

Iselight

Descrição

Ativo para clareamento de manchas senis que atua promovendo a homeostase do sistema de detoxificação celular, por meio do estímulo da autofagia e atividade de proteassoma, capazes de eliminar as toxinas e componente biológicos celulares disfuncionais. **Iselight** é um extrato vegetal composto por *Myrothamnus flabellifolia*, planta da ressurreição conhecida pela medicina tradicional africana, e *Coffea arabica*, importante fonte de antioxidantes.

INCI

Propanediol (and) Coffea Arabica (Coffee) Seed Extract (and) Myrothamnus Flabellifolia Leaf Extract (and) Water.

Introdução

A face e as mãos são as regiões do corpo que evidenciam as primeiras marcas do envelhecimento^{1,2}. Essas alterações se manifestam no aumento de rugas e flacidez, ressecamento da pele, bem como no surgimento de manchas senis, sardas e descoloração de algumas regiões da pele^{3,4}.

Manchas senis (**Figura 1**), também conhecidas como lentigos solares e lentigos senis, são lesões pigmentadas de coloração marrom clara a preta de diferentes tamanhos – variam de milímetro a pequenos centímetros – que tipicamente desenvolvem-se em pele cronologicamente exposta ao sol⁵.



Figura 1: Manchas senis na face nas costas das mãos.

Entre os processos mais estudados para o surgimento de manchas na pele, a formação dos pigmentos de melanina e lipofuscina são os mais consolidados. Entretanto, a presença da melanina no tecido cutâneo não ocorre em função do aumento da idade, podendo nesses casos aumentar ou diminuir com o amadurecimento da pele, ao passo que o aumento da idade é um fator determinante para o aparecimento de lipofuscina nas regiões da epiderme e derme⁶. Desta forma, é possível dizer que manchas senis não são exatamente resultado de acúmulo de melanina,

mas sim da presença de lipofuscina, excesso de proteínas oxidadas ou danificadas, lipídeos e outros resíduos celulares nos lisossomos, organela celular responsável pela digestão de substâncias orgânicas⁷.

Lipofuscina, do grego “lipo” = gordura e do latim “fuscus” = escuro, é um pigmento marrom-amarelado encontrado em diversas células do corpo, como queratinócitos, fibroblastos, neurônios, miócitos e hepatócitos. Sua abundância e disponibilidade são maiores em indivíduos idosos do que em jovens, o que conota a esse componente o termo popular de “pigmento do envelhecimento”, fator este que implica na sua adoção como biomarcador para a determinação da idade absoluta⁸.

A lipofuscina é a resposta ao envelhecimento celular, resultado do acúmulo de “lixo” no citosol devido à falha no catabolismo (ou “reciclagem”) de proteínas e organelas intracelulares⁹. Uma vez que os processos oxidativos são obrigatórios para a vida, eles também atuam como intensificadores da concentração de lipofuscina, bem como de muitas outras manifestações da senescência¹⁰.

Muitas funções fisiológicas são dependentes da degradação e reciclagem de macromoléculas danificadas no interior da célula e o processo que promove o abastecimento de componentes necessários para a reposição de energia celular é conhecido como autofagia¹¹. Portanto, a disfunção da atividade autofágica é responsável por desencadear inúmeras patologias como: câncer, infecções, doenças cardíacas, respiratórias e neurodegenerativas, além de contribuir para o envelhecimento cutâneo¹².

Uma forma simples de ilustrar a importância do processo de autofagia para o metabolismo humano é por meio do tempo de vida de um automóvel. Por exemplo, suponha que um indivíduo adquiriu um carro novo e utiliza-o de forma constante durante a rotina. Após um tempo de uso, começam a surgir falhas e manutenções são exigidas. Entretanto, não é necessário a substituição completa do veículo, mas sim a reposição de alguns dos componentes como: bateria, pneus, óleos e filtros. O mesmo processo ocorre nas células, em vez de eliminar a célula inteira (mecanismo conhecido como apoptose), apenas alguns elementos são degradados e reciclados. Deste modo, é possível sumarizar que a autofagia é o processo em que organelas inteiras são destruídas e novas são reconstruídas para substituí-la, com o objetivo de manter a homeostase celular^{13,14}.

Ainda que os estudos sobre o tema tenham iniciado nos anos 50, a autofagia despertou atenção nas últimas duas décadas com a descoberta da importância desse processo na regeneração celular natural, o que trouxe reconhecimento ao pesquisador Yoshinori Ohsumi por meio da honra concedida pelo Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2016. Os estudos de Ohsumi evidenciaram o mecanismo de reciclagem celular e abriram caminho para a compreensão da importância da autofagia em inúmeros processos fisiológicos, além de elucidar a adaptação do processo autofágico à privação de nutrientes, exposição ao estresse e à resposta as infecções. Seus estudos auxiliaram no entendimento de doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer e Huntington, além de contribuírem para o tratamento da redução de peso e aumento da longevidade¹⁵.

Um dos benefícios mais populares da autofagia, que ganhou evidência após o Prêmio Nobel de 2016, é a prática do jejum intermitente. Estudos apontam que 14 horas de jejum auxiliam na redução de massa corporal, além de induzir a renovação de organelas, lipídeos e proteínas danificadas¹⁶. A prática de atividades físicas também demonstrou ser um excelente indutor de autofagia. Estudos evidenciaram que a prática de esportes como futebol, corrida e exercícios de alta intensidade, aumentam a expressão de genes e proteínas relacionadas a autofagia

(ATGs), o que resultou na melhora de capacidade cognitiva, redução de desenvolvimento de doenças neurológicas e promoção do envelhecimento saudável^{17,18}.

Mecanismo de autofagia

O processo de autofagia pode decorrer de três mecanismos distintos: microautofagia, autofagia mediada por chaperona e macroautofagia¹⁹. O processo de macroautofagia (**Figura 2**) é o mecanismo majoritariamente estudado²⁰, durante o qual a célula forma um compartimento “sequestrador” de membrana dupla, denominado fagóforo que envolve as proteínas e organelas e, após a sua maturação, tem-se a formação do autofagossomo. Assim, após a fusão com o lisossomo, a carga é degradada e as macromoléculas resultantes são liberadas de volta ao citosol para reutilização²¹.

