

Estudo ex vivo para avaliação da atividade clareadora do Pycnogenol® após exposição à radiação ultravioleta, infravermelha e luz visível

Ex vivo study for evaluating the whitening activity of Pycnogenol® after exposure to ultraviolet and infrared radiations, and visible light

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201574736>

RESUMO

Introdução: A hiperpigmentação é condição dermatológica frequente, geralmente associada à exposição solar e com relativa dificuldade de tratamento. Pycnogenol® é extrato obtido do pinheiro francês *Pinus pinaster*, com conhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória, tendo demonstrado em estudos prévios capacidade de inibir a síntese de melanina.

Objetivo: Avaliar a atividade clareadora do Pycnogenol® em modelo experimental ex vivo após exposição à radiação ultravioleta A e B, infravermelha-A e luz visível.

Métodos: Fragmentos de pele humana obtidos de cirurgia plástica eletiva foram tratados com Pycnogenol® e posteriormente submetidos à radiação ultravioleta A e B, infravermelha-A e luz visível, para avaliação histológica da pigmentação melânica pela técnica Fontana-Masson.

Resultados: A avaliação histológica demonstrou aumento na deposição de melanina em todos os grupos irradiados. Entretanto, os fragmentos incubados previamente com Pycnogenol® demonstraram redução na deposição desse pigmento após a irradiação.

Conclusões: Este estudo demonstra a redução na deposição de melanina em cultura de pele tratada com Pycnogenol®, depois de submetida à radiação tanto ultravioleta A e B quanto infravermelha-A, bem como à luz visível, e conclui que essa substância pode apresentar propriedades clareadoras.

Palavras-chave: hiperpigmentação; clareadores; radiação solar

ABSTRACT

Introdução: Hyperpigmentation is a common dermatological condition, usually associated with exposure to the sun and relative difficulty of treatment. Pycnogenol® is an extract obtained from the French pine tree *Pinus pinaster*, with known antioxidant and anti-inflammatory activity, having been proven to inhibit melanin synthesis in previous studies.

Objective: To evaluate the whitening activity of Pycnogenol® in an ex vivo experimental model after exposure to ultraviolet A and B, infrared-A radiations and visible light.

Method: Human skin fragments obtained from elective plastic surgery were treated with Pycnogenol® and then irradiated with ultraviolet A and B, and infrared-A radiations, and visible light, having been sent for histological evaluation of melanin pigmentation by the Fontana-Masson staining technique.

Results: The histological evaluation demonstrated an increase in melanin deposition in all irradiated groups. However, fragments pre-incubated with Pycnogenol® showed a reduction in the deposition of this pigment after irradiation.

Conclusions: This study demonstrates the reduced melanin deposition in skin culture treated with Pycnogenol® after irradiation with ultraviolet A and B, and infrared-A radiations, and visible light, concluding that this substance may have lightening properties.

Keywords: hyperpigmentation; skin lightening preparations; solar radiation

Artigo Original

Autores:

Eloisa Leis Ayres¹
Adilson Costa²
Samara Eberlin³
Stefano Piatto Clerici⁴

¹ Coordenadora do Centro de Dermatologia Prof. René Garrido Neves - Niterói (RJ), Brasil.

² Pesquisador no Jack Arbisser's Laboratory, Departamento de Dermatologia da Emory University, Atlanta (GA), EUA.

³ Gerente técnica do Laboratório de Segurança e Eficácia Pré-Clinica no Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica - Campinas (SP), Brasil.

⁴ Pesquisador, Laboratório de Segurança e Eficácia Pré-Clinica no Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica - Campinas (SP), Brasil.

Correspondência para:

Eloisa Ayres
Rua Miguel de Frias, 77 / sala 1.004
24220-008 - Niterói - RJ
E-mail: eloisalayres@gmail.com

Data de recebimento: 13/11/2015
Data de aprovação: 11/12/2015

Trabalho realizado no Kolderma Instituto de Pesquisa Clínica Eireli EPP, Campinas (SP), Brasil

Suporte Financeiro: O laboratório Farmoquímica, RJ, Brasil concedeu gratuitamente as unidades do Pycnogenol necessárias ao desenvolvimento.

