lidos, excluindo-se os estudos que não se enquadraram com a proposta desta revisão. Observou-se que as plantas medicinais possuem efeitos benéficos no tratamento de doenças, porém, alguns constituintes delas prejudicam o desenvolvimento embrionário, expondo o embrião/feto ao aborto, embriotoxicidade e o risco teratogênico. Assim, algumas plantas medicinais são causadoras de danos à gestação, então seu consumo deve ser feito em observação a fim de evitar os prejuízos associados ao seu uso, necessitando também de medidas de educação para alertar a mãe sobre esses riscos.

PALAVRAS-CHAVE: Anomalias congênitas. Plantas medicinais. Embriologia.

TERATOGENIC EFFECT OF PLANTS: A LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: During the gestational period, the use of medicinal plants is common since the use of a large amount of drugs is prohibited. However, some plant species have important harmful effects on embryonic development. In this review, data regarding the medicinal plants used and their negative effects during pregnancy were collected. A search for articles was carried out in the Pubmed and Google Scholar databases, the abstracts were read, excluding studies that did not fit with the proposal of this review. It was observed that medicinal plants have beneficial effects in the treatment of diseases, however, some constituents of them harm embryonic development, exposing the embryo/fetus to abortion, embryotoxicity and teratogenic risk. Thus, some medicinal plants cause damage to pregnancy, so their consumption must be carried out under observation in order to avoid the damage associated with their use, also requiring educational measures to alert the mother about these risks.

KEYWORDS: Congenital anomalies. Medicinal plants. Embryology.

INTRODUÇÃO

As plantas vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas desde a antiguidade, tendo como objetivos a prevenção, o tratamento e até a cura de muitas patologias (Carvalho *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2022). Essa prática é bastante difundida no Brasil, surgiu a partir da contribuição de diferentes povos (negros, índios e europeus), e na maioria dos casos a terapia com plantas medicinais é realizada sem orientação médica (Rodrigues *et al.*, 2011). Os avanços científicos permitiram o aumento de pesquisas sobre plantas medicinais, com o intuito de associar sua composição química com seus efeitos terapêuticos, atestando, frequentemente, o uso popular (Cavalcante *et al.*, 2013).

Grande parte da população acredita que produtos advindos de plantas medicinais não apresentam riscos à saúde, sendo utilizadas principalmente na forma de chás e infusões (Sánchez-Yactayo *et al.*, 2020). Nesse contexto se destacam as gestantes, que buscam nesses produtos o alívio de alguns sintomas da gestação, como náuseas, vômitos, constipação, azia etc. (Gorril *et al.*, 2016).

Apesar do crescente interesse mundial em explorar as propriedades biológicas de plantas medicinais, tais pesquisas também evidenciaram efeitos tóxicos que podem ser provocados por seus componentes químicos, além de risco de interações com outros medicamentos (Cabut *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2021). Os efeitos indesejados podem ser diretos ou indiretos na célula, por interferência no processo mitótico, interações intercelulares, biossíntese enzimática, modulação da expressão gênica, pH celular, equilíbrio osmótico, matriz extracelular, crescimento tecidual e pelo controle da metilação do DNA (Welsch, 1992; Lapa *et al.*, 2007). Estudos associam esses mecanismos a abortos, anormalidades cromossômicas, malformações, reabsorção, interrupção da implantação do conceito, retardo do crescimento intrauterino, deterioração funcional do recém-nascido e morte fetal (McElhatton, 1999; Hsieh *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2019).

É preocupante, pois em muitos casos o uso de produtos naturais por gestantes está relacionado com falta de recursos financeiros para o tratamento adequado na redução dos sintomas decorrentes da gestação (Maia, 2019). Sabe-se que a gestação é um período que exige cuidados especiais, principalmente no primeiro trimestre, pois o embrião/feto se encontra em rápido crescimento, com suas células proliferando e se especializando, sendo dessa forma vulnerável a tais efeitos adversos (Silva, 2014; Bebitoglu, 2020). Percebe-se que o uso indiscriminado de plantas medicinais por gestantes é um problema de saúde pública, pois existem riscos tanto para o embrião/feto como para a gestante, que podem gerar altos custos médicos, além de afetar de forma negativa a qualidade de vida desses indivíduos.