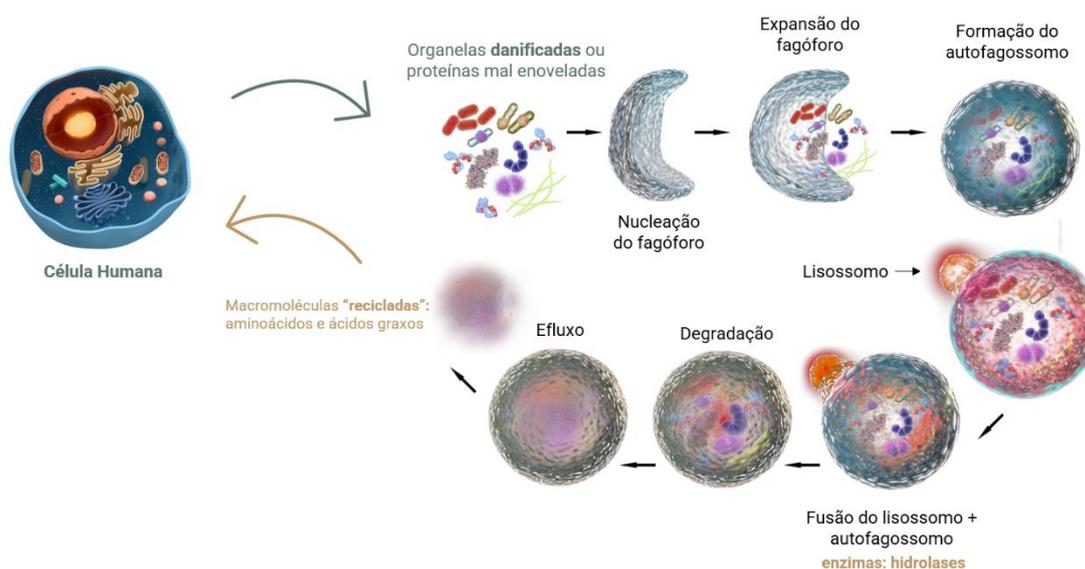


Figura 2: As cinco etapas do processo de macroautofagia: primeira fase (1), proteínas e lipídios quinases são responsáveis pela coleta de material com o objetivo de produzir a base do fagóforo, estágio inicial da autofagia.

Em seguida, tem-se a expansão da dupla membrana (2) envolvendo por completo os compostos a serem degradados. Após o completo alongamento da parede do fagóforo, observa-se a formação do autofagossomo (3). A presença do lisossomo (4) e da sua fusão ao autofagossomo prepara o complexo autofágico para digestão das macromoléculas danificadas, por meio das hidrolases (5) que degradam inicialmente a paredes internas do autofagossomo até alcançar a carga a ser processada. Por consequência é realizado efluxo de macromoléculas “recicladas” como aminoácidos e ácidos graxos no citosol para serem reutilizados pela célula²².

Durante o processo de privação de nutrientes, o complexo proteico mTORC1, cujo principal componente consiste na mTOR (alvo da rapamicina), se dissocia das proteínas (ATG13 e ULK1/2), o que ocasiona a desfosforilação parcial das mesmas – importante mecanismo de sinalização celular – e por consequência tem-se a indução do mecanismo autofágico (**Figura 3**). Entre as inúmeras proteínas que atuam na regulação da autofagia, a mTOR é o componente chave que mantém homeostase entre o processo autofágico em resposta às condições fisiológicas da célula e o estresse ambiental. Em outras palavras, a redução dos níveis de mTOR é essencial para a indução da autofagia celular. Em consequência da indução do processo autofágico, denota-se a atuação das

proteínas ATG13 e ULK1/2 na biogênese do fagóforo e autofagossomo²³, além da RB1CC1, proteína presente nos eventos iniciais e posteriores da formação do autofagossomo²⁴.

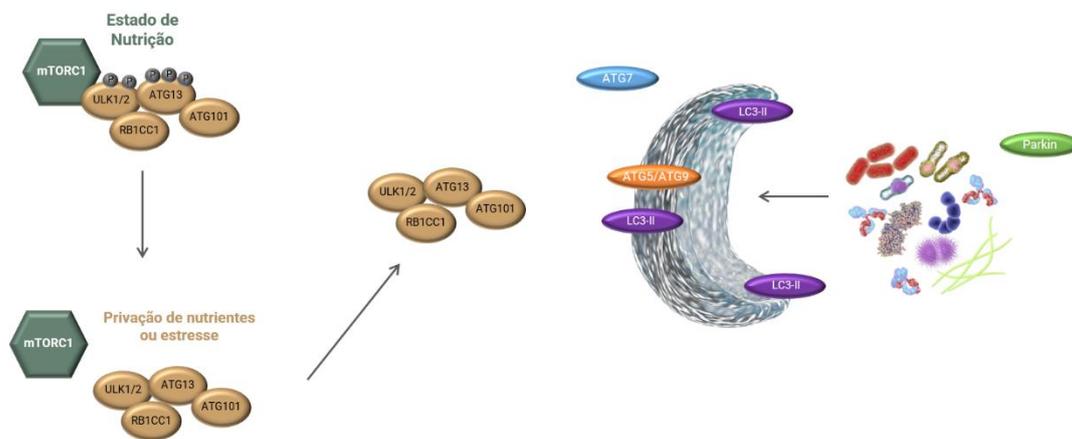


Figura 3: Indução da macroautofagia.

A LC3 é um dos marcadores mais utilizados para a identificação da formação dos autofagossomos, dado que é a proteína central na seleção dos substratos do processo de autofagia celular^{25,26}. A **Figura 3** também indica outras proteínas relacionadas à autofagia (ATGs) que desempenham papéis essenciais para formação da membrana²².

Além das proteínas envolvidas na formação do autofagossomo é importante também destacar proteínas que atuam na demarcação dos compostos a serem degradados. A proteína Parkin é responsável pelo monitoramento e seleção de mitocôndrias danificadas além de intermediar o processo de envio delas para os autofagossomos e sua subsequente degradação²⁷. Desta forma, esta proteína codificadora promove a autofagia de organelas danificadas²⁸.

Apenas a atuação da autofagia, no entanto, não é suficiente para evitar a formação de lipofuscina²⁹. Sabe-se que o sistema proteassoma é responsável por diminuir a formação deste pigmento, porém, o acúmulo de lipofuscina também inibe a atividade do proteassoma³⁰. Isto posto, denota-se que seja possível mitigar a presença em excesso de “lixo celular” apenas com altos níveis e eficiência dos dois sistemas: de autofagia e proteassoma. Logo, é fundamental observar que a atuação autofágica é a maneira mais eficiente para a remoção de proteínas oxidadas e inibição da formação de agregados em células envelhecidas devido a redução da eficiência da atividade de proteassoma³¹.