Conflito de Interesse: Nenhum.

INTRODUÇÃO

Em se tratando de cuidados com a pele, os sinais clínicos evidenciados pela exposição crônica à radiação solar, como a presença de rugas e hiperpigmentação, estão entre as principais preocupações estéticas que acometem o ser humano, a julgar pela quantidade de ativos e produtos cosméticos lançados no mercado com suposta ação na mitigação dessas manifestações.¹⁻⁶

A pigmentação cutânea depende tanto do número de melanócitos como da atividade das enzimas melanogênicas, que culmina na produção de melanina. A melanina desempenha papel importante na proteção da pele contra os efeitos danosos da radiação solar, porém o excesso desse pigmento pode tornar-se um problema estético.⁷

A exposição à luz solar, o bronzeamento artificial, o uso de medicamentos e outros agentes químicos, assim como processos inflamatórios crônicos e influências hormonais, podem aumentar a produção de mediadores tais como o hormônio estimulador de melanócito (α -MSH) e endotelina-1, que desencadeiam o processo de melanização da pele.⁷⁻⁹ Além da exposição à luz ultravioleta, estudos demonstram que a radiação infravermelha-A e a luz visível também promovem alterações na pigmentação da pele.¹⁰⁻¹²

A disponibilização de ativos e produtos com propriedades clareadoras ou despigmentantes mais efetivas e de baixo poder irritante constitui demanda constante no mercado cosmético. Nesse sentido, substâncias que favoreçam a homeostasia da pele e sejam capazes de retardar ou reverter sinais clínicos do fotoenvelhecimento cutâneo, constitui uma ferramenta de pesquisa e desenvolvimento na área cosmética e dermatológica.

O Pycnogenol® é extrato padronizado extraído da casca do pinheiro marítimo francês *Pinus pinaster*, rico em procianidinas, que vem demonstrando atividades antioxidantes e anti-inflamatórias.¹³ Diversas possíveis ações do Pycnogenol vêm sendo investigadas, entre elas a sua ação na redução da pigmentação e da melanogênese, além da ação antiedematosa e na vascularização.¹⁴

Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade clareadora do Pycnogenol® mediante a avaliação histológica da pigmentação melânica pela técnica Fontana-Masson em fragmentos de pele humana submetidos às radiações ultravioleta A e B (UVA/UVB), infravermelha-A (IVA) e luz visível (LV), bem como à associação de UVA/UVB, IVA e LV.

MÉTODOS

Fragmentos de pele humana provenientes de cirurgia eletiva foram incubados em meio de cultura e tratados com o Pycnogenol® (Flebon®, *Pinus pinaster*, FQM Farmoquímica S/A, RJ) nas concentrações de 0,0316; 0,0100 e 0,00316mg/ml, definidas após realização de teste de viabilidade celular para determinação das concentrações não citotóxicas para ensaio de eficácia. Após 48 horas de incubação, todos os fragmentos foram submetidos às radiações conforme descrição a seguir.

Para exposição dos fragmentos à radiação UVA/UVB (10J/cm² de UVA) foram utilizados os dispositivos: UVA/UVB Cube 400, SOL 500 H2 filter e UV Meter (Honle UV America Inc., MA, USA). Em relação à radiação IVA (360J/cm² de ra-

dição infravermelha-A) utilizaram-se os dispositivos Hydrosun 750 e HBM1 (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Germany). Para a radiação luz visível (480J/cm²) os dispositivos utilizados foram UVA/UVB Cube 400, SOL 500 H1 filter para filtrar a radiação UVA; filtro Cinegel Rosco 3114 para filtrar UVB e VLP-471RAD Sensor Radiométrico (Deta Ohm, Caselle di Selvazzano, Italy).

