

Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* de um produto de administração oral contendo peptídeos de colágeno, delphinol[®] vitamina C e *hibiscus*

In vitro evaluation of the anti-inflammatory activity of an oral administration product containing collagen peptides, Delphinol[®], vitamin c and hibiscus

DOI: <http://www.dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201810311004>

RESUMO

Introdução: O termo *inflammaging* refere-se ao aumento da resposta inflamatória devida ao envelhecimento, resultando em estado pró-inflamatório sistêmico crônico em baixo grau. Ocorrem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral. Assim, o uso de ativos que atuam na modulação da resposta inflamatória auxilia na redução do estresse oxidativo celular e também reduz ou evita os danos celulares e moleculares irreversíveis não clinicamente detectáveis.

Objetivo: Avaliar a ação de um composto contendo peptídeos de colágeno, delphinol[®], vitamina C e *hibiscus* na modulação da resposta inflamatória cutânea.

Material e Métodos: Foi avaliada a liberação das citocinas inflamatórias após tratamento com o produto, em queratinócitos expostos a um lipopolissacarídeo indutor de resposta inflamatória.

Resultados: Quando os queratinócitos foram expostos ao composto em estudo, observaram-se aumento na liberação de interleucina 6 e tendência de redução nos níveis de interleucina 1-alfa e de interleucina-8. Além disso, ficou reduzida em 67,5% (P=0,008) a liberação de fator de necrose tumoral-alfa basal.

Conclusões: O composto estudado tem efeito potencial sobre o processo de *inflammaging* e, consequentemente, sobre o envelhecimento, por meio da modulação das citocinas inflamatórias interleucina-1 alfa, interleucina-6, interleucina-8 e fator de necrose tumoral-alfa.

Palavras-Chave: Ácido ascórbico; Antioxidantes; Anti-Inflamatórios; Colágeno; Envelhecimento; Envelhecimento da pele; Hibiscus; Mediadores da inflamação; Pele; Suplementos nutricionais

ABSTRACT

Introduction: The term *inflammaging* refers to the increase of the inflammatory response due to aging, resulting in a low level chronic pro-inflammatory state. High levels of proinflammatory cytokines such as interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor occur. Thus, the use of active principles that modulate the inflammatory response assists in the reduction of cellular oxidative stress, also reducing or avoiding irreversible cellular and non-clinically detectable molecular damage.

Objective: To evaluate the action of a compound containing collagen peptides, Delphinol[®], vitamin C and hibiscus on the modulation of the cutaneous inflammatory response.

Materials and methods: The release of inflammatory cytokines after treatment with the product was evaluated in keratinocytes exposed to an inflammatory response-inducing lipopolysaccharide.

Results: When keratinocytes were exposed to the studied compound, it was possible to observe an increase in the release of interleukin 6 and a reduction tendency in the levels of interleukin 1-alpha and interleukin-8. In addition, the release of basal tumor necrosis factor-alpha was reduced by 67.5% (P = 0.008).

Conclusions: The compound studied has a potential effect on *inflammaging* – and consequently on aging – by modulating the inflammatory cytokines interleukin-1 alpha, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha.

Keywords: Aging; Anti-Inflammatory agents; Antioxidants; Ascorbic acid; Collagen; Dietary Supplements; Hibiscus; Inflammation mediators; Skin; Skin aging

Artigo Original

Autores:

Samanta Nunes¹
Andrea Costa Fruet²
Rodrigo Vieira Rodrigues²
Juliana Cotta Vieira³

¹ Corium Dermatologia - São Paulo (SP), Brasil

² Invitrocell - Paulínia (SP), Brasil

³ Farmoquímica - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Correspondência para:

Andrea Costa Fruet.
Av. Prof. Benedito Montenegro, 240
Paulínia - SP, Brasil
13140-000.
E-mail: andrea.fruet@invitrocell.com.br

Data de submissão: 29/04/2017

Data de aprovação: 02/09/2018

Trabalho realizado na Invitrocell – Invitrocell Avaliação Molecular e Celular Ltda. - Paulínia (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: Laboratório Farmoquímica, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Conflito de Interesses: Os autores afirmam não possuir interesses pessoais, comerciais, políticos ou financeiros neste manuscrito.