Atividade do proteassoma

O proteassoma é um complexo proteico sofisticado – de formato cilíndrico (**Figura 4**) – e extremamente eficiente que atua, em conjunto com a molécula de sinalização ubiquitina, na degradação de inúmeras proteínas alvo. Assim, análogo ao processo autofágico, a atividade do proteassoma catalisa reações biológicas para a digestão de proteínas danificadas ou malformadas³².

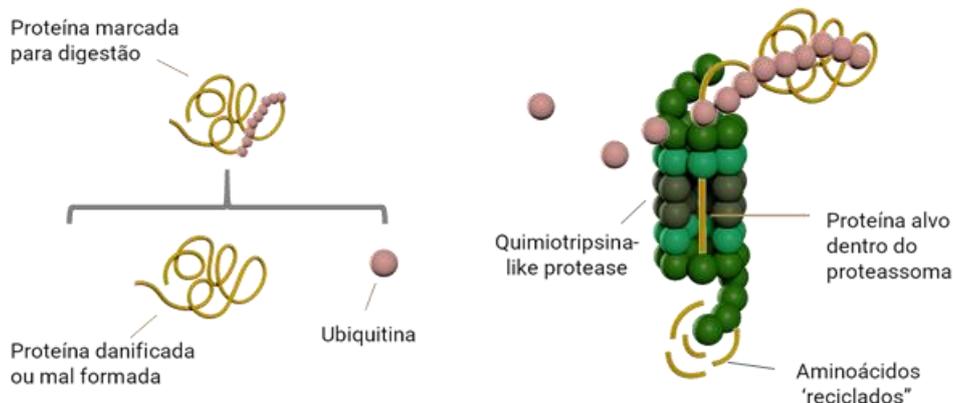


Figura 4: Atividade do proteassoma.

Acoplada a uma ou ambas as extremidades desse “cilindro”, encontram-se as unidades regulatórias que formam “tampas” cujas funções são reconhecer a proteína alvo, remover a marcação de ubiquitina dessa proteína e enviá-la para o interior do cilindro para ser quebrada em peptídeos curtos de apenas 3 a 15 aminoácidos³³.

Ainda que a atividade do proteassoma e o processo de autofagia atuem em prol da renovação de componentes intracelulares, a atividade do proteassoma pode ser inibida por proteínas de alto peso molecular, pois são incapazes de atravessar o canal estreito do proteassoma, assim, a autofagia é estimulada para eliminar esses complexos proteicos^{34, 35, 36}. Além disso, os processos demonstram diferenças também em função da idade do indivíduo. Estudos recentes realizados com fibroblastos humanos apontam que marcadores genéticos relacionados ao fluxo de autofagia praticamente não apresentam diferenças entre indivíduos jovens ou de idade avançada. Contudo, o aumento da produção e acúmulo de proteínas danificadas com avanço da idade altera a homeostase da reciclagem celular³⁷ (Figura 5).

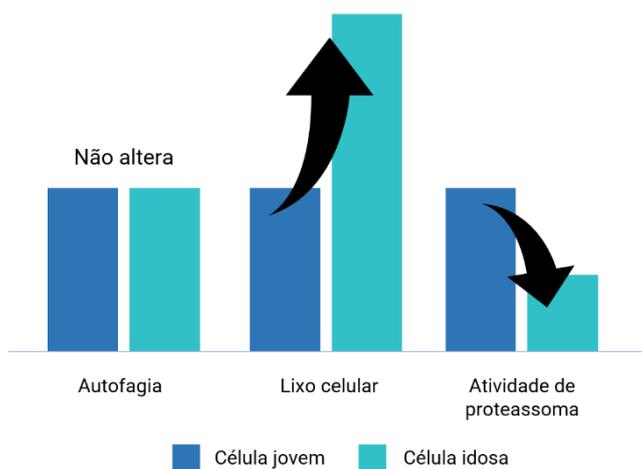


Figura 5: Balanço entre a produção de “lixo celular”, processo de autofagia e atividade de proteassoma em indivíduos jovens e de idade avançada.

Em contrapartida, a atividade e conteúdo do proteassoma são regulados negativamente com o aumento da idade do indivíduo. Assim, dessemelhante do fluxo autofágico, a atividade de proteassoma diminui no decorrer da

vida, e como consequência, obtém-se menor degradação de proteínas oxidadas e aumento na agregação de proteínas, o que induz a degeneração celular e diversas doenças associadas ao envelhecimento³⁸.

A homogeneidade do tom da pele, em função da idade do indivíduo, também é ameaçada pelo acúmulo de outro composto proteico, as proteínas carboniladas, geradas pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido cutâneo³⁹. As proteínas carboniladas são produtos da reação entre grupos amino e compostos reativos de aldeído (RAC) produzidos a partir da peroxidação lipídica, sendo esta iniciada por EROs. Assim, na pele, as proteínas carboniladas são detectadas com maior frequência em locais expostos ao sol em idosos, o que contribui para a mudança da cor da pele para o amarelo escuro devido ao envelhecimento extrínseco⁴⁰. Além disso, as proteínas carboniladas impactam também no sistema proteassoma, uma vez que proteínas carboniladas de baixo peso molecular são degradadas pela atividade de proteassoma, as proteínas de alto peso são resistente a degradação e por conseguinte inibem a ação das proteassomas⁴¹.

Desse modo, ainda que o processo autofágico e atividade do proteassoma sejam processos distintos, atuar em ambos os mecanismos com objetivo de elevar a capacidade de reciclagem de material biológico danificado no citosol demonstra ser uma estratégia eficaz e sinérgica na redução dos sinais de envelhecimento da pele, uma vez que ambas as vias metabólicas são especializadas em degradar seus respectivos alvos. Sendo assim, torna-se impreterível que a homeostase do sistema decorrerá da comunicação destes mecanismos de maneira compensatória e eficaz⁴².

Trazendo luz ao mecanismo de formação das manchas senis, a **Chemyunion** desenvolveu **Iselight**. Fruto de intensa pesquisa e triagem de ingredientes, este ativo atua na causa raiz da formação de manchas da idade promovendo a homeostase do sistema de detoxificação celular, autofágico e proteassoma, capazes de eliminar as toxinas e componente biológicos celulares disfuncionais. **Iselight** é um extrato vegetal concentrado composto por *Myrothamnus flabellifolia*, planta da ressurreição conhecida pela medicina tradicional africana, e *Coffea arabica*, importante fonte de antioxidantes.