Os fragmentos foram mantidos por adicionais 48 horas e fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes seriados em micrótomo com cerca de 5µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H/E) associadas à técnica Fontana-Masson. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse) no aumento de 10x com auxílio do *software* Image-Pro.

A utilização de fragmentos de pele humana provenientes de cirurgias eletivas para realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade São Francisco (SP), Brasil.

RESULTADOS

Conforme podemos observar na **figura 1**, a avaliação histológica demonstrou que as culturas de fragmentos de pele humana expostas às radiações UVA/UVB, IVA, LV e associação das radiações apresentaram maior densidade da pigmentação melânica pela técnica Fontana-Masson em comparação ao grupo-controle (fragmentos mantidos em condição basal).

Por outro lado, todos os fragmentos tratados com o Pycnogenol® apresentaram reduções perceptíveis na densidade melânica em relação aos fragmentos apenas fotoexpostos.

Cabe ressaltar que os resultados observados nesse experimento *ex vivo* corroboram os ensaios *in vitro* obtidos em nosso laboratório utilizando cultura de melanócitos humanos (em andamento; dados não publicados) nos quais as radiações promovem, isoladamente, aumento na produção de melanina e na atividade da enzima tirosinase. Observação interessante obtida nos ensaios *in vitro* aponta que o aumento verificado na produção de melanina é significativamente maior nos grupos celulares submetidos à associação das radiações em relação aos grupos irradiados isoladamente.

DICUSSÃO

Diversos estudos vêm tentando relacionar o uso de antioxidantes com distúrbios da pigmentação cutânea e justificar sua utilização como possível alternativa terapêutica nesses casos.

Procianidinas têm demonstrado significativa atividade varredora de radicais livres, promovendo ação antiedematosa e anti-inflamatória em condições que cursam com fragilidade capilar. Seu uso tópico e oral, em estudos experimentais em ratos, demonstrou-se capaz de inibir o eritema induzido pela radiação UV e de aumentar a permeabilidade vascular. Extrato de semente de uva rico em proantocianidinas em pele de porco, ser capaz de suprimir a formação de melanina, bem como efeito clareador na hiperpigmentação induzida pela radiação UV. Posteriormente foi observado em mulheres japonesas que o extrato de semente