Considerando os aspectos descritos, a alta prevalência do uso de plantas medicinais e os danos que determinadas plantas podem causar durante a gestação, este estudo busca reunir dados relevantes sobre os principais efeitos teratogênicos de plantas durante a gestação descrito na literatura científica.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura, com caráter exploratório-descritivo, realizado no período de agosto a setembro de 2023. Para isso, foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados do PubMed e Google Acadêmico. Foi utilizada para o rastreamento dos artigos a combinação dos seguintes descritores: efeito teratogênico, plantas, malformações congênitas; teratogenic effect, plants, congenital malformations. Foram levados em consideração os seguintes critérios de inclusão: artigos completos disponíveis nos idiomas português e inglês, que comprovam os efeitos teratogênicos de plantas, publicados no período de 2018-2022. O critério de exclusão foi: revisões de literatura.

Após a coleta dos artigos, os títulos e resumos deles foram lidos, aqueles que não atendiam os critérios de inclusão e as repetições foram excluídos. Os artigos selecionados, após a leitura dos títulos e resumos, foram lidos na íntegra, os que não atendiam os critérios de inclusão foram excluídos, e os selecionados tiveram seus resultados analisados e comparados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a busca de artigos para a construção desta revisão, foram encontrados 387 registros, no qual apenas 8 se enquadravam nos critérios de inclusão, porém, 1 tratava-se de uma tese e 2 estavam duplicados, restando então 5 estudos para análise.

Com os avanços da pesquisa científica, muitas espécies vegetais são analisadas para a avaliação do seu potencial nocivo a gestação. No quadro 1 estão listadas algumas dessas espécies e seus efeitos negativos no período gestacional.

Autores/ano	Nome da espécie	Nome popular	Aplicação na medicina popular/ação	Efeitos durante a gestação
Souza <i>et al.</i> , 2018	<i>Poincianella pyramidalis</i>	Catingueira	Anti-inflamatória, diurética, digestiva e expectorante.	Início da gestação: morte embrionária; fetos malformados.
Nogueira <i>et al.</i> , 2022	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Jurema preta	Gastrite, úlceras de pele, inflamações.	Múltiplas malformações: palatosquise, hipoplasia do osso mandibular, hipoplasia unilateral do osso incisivo com descontinuidade do lábio superior, microftalmia, escoliose.
Goronski <i>et al.</i> , 2021	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela de cheiro; canela da Índia	Anti-inflamatória; antisséptica, digestiva, inflamações da mucosa oral, estímulo a menstruação e indução ao parto.	Perdas embrionárias pós-implantação.
Cassaro <i>et al.</i> , 2022	<i>Peumus boldus</i>	Boldo	Distúrbios gastrointestinais	Ectrodactilia e hepatomegalia.
Nguyen <i>et al.</i> , 2020	<i>Clerodendrum cyrtophyllum Turcz.</i>	Pasta de amendoim	Enxaquecas, hipertensão, febre alta, resfriados, dor de garganta, artrite reumática, enterite, sífilis, icterícia e febre tifoide.	Mortalidade embrionária, redução da taxa de eclosão, malformações como edema do saco vitelino, edema pericárdico, deformação da coluna, corpo mais curto.

Quadro 1. Plantas Medicinais com efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos.

Estudos relatam que uma vasta diversidade de plantas comumente utilizadas pela população brasileira, apresentam efeitos negativos ao desenvolvimento embrionário e fetal, destacando-se seu efeito abortivo, embriotóxico e teratogênico (Cassaro *et al.*, 2021). *Poincianella pyramidalis* é uma espécie típica da Caatinga, região semiárida do Brasil, rica em Propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Foi confirmada a presença de vários metabólitos nas folhas dessa espécie, como, flavonóides, biflavonóides, fenilpropanóides, lupeol, lignina, chalcona e triterpenos, que garantem seu potencial fitoterápico (Guimaraes *et al.*, 2018). Em contrapartida, a popular “catingueira” apresenta potencial nocivo durante o período gestacional, no qual já se observou a morte embrionária e aborto em caprinos.

Apesar de suas propriedades toxicológicas, a *Clerodendrum Cyrtophyllum Turczem*, planta pertencente à família Lamiaeeae, também é utilizada para fins medicinais em diversos países da Ásia como Japão, China, Vietnã, Índia, Tailândia, Coreia, no tratamento de enxaquecas, hipertensão, febre alta, resfriados, dor de garganta, artrite reumática, enterite, sífilis, icterícia, febre tifoide. (Kar *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013). A mesma, mostrou possuir segundo alguns estudos, propriedade terapêutica antioxidante e anti-inflamatória (Ngyuyen *et al.*, 2020), além de uma atuação anticancerígena evidenciada no estudo de Cheng *et al.*, (2001).