Escolha dos Componentes

Myrothamnus Flabellifolia Leaf Extract

Myrothamnus flabellifolia é conhecida como planta da ressurreição devido a sua capacidade de sobreviver à extrema desidratação por inúmeros anos. Todas as espécies de plantas em algum momento do seu ciclo de vida são parcialmente tolerantes à dessecação, entretanto, a planta da ressurreição é notável nesse aspecto, pois pode sobreviver a perda quase completa de água (cerca de 95% de água celular), voltando ao seu estado funcional após ser hidratada dentro de 24-48 horas^{43,44}. Durante o inverno, as plantas de *Myrothamnus* (**Figura 6**) demonstram-se completamente secas, sem derramar as suas folhas, as quais se dobram próximas dos caules, assim, reidratam-se apenas no início das chuvas de verão⁴⁵. Além disto, ela é capaz de sobreviver em situações de estresse excessivo entre temperaturas extremas de frio e calor⁴⁶.



Figura 6: *Myrothamnus flabellifolia*, planta da ressurreição.

Nativa das encostas rochosas de *inselbergs* na região sul da África, a planta a ressurreição é de extrema importância na cultura, folclore e medicina tradicional do continente africano. 'Uvukwabafile' (cuja tradução é "acorda os mortos") é nome concedido a planta pela tribo zulu, devido a crença de que a *Myrothamnus flabellifolia* concede a sua capacidade de ressuscitar para um indivíduo doente durante o tratamento. Assim, a planta é considerada um símbolo de esperança na tradição africana⁴⁷.

O perfil fitoquímico do extrato das folhas de *Myrothamnus flabellifolius* é composto por flavonóides, antocianinas, alcalóides, esteróides, terpenóides, triterpenos, glicosídeos cardíacos, saponinas, flobataninas, taninos, polifenóis e açúcares⁴⁸. O acúmulo de sacarídeos é um dos principais fenômenos observados nessa planta durante a fase de desidratação. Assim, é importante citar que de maneira incomum frente a outras espécies do gênero, a *M. flabellifolius* demonstra um acúmulo de trealose, 38,1% da composição total de açúcares, em estado de dessecação⁴⁹.

Coffea Arabica (Coffee) Seed Extract

O cafeeiro (*Coffea arabica*) é uma planta de pequeno porte (**Figura 7**), de 2 a 8 m de altura, nativa do nordeste da África Tropical (sul da Etiópia e sul do Sudão), comumente naturalizada em regiões tropicais. As sementes de café são armazenadas em uma drupa (chamada de "cereja") de 10 a 15 mm de diâmetro, amadurecendo de vermelho a roxo, normalmente composta por duas sementes, as quais são os grãos de café utilizados para consumo humano⁵⁰.



Figura 7: *Coffea arabica*.

O café arábica é uma importante fonte de antioxidantes na dieta humana, devido a sua composição química, que envolvem compostos fenólicos e seus derivados (como ácidos clorogênicos), alcaloides (especialmente cafeína), álcoois diterpenóides, carboidratos, lipídios e compostos voláteis e heterocíclicos. Estudos com extratos de *C. arabica* revelaram um conjunto de importantes atividades biológicas, por exemplo, atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, supressora da expressão de metaloproteinases e redução de danos oxidativos às macromoléculas⁵¹.

A lipofuscina é um agregado lipídico-proteico peroxidado que se acumula durante o envelhecimento ou sob condições de estresse oxidativo que podem ocorrer como resultado de declínios nas defesas antioxidantes ou perda de funções de reparo. Ou seja, a presença de antioxidantes é essencial na proteção contra o estresse oxidativo⁵². O extrato aquoso de resíduos de café tem efeito inibitório no dano oxidativo e estabiliza a proteína contra a oxidação. Essa descoberta implica que resíduos de café torrado podem ser usados como recursos na tentativa de proteger do estresse oxidativo em doenças humanas⁵³. Estudos apontam que antioxidantes, especialmente o ácido clorogênico, são capazes de inibir a formação de lipofuscina^{54,55}.

Benefícios

- **IseLight:** Melhora a homogeneidade do tom da pele facial em 42% após 28 dias;
- Reduz o contraste entre a mancha e a pele em 37% após 28 dias;
- Melhora a homogeneidade do tom da pele das mãos em 63% após 56 dias;
- Reduz o tamanho médio das manchas das mãos em 26% após 56 dias;
- Melhora em até 50% a uniformidade da textura da pele (anisotropia);
- Primeiro ingrediente do mercado que atua na causa raiz das manchas senis;
- Ingrediente atende aos requisitos veganos (sem origem animal e testes em animais) e livre de conservantes;

Testes

Eficácia *In Vitro*

Para analisar o potencial de **IseLight** no estímulo do processo de autofagia, três importantes biomarcadores (mTOR, Parkin e LC3B) foram avaliados. Para isso, fibroblastos humanos foram tratados e

incubados por 24 horas. Para análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett foi usado quando a análise de variância (p) detectou diferenças significativas entre os grupos.

1.1. mTOR (proteína alvo da Rapamicina)

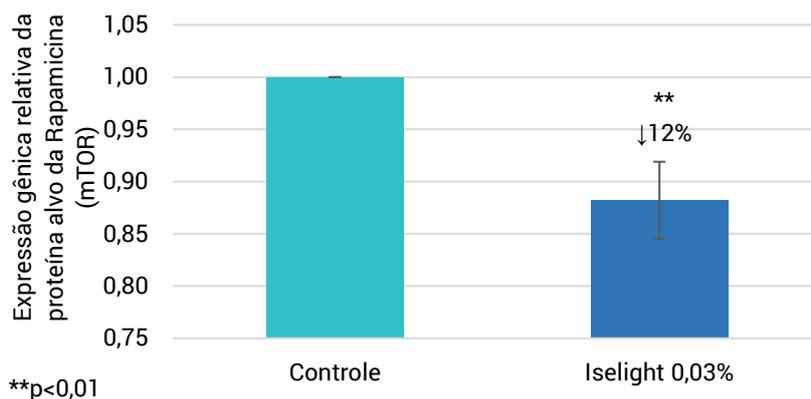


Figura 8: Expressão gênica de mTOR em fibroblastos humanos, após 24 horas de incubação. ** p<0,01 em relação ao controle.

Iselight reduziu em 12% a expressão gênica de mTOR, proteína chave cuja redução promove estímulo da autofagia celular.