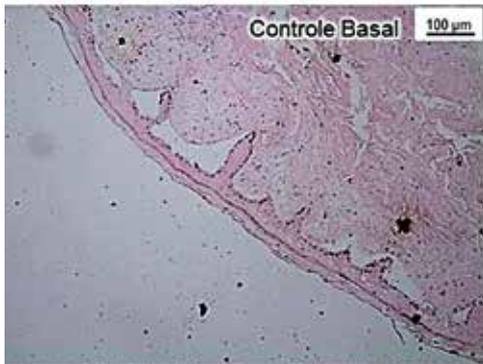
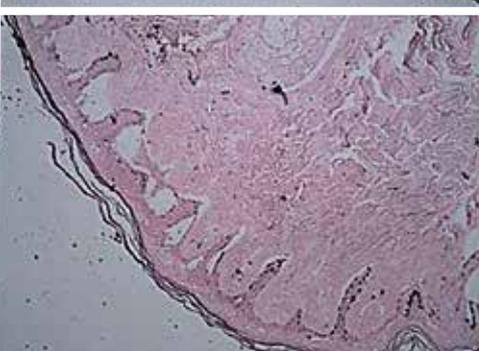
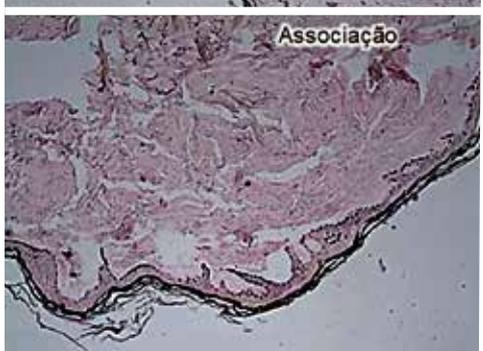
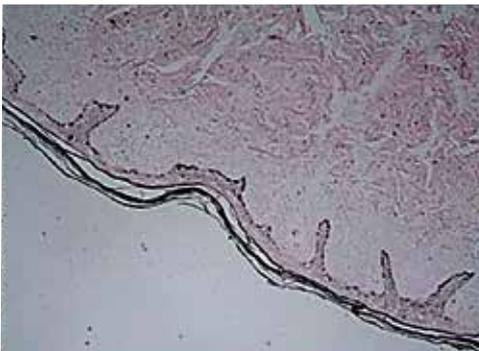
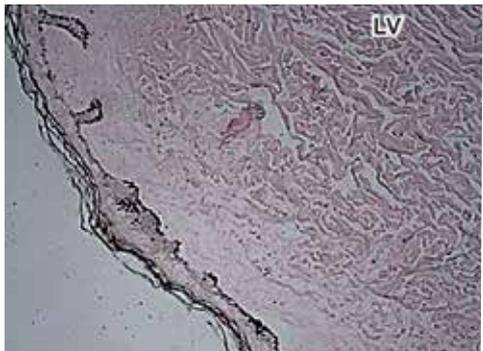
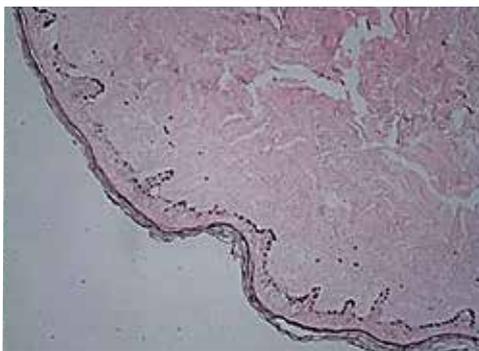
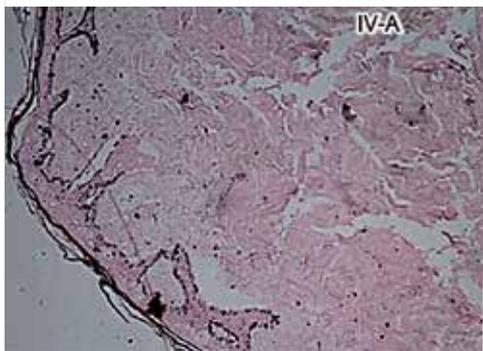
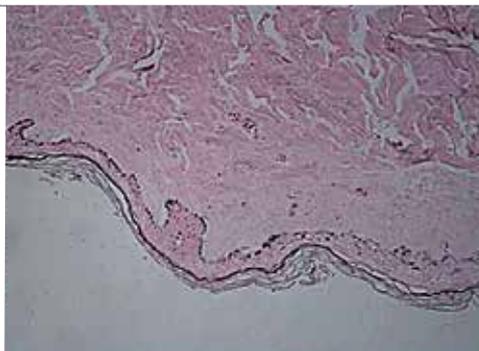
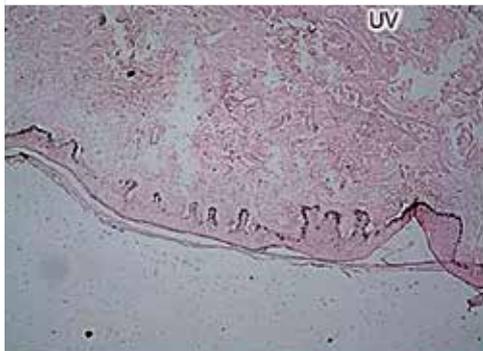


FIGURA 1:

Avaliação histológica da deposição de melanina em cultura de pele humana incubada com Pycnogenol® e submetida às radiações UVA/UVB, IVA, LV e associação (UVA/UVB, IVA, LV) e comparada com controle; barra de referência corresponde a 100µm



de uva poderia inibir a melanogênese ou mesmo a proliferação de melanócitos na pele da face com melasma.¹³