INTRODUÇÃO E OBJETIVO

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico, pela ativação de proteínquinases ativadas por mitógenos. As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias), como interleucina-1b (IL-1b), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. TNF α é citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico.¹ O envelhecimento é processo biológico complexo e dinâmico caracterizado pela remodelação contínua com reparo do DNA, apoptose, resposta imune, estresse oxidativo e inflamação. Uma das teorias mais recentes sobre o envelhecimento está centrada na resposta imunológica e leva em consideração a ativação de inflamação subclínica e crônica de baixo grau denominada *inflammaging*.² Tal resposta inflamatória crônica pode acumular-se com o tempo e gradualmente provocar danos nos tecidos. É considerada uma das razões principais de muitas doenças relacionadas com a idade, como diabetes, aterosclerose, degeneração macular e envelhecimento da pele.³ Existem ainda evidências crescentes de que a inflamação desempenha papel importante na doença cardiovascular, podendo ser considerada consequência tardia da programação evolutiva para uma resposta pró-inflamatória.⁴⁻⁶ O envelhecimento é conduzido pelas citocinas pró-inflamatórias e substâncias produzidas pelo sistema imunológico inato. O sistema de macrófagos e o sistema complemento, dois componentes importantes do sistema imune inato, têm atraído cada vez mais atenção, uma vez que parecem estar envolvidos na patogênese de várias doenças associadas com a inflamação. Estudos revelam que a imunidade inata é importante nesse processo, no qual os fagócitos mononucleares, tais como os macrófagos, desempenham papel fundamental em várias doenças relacionadas à idade. Diversos estudos globais de perfil de expressão genética relacionaram todos os genes do sistema imunológico e da inflamação com o fotoenvelhecimento, independentemente do tipo étnico. O fotoenvelhecimento induzido por UV pode ser visto como envelhecimento prematuro da pele. A radiação UV induz uma série de eventos que podem levar à inflamação, induzindo: a) os queratinócitos epidérmicos a liberar citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-6 e TNF- α ; b) os mastócitos a gerar prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, como histamina e leucotrienos; c) a morte celular cutânea; e d) a peroxidação da membrana lipídica. No processo de *inflammaging* ocorre aumento das reações inflamatórias em decorrência da idade, caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias: IL-1, IL-6 e TNF- α .⁷ A exposição à radiação UV aguda resulta na infiltração dos neutrófilos na epiderme e na derme para depuração de células apoptóticas induzidas por UV e para eliminação de células cutâneas. Sugere-se ainda que algumas enzimas, tais como metaloproteinases de matriz (MMP-1 e MMP-9), contribuam para o processo de fotoenvelhecimento.

É provável que os monócitos e macrófagos realmente desempenhem um papel mais importante nesse processo, porque atacam os infiltrados após algumas horas para limpar as células apoptóticas e os lipídeos oxidados.³ A proteína C-reativa (PCR), de fase aguda, produzida pelo fígado em resposta à IL-6, também é marcador útil de inflamação, mais comumente utilizado na prática clínica. Acredita-se que a inflamação seja consequência da exposição cumulativa durante a vida à carga antigênica causada por infecções clínicas e subclínicas, bem como pela exposição a antígenos não infecciosos. A consequente resposta inflamatória, lesão tecidual e produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos oxidativos também desencadeiam a liberação de citocinas adicionais, principalmente a partir de células do sistema imune inato, mas também da resposta imune adquirida. Isso resulta em ciclo vicioso, impulsionando o sistema imunológico, remodelando e favorecendo um estado pró-inflamatório crônico, em que alterações fisiopatológicas, lesão tecidual e cura ocorrem simultaneamente. Os danos celulares e moleculares irreversíveis que não são clinicamente evidentes acumulam-se de modo lento ao longo de décadas. A população de células T CD8⁺ é alterada em maior extensão do que a população de CD4⁺. Com a idade, aumento no número de células específicas do antígeno é associado a aumento no número de células senescentes terminalmente diferenciadas, que ocupam grande proporção de espaço imunológico. Essas células, particularmente CD8⁺, são potentes produtores de citocinas inflamatórias e têm sido fortemente associadas com imunidade antiviral reduzida e patologias inflamatórias relacionadas. Essas células específicas produzem mais IL-6 e TNF- α do que seus homólogos mais jovens.^{3,7}