1.2. Parkin

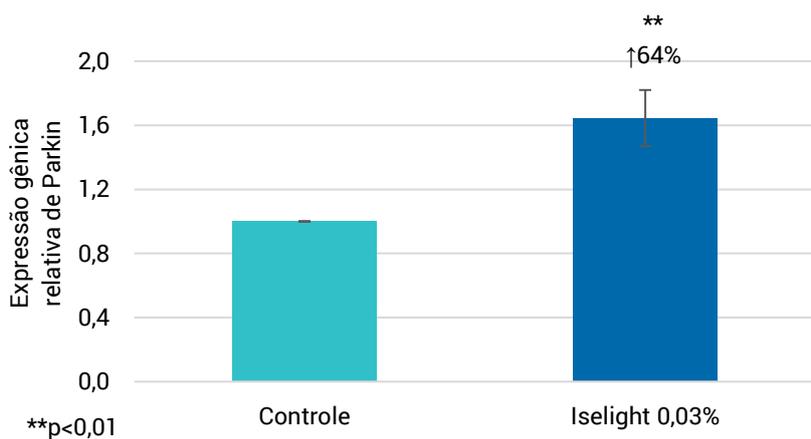


Figura 9: Expressão gênica de Parkin em fibroblastos humanos, após 24 horas de incubação. ** p<0,01 em relação ao controle.

Iselight foi capaz de estimular em 64% a expressão gênica da enzima Parkin, a qual desempenha um papel crítico na ubiquitinação – processo pelo qual as moléculas são marcadas covalentemente com a ubiquitina e direcionadas à degradação nos autofagossomos.

1.3. LCB3

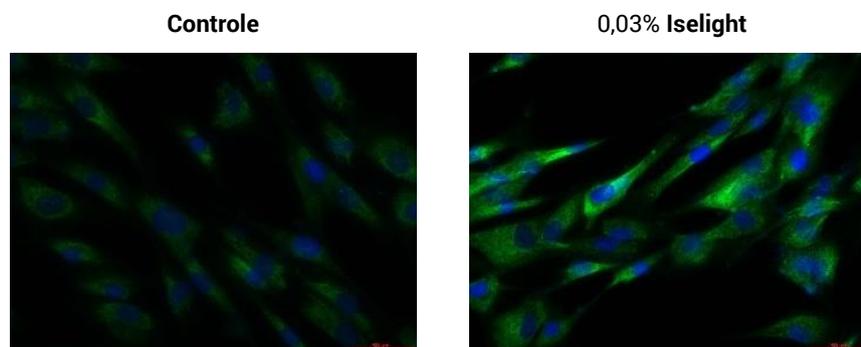


Figura 10: Análise por imunofluorescência da proteína LC3B. Imagens de microscópio com ampliação de 40x. Fibroblastos dérmicos humanos incubados por 16 horas.

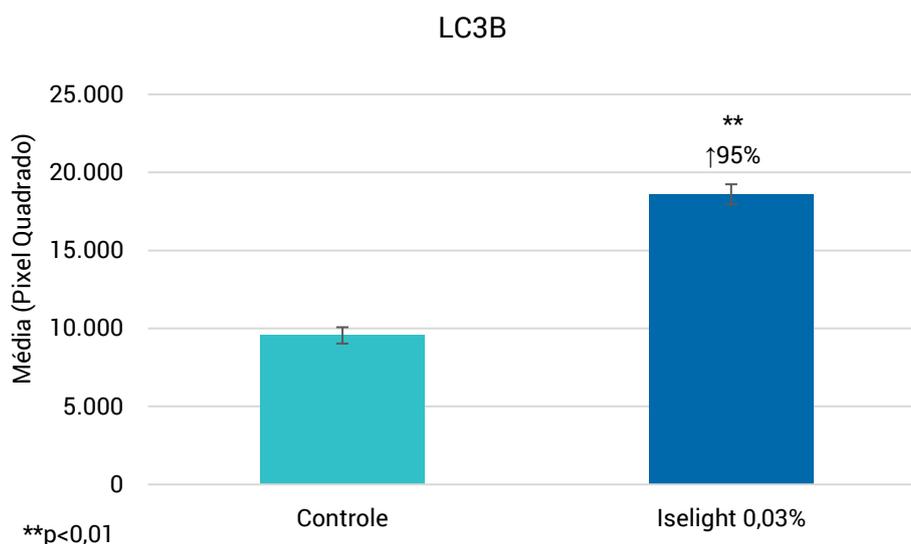


Figura 11: Quantificação das imagens representativas da síntese de LC3B em fibroblastos dérmicos humanos incubados com **Iselight** por 16 horas, em comparação ao controle. ** p<0,01 em relação ao controle.

De acordo com as **Figuras 10 e 11** é possível observar que **Iselight** a 0,03% foi capaz de promover um aumento significativo ($p<0,01$) na síntese de LC3B em 95% quando comparado ao controle. O LC3B é uma proteína central no processo de autofagia que atua na seleção de substratos e biogênese do autofagossomo.

1.4. Lipofuscina

Para avaliar o potencial de **Iselight** na diminuição de Lipofuscina, fibroblastos humanos foram tratados e incubados por 24 horas para posterior irradiação com três doses de UVA por dia, totalizando $7J/cm^2$. Após esse período, as células foram submetidas à técnica de imunofluorescência *in vitro* por um método de detecção de lipofuscina empregando anticorpo.

O grupo irradiado e tratado com o ativo foi comparado ao grupo controle (sem tratamento) e grupo controle irradiado (sem tratamento e irradiado com UVA 7J/cm²).

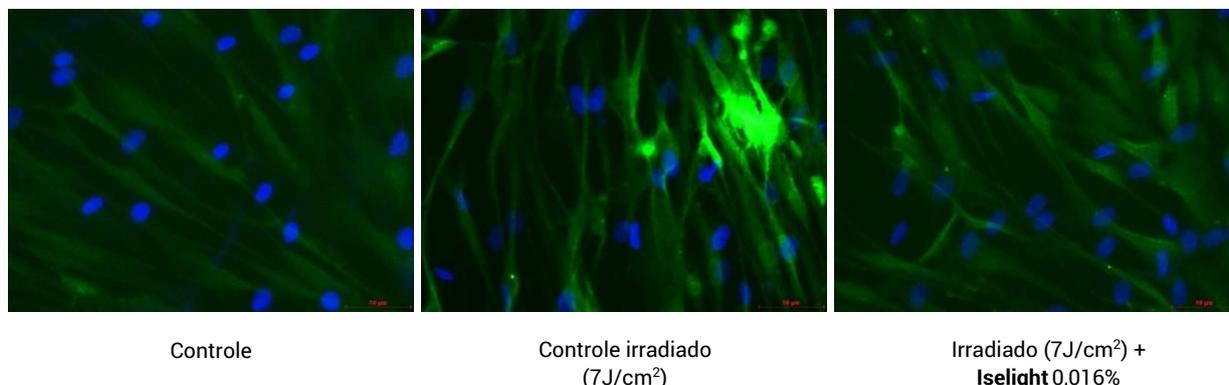


Figura 12: Avaliação por Imunofluorescência de Lipofuscina (verde) e contra-coloração com DAPI (azul, marcador de núcleos celulares), imagens microscópicas com aumento de 40x.