Handog e colaboradores demonstraram que a associação de procianidinas, vitamina A, C e E poderia ser efetiva como coadjuvante no tratamento clínico do melasma. Nesse estudo, o uso de Pycnogenol® 48mg/dia foi associado a 6mg de beta-caroteno, 60mg de ácido ascórbico e 15UI de D-alfa-tocoferol e comparado com a administração de placebo durante oito semanas. Os resultados avaliados por *mexameter* demonstraram que houve diminuição da pigmentação e também melhora significativa do escore Masi, levando à conclusão de que essa combinação é segura e efetiva no tratamento do melasma.¹⁵

Em 2002, o estudo de Ni e colaboradores investigou a eficácia do Pycnogenol® no tratamento do melasma. Foram administradas 25mg três vezes ao dia (75mg/dia) em 30 mulheres portadoras de melasma. Ao final de 30 dias houve diminuição na área do melasma, na intensidade da pigmentação, com índice de efetividade de 80% segundo os autores.¹⁴

O Pycnogenol® é extrato vegetal da casca do pinheiro marítimo francês *Pinus pinaster*, fonte de flavonoides. Tem despertado atenção devido a sua potente ação antioxidante, sendo demonstrada sua capacidade de modular a melanogênese, o eritema induzido pela radiação UV e a expressão do fator de transcrição nuclear kappa-B (NFkB).¹³ Estudos *in vitro* demonstraram que o Pycnogenol® é mais potente do que as vitaminas E e C, tendo capacidade de reciclar a vitamina C, regenerar a vitamina E e aumentar o sistema antioxidante endógeno.¹⁶

O aprimoramento das técnicas da sua extração permitiram a obtenção de extratos com maior atividade antioxidante, favorecendo a identificação cromatográfica dos principais componentes farmacológicos do Pycnogenol®, tais como ácido cafeico, ácido ferúlico, catequina e taxifolina.¹⁷

Estudos demonstraram que, além da ação antioxidante, o Pycnogenol® apresenta atividade anti-inflamatória, sendo também capaz de estimular a síntese de Enos (endothelial nitric oxid synthase).^{18,19}

A utilização desse ativo em distúrbios cardiovasculares também vem sendo relatada com resultados promissores.²⁰ Na pele, além dos estudos envolvendo a redução na produção de melanina, a inibição de metaloproteinases tipo 1, 2 e 9 (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) também tem sido observada, atribuindo-lhe um papel na melhora da hidratação e elasticidade cutâneas.²¹

No estudo de Kim e colaboradores foi possível demonstrar que o Pycnogenol® é capaz de suprimir espécies reativas de oxigênio (ROS) e possui forte atividade antitirosinase, levando à supressão da biossíntese da melanina, corroborando seu potencial antimelanogênico. Seu poder antioxidante foi avaliado por meio da supressão da atividade de peroxinitrilo, superóxido, óxido nítrico e radical hidroxila, ocorrendo também regulação positiva na proporção glutatona reduzida / glutatona oxidada nas células B16. Sua ação inibidora na atividade da tirosinase foi comparada a outros inibidores; o ácido kójico foi utilizado como inibidor de referência, e os resultados indicaram potência significativamente maior do Pycnogenol®. O tratamento com o produto promoveu redução do conteúdo de melanina nas células B16 de maneira concentração-dependente, variando de 22,2% (50mg/ml) a 58,9% (5mg/ml), em comparação com o grupo-controle tratado com a-MSH, demonstrando sua ação no controle da síntese da melanina.^{22,23}

No presente estudo foi possível demonstrar em fragmentos de pele humana incubadas com Pycnogenol® que a deposição de pigmento melânico ocorreu em menor intensidade após submissão à radiação UVA/UVB, IVA, LV e associação, em comparação com os fragmentos não tratados, corroborando os dados da literatura, que demonstram sua atividade antimelanogênica. Entretanto, o tratamento dos distúrbios pigmentares permanece foco de novos e promissores estudos. Extratos vegetais ricos em flavonoides têm sido investigados em função de sua capacidade de modulação da pigmentação cutânea, sendo o Pycnogenol® substância que vem ganhando destaque.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que tanto a radiação ultravioleta A e B quanto a infravermelha-A e luz visível, bem como a associação de todas essas radiações, são capazes de aumentar a densidade de pigmentação melânica. E também que as culturas que foram previamente tratadas com Pycnogenol® apresentaram diminuição visível na deposição de melanina, permitindo concluir que essa substância pode apresentar propriedades clareadoras.