Este estudo avaliou a atividade anti-inflamatória *in vitro* da substância teste (complexo nutracêutico, para administração por via oral, contendo peptídeos de colágeno, vitamina C, *Hibiscus sabdariffa* e *Delphinol*[®] – Exímia Fimalize Age Complex[®] Farmoquímica, Rio de Janeiro, Brasil) mediante a modulação da liberação de citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-6, IL-8 e TNF- α por queratinócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo *in vitro*, comparativo com grupo-controle

Teste de viabilidade celular

Foi realizado teste de viabilidade celular, que determina a maior dose não tóxica a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para tanto, fibroblastos murinos 3T3 Balb/C foram mantidos em cultura e expostos a várias concentrações da substância teste. As culturas foram visualmente examinadas após 24 horas, e o número de células viáveis e/ou o total do conteúdo celular foi determinado pela captação do vermelho neutro (OD 540nm). O número de células na presença da amostra teste foi comparado com aquele observado no controle. A análise do IC50 foi realizada com o software *SigmaPlot 9.01* (2004), utilizando equação de curva logística de quatro parâmetros (Curva de Hill). A partir dos dados gerados por essa curva é possível determinar as concentrações não citotóxicas da substância teste.

Teste Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Tratamento das amostras

Células NHK foram semeadas em placas de 24 poços na confluência de 28.500 células por poço. Após 24 horas em incubadora de CO₂, as células foram tratadas com as concentrações testes da substância teste em presença de extrato de *Escherichia coli* (LPS, contendo 5µg/ml de proteína equivalente) em meio de cultura Epilife *Low calcium*. O sobrenadante celular foi recolhido após 24 horas de exposição aos tratamentos com a substância teste + LPS e estocadas em freezer a -30°C. A quantidade de IL-1α, IL-6, IL-8 e TNF-α em sobrenadante de cultura de queratinócitos humanos primários foi avaliada por Elisa, segundo as especificações do fabricante (*IL-1α humano: Thermo Scientific - Cód.: EH2IL1A; IL-6 humano: Sigma-Aldrich - Cód. RAB0306; IL-8/CXCL8 humano: Sigma-Aldrich - Cód. RAB0319; TNF-α humano: Sigma-Aldrich - Cód. RAB0476*). Resumidamente, anticorpos específicos fixados em placa de 96 poços e os sobrenadantes, incluindo os padrões de proteína recombinante com concentrações conhecidas de IL-1α, foram aplicadas nos poços. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário biotilado. Durante a primeira incubação, o antígeno humano liga-se ao anticorpo imobilizado na placa, enquanto o anticorpo biotilado liga-se a um segundo sítio. Após a remoção do excesso do anticorpo secundário, a enzima estreptavidina-peroxidase (*HRP-Linked Antibody*) é adicionada. Depois da lavagem para remover o excesso de enzima livre, uma solução de substrato é adicionada (TMB), a qual se liga à enzima para produzir coloração azul. Após a adição de H₂SO₄ a coloração é convertida de azul para amarelo, e a leitura é feita no comprimento de onda a 450nm por um espectrofotômetro. A intensidade desse produto colorido é diretamente proporcional à concentração das citocinas inflamatórias IL-1α, IL-6, IL-8/CXCL8 e TNF-α humano presente no sobrenadante. Primeiramente, foi calculada a curva-padrão em um gráfico de absorbância em função da quantidade de citocina inflamatória secretada. Os valores de absorbância obtidos para os ensaios das amostras são plotados na equação de primeiro grau obtida a partir da curva-padrão para a determinação da concentração de cada citocina presente na amostra. Os ajustes de equação e determinação de parâmetros foram realizados utilizando o programa *Microsoft Excel*.

Análise estatística

Os ensaios foram expressos em média ± desvio padrão e a análise estatística foi realizada por teste *t de Student* obtidos com o auxílio do programa *Microsoft Excel*.