Como pode ser observado na **Figura 12**, **Iselight** a 0,016% foi capaz de eliminar a lipofuscina gerada pela exposição à radiação UVA se equiparando ao grupo controle sem estresse por irradiação.

1.5. Atividade do proteassoma

Os proteassomas são complexos enzimáticos com várias subunidades, dos quais três são sítios ativos enzimáticos cujo nome de um deles é quimiotripsina com atividade quimiotripsina-like⁵⁷.

Para analisar o efeito desintoxicante de **Iselight** na atividade de proteassoma, fibroblastos humanos foram tratados e incubados por 24 horas. A atividade do proteassoma quimiotripsina-like foi medida cineticamente em todas as amostras durante 60 minutos. A luminescência gerada a partir da clivagem do proteassoma de um substrato peptídico adicionado às amostras foi quantificada usando o kit comercialmente disponíveis. As células foram incubadas em tampão de detecção de atividade de proteassoma durante 10 minutos, antes da quantificação da luminescência. As medições foram realizadas a cada 2,5 minutos. Foram obtidas 4-5 réplicas técnicas por ponto de tempo para cada uma das condições testadas.

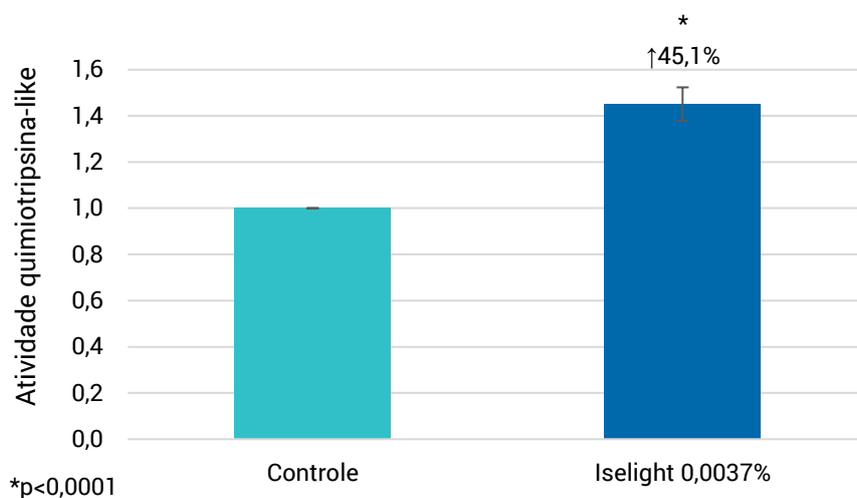


Figura 13: Representação gráfica da atividade Proteassoma quimiotripsina-like, quantificando a luminescência após 10 minutos de reação, em fibroblastos dérmicos humanos normais. * $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Os resultados mostraram que **Iselight** a 0,0037% estimulou significativamente a atividade do proteassoma em 45%, em comparação ao controle. O tratamento *in vitro* de fibroblastos humanos com **Iselight** exibe efeitos desintoxicantes através da estimulação significativa da atividade do proteassoma quimiotripsina-like.

1.6. Carbonilação de proteínas

Os efeitos detoxificantes e protetores de **Iselight** foram avaliados através da neutralização do estresse oxidativo e carbonilação de proteínas induzidos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), após 24 horas de tratamento em fibroblastos humanos.

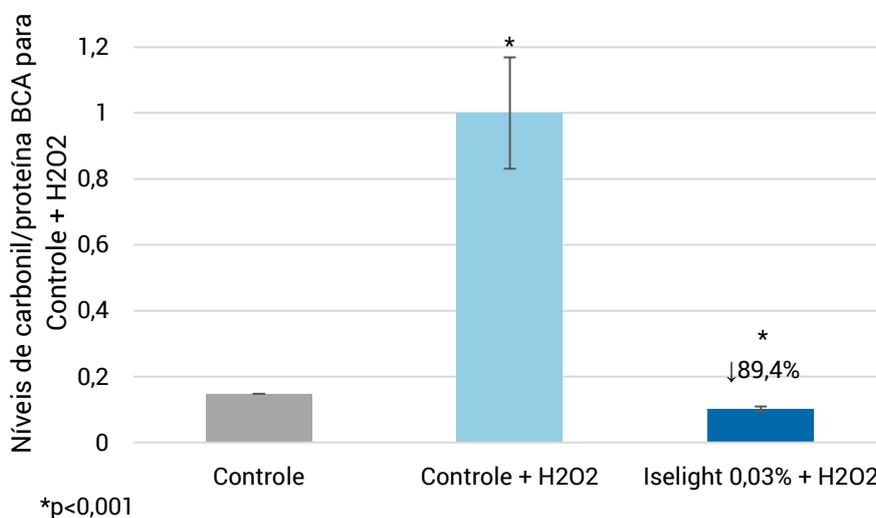


Figura 14: Carbonilação de proteínas para níveis de proteína total. Resultados normalizados para o grupo controle. * significância estatística com valor de $p < 0,001$.

Os resultados da **Figura 14** mostraram que o tratamento com H_2O_2 aumentou significativamente a carbonilação de proteínas em $5,8 \pm 2,0$ vezes em fibroblastos dérmicos humanos normais, em comparação com o controle não tratado. O tratamento com **Iselight** a 0,03% reduziu significativamente os níveis de carbonilação de proteínas em $89,4 \pm 29,2\%$; em comparação com o controle + H_2O_2 . Em conclusão, o tratamento *in vitro* com **Iselight** apresenta capacidade desintoxicante e protetora por meio de proteção significativa contra danos induzidos por H_2O_2 na forma de redução da carbonilação de proteínas, após 24 horas de tratamento com **Iselight**.