Ademais, em análise realizada com o Extrato etanólico das folhas de *Clerodendrum*, em diferentes concentrações, para investigação da toxicidade do desenvolvimento do mesmo em modelo de embrião de peixe-zebra, seis horas pós fertilização, demonstraram três componentes principais: Acteoside, cirsilineol e cirsilineol-4'-O- γ -D-glucopiranosídeo, que podem contribuir para o desenvolvimento desta toxicidade. A exposição ao EE durante 6-96 horas pós fertilização em doses de 80 a 200 μ g/ml aumentou a mortalidade embrionária e reduziu a taxa de eclosão; Malformações como edema do saco vitelíneo, edema pericárdico, deformação de coluna, caudas dobradas, corpo mais curto (comprimento) também foram observadas na exposição com concentrações de 20 e 40 μ g/ml até 72 – 120 horas pós fertilização. Assim, o Extrato Etanólico das folhas de *Clerodendrum* configura-se como teratogêno para embriões de peixe-zebra e não deve ser utilizado durante a gestação, uma vez que, os resultados evidenciam possível indução de defeitos ou mortalidade em embriões humanos. (Nguyen *et al.*, 2020).

Em um estudo adicional sobre a utilização de *Doliocarpus dentatus* durante o período gestacional, a espécie foi investigada para avaliar seu impacto no desempenho reprodutivo e realizar testes de teratogenicidade, empregando camundongos como modelo experimental. As taxas de malformações, externas, viscerais, e esqueléticas, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Entretanto, dentre as malformações externas observadas, destacaram-se a presença de membros torácicos anômalos, retroversão dos membros posteriores, cauda enrolada e escoliose. Adicionalmente, foram identificadas malformações viscerais, incluindo

hidrocefalia e hidronefrose, enquanto no que se refere às malformações esqueléticas, foram observadas redução na ossificação, ossificação irregular e, em alguns casos, agenesia de falanges e esterno (Ishikawa *et al.*, 2018).

A planta medicinal popularmente conhecida como “canela”, que tem seu nome científico *Cinnamomum verum*, trata-se de uma espécie vegetal bastante utilizada pela população tanto em meios alimentícios para o preparo dos alimentos, nas indústrias, no meio familiar, como também com finalidades terapêuticas (Duarte *et al.*, 2017). Assim também, como estudado por Gorril *et al.* (2016) onde diz que mesmo em meios a tantos benefícios que essa erva possui, ainda assim demonstra a contraindicação em mulheres gestantes. Como encontrado nos estudos de Goronki *et al.* (2021) em que seu efeito embriotóxico pode ser definido também de acordo com sua composição química, considerando que esse vegetal tem substâncias como ácido cinâmico, açúcares, aldeído, benzonato de benzil, cimeno, cineol, eugenol, felandreno, furool, linalol, metilacetona, entre outras substâncias que devem ser avaliadas quanto a toxicidade.

A maioria das plantas carece de estudos sérios que garantam a segurança da sua utilização durante o período gestacional, especialmente no primeiro trimestre. Além disso, nem todos os profissionais da saúde estão familiarizados com a aplicação desta alternativa terapêutica, principalmente no caso das gestantes. O uso de plantas medicinais durante a gestação está associado a fins terapêuticos, como acalmar e dores no estômago e seu uso não tem acompanhamento de um profissional, bem como as gestantes não tem conhecimento sobre os riscos oriundos do uso incorreto e indiscriminado de plantas medicinais durante a gestação (Nunes *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

O uso indiscriminado das plantas medicinais durante a gestação é de grande risco para a saúde do embrião/feto, expondo o mesmo ao risco de aborto, embriotoxicidade e teratogenicidade, então é importante promover ações de educação voltadas para os alertas a respeito dos impactos negativos do uso dessas espécies por gestantes, o que vai colaborar para a segurança do organismo ainda em desenvolvimento e também para a saúde materna.