RESULTADOS

Teste de viabilidade celular

A substância teste foi preparada na concentração inicial de 200.000µg/ml, e as demais concentrações foram preparadas por diluições seriadas em fator de 1:10. Conforme apresentado no gráfico 1, as concentrações escolhidas para os ensaios subsequentes foram 1.000 e 100µg/ml. Nesse ensaio a substância de referência SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) foi utilizada a fim de

garantir a efetividade tóxica da substância teste sobre a linhagem celular (Gráfico 2).

Liberação de citocinas inflamatórias por NHK

Quando os queratinócitos foram expostos ao LPS apresentaram aumento na liberação das citocinas IL-1α (2,8 vezes; $p = 0,002$), IL-6 (25,4 vezes; $p = 0,001$) e IL-8/CXCL8 (7,3 vezes; $p = 0,0001$), porém o LPS não induziu aumento significativo de TNF-α ($p = 0,412$).

A substância teste não apresentou redução significativa na liberação de IL-1α e IL-8 nas concentrações testadas, mas houve tendência de redução nos níveis de IL-1α e de IL-8 (Tabela 1). Por outro lado, foi observado aumento na liberação de IL-6 (105%) nas amostras tratadas com 1.000µg/ml da substância teste quando comparado ao controle LPS (Tabela 1; Gráfico 3). A liberação de TNF-α por queratinócitos está relacionada diretamente com a morte celular, e, como a concentração de LPS utilizada não induz morte, também não foi observado aumento de TNF-α. Contudo, a substância teste reduziu em 67,5% ($p = 0,008$) a liberação de TNF-α basal na maior concentra-

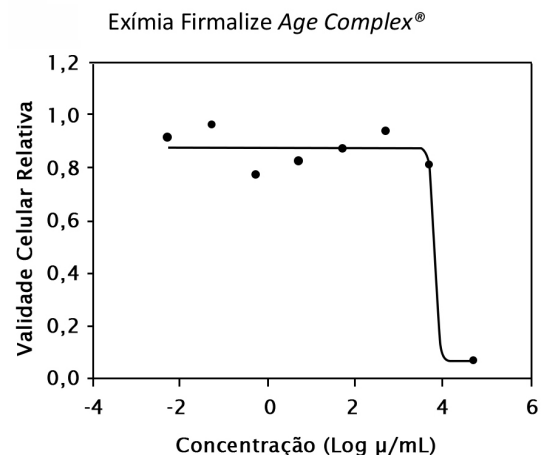


GRÁFICO 1: Curva concentração-resposta da SBT da substância teste

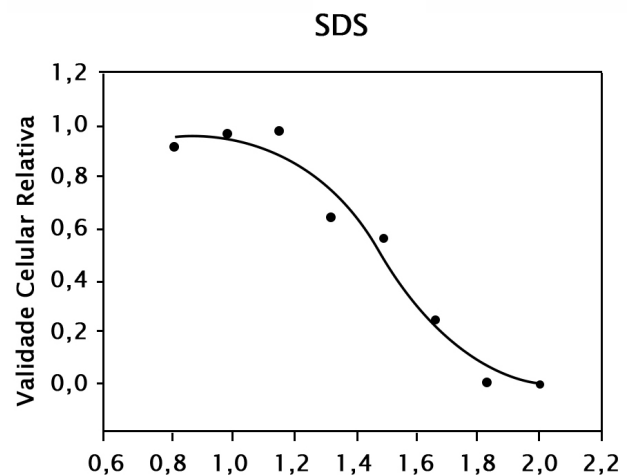


GRÁFICO 2: Curva concentração-resposta do controle positivo SDS

ção testada (1000µg/ml) quando comparado ao controle LPS (Tabela 1; Figura 3).