2. Eficácia *Ex Vivo*

2.1. Produção de Melanina

A ação de **Iselight** na inibição da melanogênese foi demonstrado em modelo *ex vivo*, assim, explantes de pele humana provenientes de bleforopastia de pacientes saudáveis com idade entre 35 e 70 anos foram cortados em fragmentos de $0,5 \text{ cm}^2$ e tratados por 72 horas com 12 mg/cm^2 de **Iselight** e grupo controle em paralelo. Após o período de tratamento, os fragmentos de pele foram fixados e criopreservados. Depois foram seccionados em cortes de $10 \mu\text{m}$ e coletados para lâminas silanizadas, em seguida, procedeu-se com a coloração pela técnica de Fontana-Masson. A síntese de melanina nos cortes foi analisada em Microscópio óptico (DM6000 B, acoplado com câmera DFC7000 T, Leica Microsystems) e as imagens foram capturadas por meio do software LAS v.4.12 (Leica Application Suite). As imagens obtidas foram analisadas pelo Software ImageJ® para semi-quantificação dos pixels gerados pelos pigmentos de melanina. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA. Os grupos estudados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de P foi menor ou igual a 0.05.

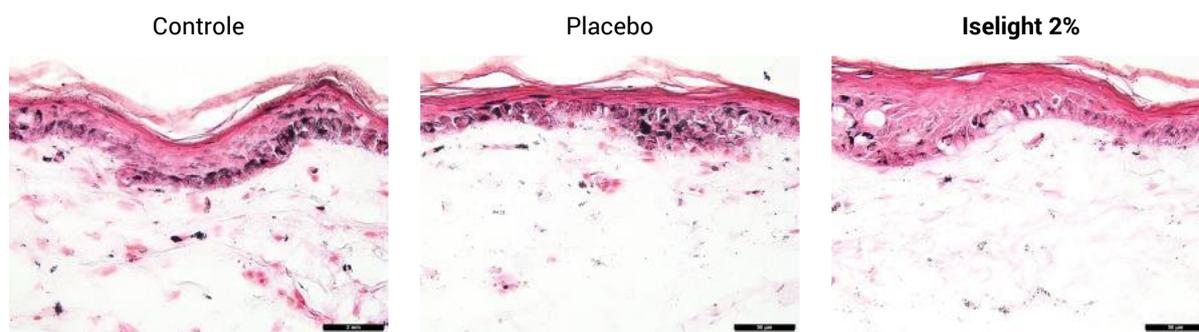


Figura 15: Avaliação por Fontana-Masson, imagens do microscópio na ampliação de 400x. Seções histológicas de $10 \mu\text{m}$ em fragmentos de pele humana (*ex vivo*) incubados em meio cultural (Controle basal), tratados com placebo e **Iselight 2%**.

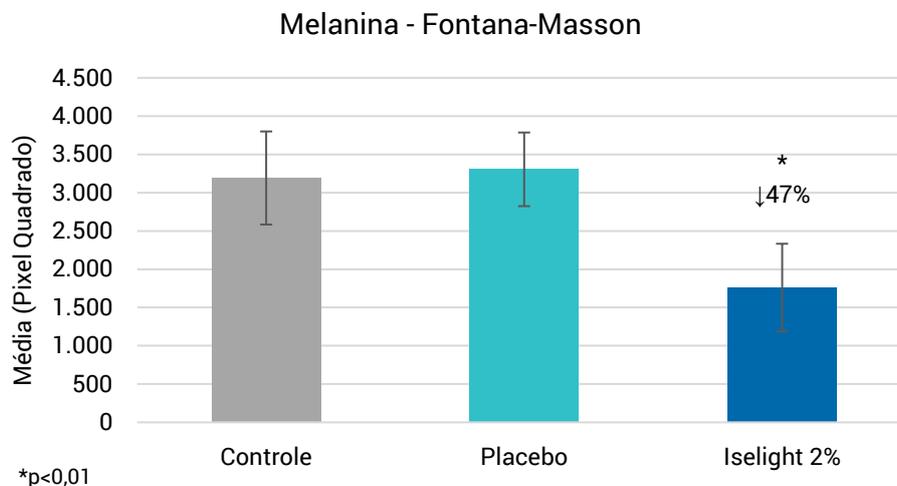


Figura 16: Redução da produção de melanina em fragmento de pele caucasiana tratada com **Iselight** e Placebo por 72 horas. Avaliação por Fontana-Masson. **p<0,01 em relação ao Controle.

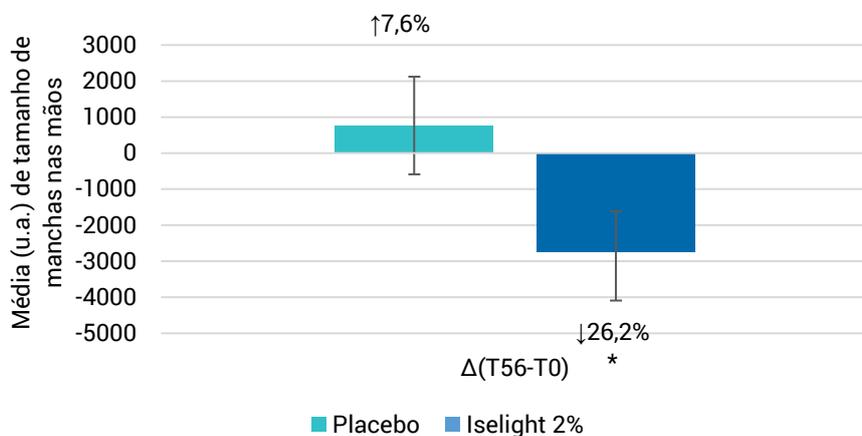
Os resultados (**Figura 15** e **Figura 16**) obtidos por meio de estudo *ex vivo*, demonstraram a ampla ação de **Iselight** no clareamento das manchas da pele, atuando também na redução de melanina proveniente do processo de melanogênese na epiderme.

3. Eficácia *In Vivo*

Avaliou-se os benefícios antienvhecimento de **Iselight** comparado ao placebo, sob condições normais de uso, com aplicação 2 vezes ao dia nas regiões do dorso das mãos e face. Os tempos de análise foram dia 0 (antes do tratamento), após 28 dias e após 56 dias de tratamento. O painel foi posto por 63 voluntários do sexo feminino, com idades entre 45 e 69 anos (média de 57 anos), apresentando manchas de fotoenvelhecimento nas mãos e fotoenvelhecimento facial (flacidez facial, rugas/linhas finas e manchas).