REFERÊNCIAS

- BEBITOGLU, B. T. Frequently Used Herbal Teas During Pregnancy - Short Update. *Medeniyet Medical Journal*, v. 35, n. 1, p. 55-61, 2020.
- CABUT, S. et al. Intended and actual use of self-medication and alternative products during pregnancy by French women. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, v. 46, n. 2, p. 167-173, 2017.
- CARVALHO, R. B. F. et al. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. *Química Nova*, v. 36, n. 9, p. 1375-1379, 2013.
- CASSARO, L. F. et al. Avaliação da toxicidade da planta medicinal *Peumus boldus* durante o período gestacional de ratas Wistar. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 6, pág. 60325-60339, 2021.
- CHENG, H. H. et al. Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 7, p. 915-919, 2001.
- DUARTE, A. F. S. et al. O uso de plantas medicinais durante a gravidez e amamentação. *Visão Acadêmica*, v. 18, n. 4, 2017.
- GORONSKI, F. et al. Perdas fetais induzidas pelo uso do chá de canela em camundongos. In: *Congresso Internacional em Saúde*. 2021.
- GORRIL, L. E. et al. Risco das plantas medicinais na gestação: uma revisão dos dados de acesso livre em língua portuguesa. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 20, n. 1, 2016.
- GUIMARÃES, G. P. et al. Thermoanalytical characterization of herbal drugs from *Poincianella pyramidalis* in different particle sizes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 131, p. 661-670, 2017.
- HSIEH, C. L. et al. The teratogenicity and the action mechanism of gallic acid relating with brain and cervical muscles. *PloS One*, v. 10, n. 6, e0119516, 2015.
- ISHIKAWA, R. B. et al. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 217, p. 1-6, 2018.
- KAR, P. et al. Antioxidant and pharmaceutical potential of *Clerodendrum L.*: Na overview. *International Journal of Green Pharmacy*, v. 8, n. 4, p. 210-216, 2014.
- Lapa, A. J. et al. *Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais*. In: *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 247-262, 2007.
- LIMA, M. B. et al. Plantas medicinais utilizadas por gestantes em unidades básicas de saúde. *Revista UNIANDRADE*, v. 20, n. 2, p. 91-98, 2019.
- Maia, C. L. A. Benefícios E Malefícios Relacionados Ao Uso Empírico De Plantas Medicinais Por Gestantes: Uma Revisão Da Literatura. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2019.

Mcelhatton, P. R. Principles of Teratogenicity. Current Obstetrics and Gynaecology, v. 9, p. 163-169, 1999.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Revista Caatinga, v. 22, n. 4, p. 225-234, 2009.

NGUYEN, T. H. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Ethanol Extract of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz in Copper Sulfate-Induced Inflammation in Zebrafish. Antioxidants, v. 9, n. 3, p. 192, 2020.

NOGUEIRA, D. B. et al. Congenital Malformations in Sheep – Outbreak Caused by *Mimosa tenuiflora*. Acta Scientiae Veterinariae, v. 50, 2022.

NUNES, J. D. et al. Utilização de plantas medicinais durante a gestação. Revista Fitos, v. 16, n. 1, p. 39-53, 2022.

ROCHA, F. S. et al. Uso de fitoterápicos como alternativa para a diminuição da sintomatologia recorrente na gravidez. Research, Society and Development, v. 10, n. 3, p. e11610313065, 2021.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 13, n. 3, 2011.

SÁNCHEZ-YACTAYO, M.; VALLEJOS-GAMBOA, J.; ROJAS, J.H. Factores asociados al uso de plantas medicinales en las gestantes, 2019. Revista Peruana de Medicina Integrativa, v. 2, n. 5, p. 61-67, 2020.

SILVA, L.S. Utilização De Plantas Medicinais E Seus Riscos Na Gestação: orientações do enfermeiro quanto ao uso indiscriminado. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SILVA, M. S. C.; GUEDES, J. P. M. Segurança no uso de plantas medicinais e fitoterápicos durante a gestação. Research, Society and Development, v. 11, n. 7, p. e4611729431-e4611729431, 2022.

SILVA, R. R.; MORAIS, R. C. S. Malformações congênitas mediadas pelos efeitos adversos das substâncias teratogênicas químicas. Research, Society and Development, v. 11, n. 12, p. e148111234178-e148111234178, 2022.

SOUZA, M. F. et al. Abortos, malformações congênitas e falhas reprodutivas espontâneas em caprinos causados na intoxicação pelas folhas da catingueira, *Poincianella pyramidalis* (sin. *Caesalpinia pyramidalis*). Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 38, p. 1051-1057, 2018.

ZHOU, J. et al. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction and Radical-Scavenging Capacity of Phenols and Flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz Leaves. PloS One, v. 8, n. 7, pág. e68392, 2013.

WELSCH, F. *In vitro* approaches to the elucidation of mechanisms of chemical teratogenesis. Teratology, v. 46, p. 3-14, 1992.