DISCUSSÃO

O envelhecimento está associado a níveis elevados de citocinas circulantes e marcadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-1 e TNF-α. Os metabolismos ósseo, nutricional e muscular são afetados pelo estado inflamatório que acompanha o envelhecimento, com suas alterações imunes, hormonais e adiposas, levando a um estado inflamatório crônico, no qual os níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF-α e IL-6, apresentam efeitos nocivos para a pele. Esse fenômeno, conhecido

como imunossenescência, é acompanhado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução de citocinas anti-inflamatórias, levando a inflamação crônica de baixo grau conhecida como *inflammaging*.⁷⁻¹⁰ No processo de *inflammaging* ocorre aumento das reações inflamatórias em decorrência da idade, caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-α.⁷ Como as interleucinas e as metaloproteínas estão relacionadas à inflamação e à resposta ao estresse oxidativo, seus genes são candidatos apropriados para o envelhecimento e doenças relacionadas com a idade e as infecções. A inflamação e a produção desregulada de citocinas inflamatórias têm papel importante nesse processo, que é caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas e TNF-α, que têm demonstrado aumentar com a idade e estar envolvidos na patogênese da maioria das doenças associadas.^{5,7,11} IL-6 é marcador de inflamação confiável, cujo nível circulante é aumentado com o tempo. O gene IL-6 é altamente polimórfico e expresso em linfócitos, fibroblastos e macrófagos em resposta a diferentes tipos de estímulos de inflamação. Além disso, IL-6 também controla a indução e expressão de metaloproteínas que mantêm a homeostase de zinco e cobre. Durante o estresse e a inflamação, a expressão gênica de metaloproteínas é induzida por citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6, que podem ser deletérias no pro-

TABELA 1: Análise estatística (t de Student) e porcentagem de variação entre as médias do controle LPS e tratamentos com a substância teste

Marcadores	1000µg/ml		100µg/ml	
	p valor	variação	p valor	variação
IL-1α	0,144	-18,80%	0,08	-27,60%
IL6	0,0004	105%	0,662	-5,30%
IL8	0,491	-5,50%	0,077	-9,70%
TNF-α	0,008	-67,50%	0,085	-29,80%