Os recentes estudos têm demonstrado que o Pycnogenol®, por sua ação antimelanogênica, pode ser considerado uma opção na terapia de distúrbios como o melasma e de grande importância na manutenção e no controle das recidivas, embora mais estudos se façam necessários. ●

REFERÊNCIAS

1. Thomas JR, Dixon TK, Bhattacharyya T. Effects of topicals on the aging skin process. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2013;21(1):55-60.
2. Ertel K, Wyborski R, Zheng Q. Futuro dos cosmeceuticos. In: Costa A. *Tratado Internacional de Cosmeceuticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p.680-91.
3. Tsatsou F, Trakatelli M, Patsatsi A, Kalokasidis K, Sotiriadis D. Extrinsic aging UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermato-Endocrinol* 2012; 4(3):285-97.
4. Gkogkolou P, Böhm M. Advanced glycation end products key player in skin aging? *Dermato-Endocrinol* 2012; 4(3):259-70.
5. Shiba J, Bastos DHM. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Rev Nutr* 2011; 24(6):895-904.
6. Glaser DA. Anti-aging products and cosmeceuticals. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2003; 11(2):219-27.
7. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*. 2006; 19(6): 550-71.
8. Bologna JL, Orlow SJ. 2003. Pigmentary disorders. In: Bologna JL, Jorizzo J, Rapini R, editors. *Dermatology*. Philadelphia: Mosby; 43-52.
9. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2004; 84(4): 1155-228.
10. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12(1):54-64.
11. Ju Hee Lee, Mi Ryung Roh, and Kwang Hoon Lee. Effects of Infrared Radiation on Skin Photo-Aging and Pigmentation. *Yonsei Medical J*. 2006; 47(4):485- 90.
12. Kollias N, Baqer A. An experimental study of the changes in pigmentation in human skin in vivo with visible and near infrared light. *Photochem Photobiol*. 1984; 39(5):651-9.
13. D'Andrea G. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 2010;81(7):724-36.
14. Ni Z, Mu Y, Gulati O. Treatment of melasma with pycnogenol. *Phytother Res*. 2002; 16(6): 567-71.
15. Handog EB, Galang DAVF, Leon-Godinez MA, Chan GP. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral procyanidin with vitamins A, C, E for melasma among Filipino women. *Int J Dermatol*. 2009, 48(8): 896-901.
16. Maimoonaa A, Naeema I, Saddiqea Z, Jameelb K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharm*. 2011;133(2):261-77.
17. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol®), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002;40(4):158-68.
18. Blazso G, Gabor M, Rohdewald P. Antiinflammatory activities and superoxide radical scavenging activities of a procyanidin containing extract from the bark of *Pinus pinaster* Sol and its fractions. *Pharm Pharmacol Lett*. 1994; 3:217-20.
19. Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S, Umemura T, Jitsuiki D, Soga J, et al. French maritime pine bark extract. Augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertension Research*. 2007; 30(9): 775-80.
20. Gulati OP. The nutraceutical pycnogenol: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biomedical Reviews*. 2005;16:49-57.
21. Marinia A, Grether-Becka S, Jaenickea T, Webera M, Burkib C, Formanna P, et al. Pycnogenol® Effects on Skin Elasticity and Hydration Coincide with Increased Gene Expressions of Collagen Type I and Hyaluronic Acid Synthase in Women. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012;25(2):86-92.
22. Kim YJ, Kang KS, Yokozawa T. The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(7):2466-2471.
23. Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem*. 2002; 277(18):16340-4.