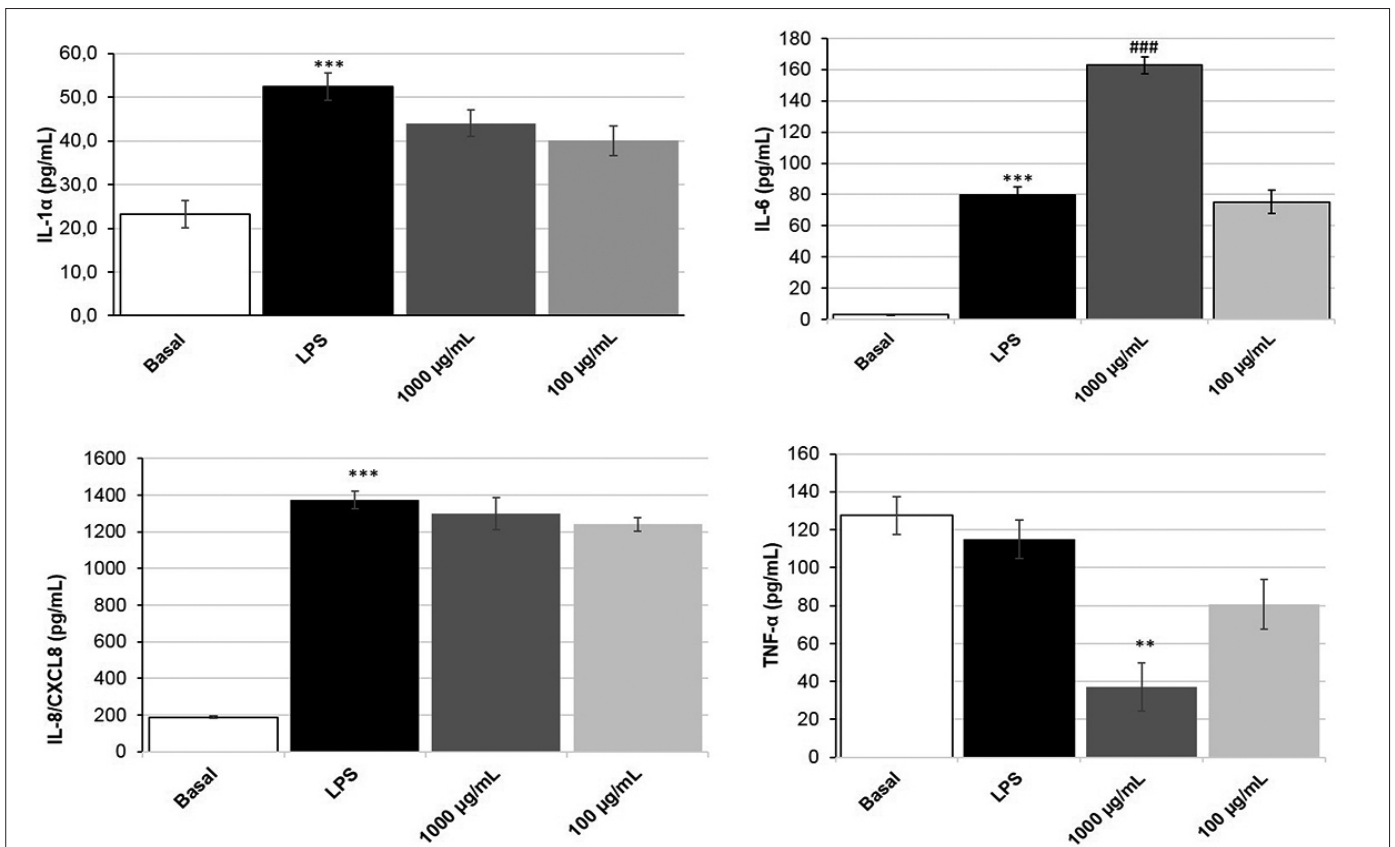


GRÁFICO 3: Liberação de citocinas expostas à substância teste. Liberação de IL-1 alfa (A), IL-6 (B), IL-8/CXCL8 (C) e TNF-alfa (D) por queratinócitos humanos primários expostos a LPS e tratados com a substância teste. O gráfico representa os valores de média ± EPM (erro-padrão da média) obtidos referentes à liberação das citocinas inflamatórias, em pg/ml. Os valores diferem do Basal em *** para p < 0,001 e em ** para p < 0,01 e do LPS em ### para p < 0,001, a partir do teste estatístico t de Student

cesso de envelhecimento.¹¹⁻¹³ O sistema de resposta inflamatória não só oferece proteção contra a exposição a agentes inflamatórios e infecciosos, como também contribui na redução dos danos nos tecidos, melhorando a longevidade, que é caracterizada por equilíbrio entre agentes pró e anti-inflamatórios.^{2,5,7}

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* confirmam a atividade antioxidante da vitamina C e do *Hibiscus*. O extrato de hibisco apresenta potente efeito antioxidante, eliminando o oxigênio reativo e a atividade de radicais livres. Apresenta ainda ação protetora contra o dano oxidativo induzido por hidroperóxido de terci-butila (t-BHP), protege a célula da peroxidação lipídica e promove inibição da oxidação mediada por $\text{Cu}^2 + \text{LDL}$, além da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR), inibição da formação de conteúdo de malondialdeído (100-300mg/kg), redução da depleção de glutatona e diminuição da atividade sanguínea de superóxido dismutase e catalase.¹⁴ A vitamina C apresenta conhecida ação antioxidante, além de exercer função fotoprotetora, sendo capaz de diminuir o eritema desencadeado pela irradiação UVB.¹⁵ Delphinol® também possui capacidade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo intracelular. Além disso, elimina os estímulos pró-inflamatórios, aumenta a autofagia regulada pela sirtuína-1 e restaura a atividade do óxido nítrico sintase, com consequências sobre a vasodilatação, melhorando a microcirculação, normalizando a atividade plaquetária e contribuindo na atividade anti-inflamatória.¹⁶ Essa substância inibe a peroxidação lipídica, mediada por UVB, os

danos oxidativos e ao DNA, protegendo assim a apoptose celular.¹⁷ Tal como acontece com todos os organismos complexos, sistemas biológicos únicos raramente trabalham isoladamente. Células neuronais dentro do eixo HPA contêm múltiplos receptores de citocinas, particularmente IL-1, IL-6 e TNF- α . Reduzir seus níveis circulantes controla o processo de inflamação.⁷ A suplementação oral com peptídeos de colágeno promove melhora das propriedades da pele. O colágeno aumenta a densidade de fibroblastos, regenera a matriz extracelular e estimula a síntese de ácido hialurônico, melhorando a hidratação e a flacidez da pele.^{18,19}

Com base nos resultados apresentados e considerando a composição da substância teste, podemos afirmar que o produto auxilia na redução do *inflammaging* e apresenta ação antioxidante, reduzindo a inflamação e retardando os mecanismos de envelhecimento da pele.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e metodologia utilizadas, a substância teste reduziu a liberação de TNF- α frente a um agente estressor, apresentou tendência na redução sobre a liberação de IL-1- α e IL-8 e promoveu aumento da liberação de IL-6. Em virtude dos efeitos observados *in vitro* sobre a modulação de citocinas pró e anti-inflamatória, podemos concluir que a substância teste tem potencial efeito sobre o processo de *inflammaging*, e, conseqüentemente, sobre o envelhecimento. ●

REFERÊNCIAS

- Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM et al. Citocinas e dor. Rev Bras Anestesiologia. 2011;61(2):255-265.
- Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crussitti A, Malttse G. Inflammaging and Anti- Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2016;64(2):111-26.
- Fishman D, Faulds G, Jefery R, Mohamed-al V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998;102(7):1369-76.
- Van Den Biggelaar AH, Craen AJ, Gussekloo J, Huizinga TW, Heijmans BT, Frölich M, et al. Inflammation underlying cardiovascular mortality is a late consequence of evolutionary programming. FASEB J. 2004;18(9):1022-4.
- Cederholm T, Persson M, Andersson P, Stenvinkel P, Nordfors L, Madden J, et al. Polymorphisms in cytokine genes influence long-term survival differently in elderly male and female patients. J Intern Med. 2007;262(2):215-23.
- Varadhan R, Yao W, Matteini A, Beamer BA, Xue QL, Yang H, et al. Simple biologically informed inflammatory index of two serum cytokines predict 10 year all-cause mortality in older adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014;69(2):165-73.
- Baylis D, Bartlett DB, Patel HP, Roberts HC. Understanding how we age: insights into inflammaging. Longev Healthspan. 2013;2(1):8.
- Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. J Am Med Dir Assoc. 2013;14(12):877-82.
- Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014 J;69(Supl 1):S4-9.
- Zhuang Y, Lyga J. Inflammaging in skin and other tissues -the roles of complement system and macrophage. Inflamm Allergy Drug Targets. 2014;13(3):153-61.

11. Kayaalti Z, Sahiner L, Durako Iugil ME, et al. Distributions of interleukin-6 (IL-6) promoter and metallothionein 2A (MT2A) core promoter region gene polymorphisms and their associations with aging in Turkish population. *Arch Gerontol Geriatr.* 2011;53(3):354-8.
12. Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61(6):575-84.
13. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18138-44.
14. Rocha IC, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry.* 2014;165:424-43.
15. Azulay MM, Lacerda CAM, Perez MA, Filgueira AL, Cuzzi T. Vitamina C. *An Bras Dermatol.* 2003;78(3):265-74.
16. Watson RR, Schonlau F. Nutraceutical and antioxidant effects of a delphinidin-rich maqui berry extract Delphinol®: a review. *Minerva Cardioangiol.* 2015;63(2):1-12.
17. Afaq F, Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, et al. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2007;127(1):222-32.
18. Zague V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(9):479-83.
19. Addor FAS. Influence of a nutritional supplement containing collagen peptides on the properties of the dermis. *Surg Cosmet Dermatol.* 2015;7(2):116-21.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Samanta Nunes |  ORCID 0000-0001-5846-3372

Investigadora principal do estudo, autora principal do texto.

Andrea Costa Fruet |  ORCID 0000-0002-2680-6665

Co-investigadora do estudo, contribuiu com a tabulação de dados e análise estatística.

Rodrigo Vieira Rodrigues |  ORCID 0000-0002-7090-975X

Co-investigador do estudo, contribuiu com a tabulação de dados e análise estatística.

Juliana Cotta Vieira |  ORCID 0000-0002-6103-690X

Co-investigadora do estudo, contribuiu com a revisão do artigo.