Foram realizadas medidas instrumentais de colorimetria através do equipamento Chroma Meter CR 400 Konica Minolta nas mãos dos participantes e adquiridas imagens padronizadas das mãos para análise de manchas. Imagens da face dos participantes foram obtidas, através do equipamento Visia CR (Canfield Scientific, Inc.), para análise de manchas. Por fim, análise do relevo cutâneo (anisotropia) foi realizada com o equipamento Visioscan® Courage+Khazaka electronic GmbH. Todas as análises foram acompanhadas do médico dermatologista.

3.1. Avaliação do clareamento de manchas nas mãos (imagens padronizadas)

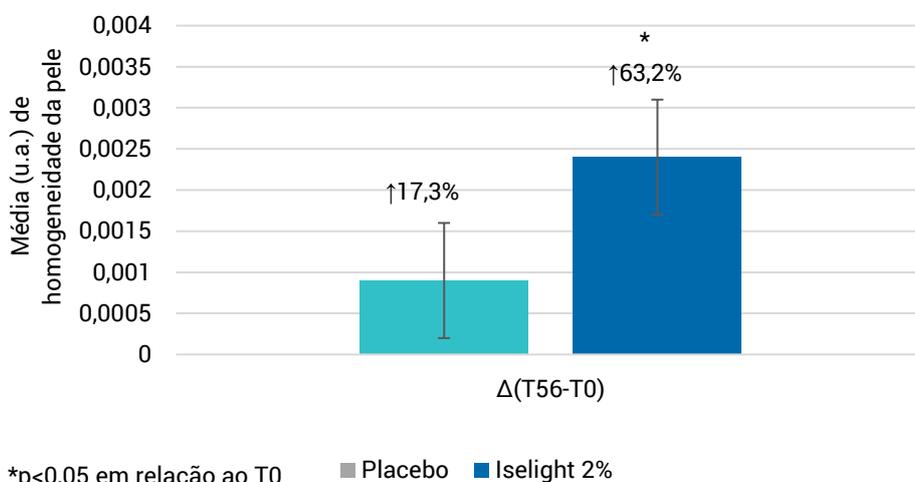


*p<0,05 em relação ao T0

Figura 17: Tamanho de manchas nas mãos, diferença entre T0 (tempo inicial) e T56 (tempo final após 56 dias de tratamento). *p<0,05 em relação ao T0.

Os resultados (Figura 17) obtidos por meio de imagens padronizadas, demonstraram clareamento das manchas através da mensuração do tamanho das manchas das mãos com redução média de 21,4% e 26,2% após, respectivamente, 28 e 56 dias de tratamento com **Iselight**. Já o melhor resultado obtido entre os voluntários foi uma redução de 78,8% e 95,7% no tamanho das manchas das mãos após 28 e 56 dias, respectivamente, de tratamento com **Iselight**.

3.2. Avaliação da homogeneidade do tom da pele das mãos (imagens padronizadas)



*p<0,05 em relação ao T0

Figura 18: Homogeneidade da pele das mãos, diferença entre T0 (tempo inicial) e T56 (tempo final após 56 dias de tratamento). *p<0,05 em relação ao T0.



Figura 19: Clareamento e aumento de homogeneidade do tom da pele das mãos tratadas com **IseLight 2%**, nos tempos 28 e 56 dias.

Os resultados obtidos por meio de imagens padronizadas, demonstraram um aumento médio de 44,7% e 63,2% na homogeneidade do tom da pele das mãos após, respectivamente, 28 e 56 dias de tratamento com **IseLight**.

3.3. Avaliação do clareamento de manchas (L*) (colorimetria - Chroma Meter® CR400 (Konica Minolta))

Para a avaliação de clareamento da pele foi utilizado o parâmetro L*, quanto maior o valor do L, mais clara a região analisada.

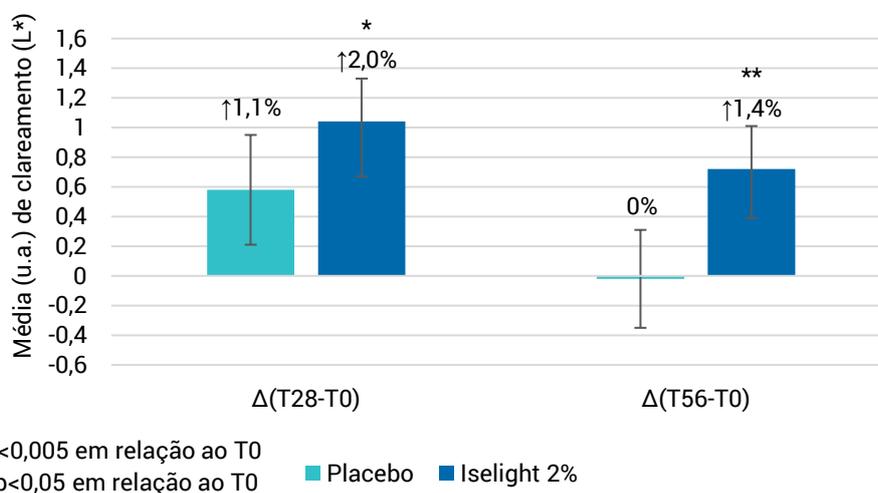


Figura 20: Clareamento de manchas médio (L*), diferença entre T0 (tempo inicial) e T28 (tempo final após 28 dias de tratamento) e diferença entre T0 e T56 (tempo final após 56 dias de tratamento). *p<0,005 e **p<0,05 em relação ao T0.

Resultados obtidos pelo Chroma Meter, demonstraram uma melhora média de 2,0% e 1,4% no clareamento da mancha (L*), após, respectivamente, 28 e 56 dias de tratamento com **IseLight 2%**. Já o melhor resultado obtido entre os voluntários foi de 9,1% e 10,3% no clareamento da mancha (L*), após, respectivamente, 28 e 56 dias de tratamento com **IseLight**.

3.4. Avaliação do contraste mancha e pele (L*) (colorimetria - Chroma Meter® CR400 (Konica Minolta))

Para a avaliação de homogeneidade da pele, foi realizado um cálculo de contraste da coloração da área da mancha e da área adjacente. Esse dado foi obtido através do delta (diferença) entre o valor de L* da área da mancha e o valor de L* da área adjacente (sem mancha). Quando o valor diminui, indica uma aproximação entre os tons das diferentes áreas e, conseqüentemente, um aumento da homogeneidade do tom da pele.

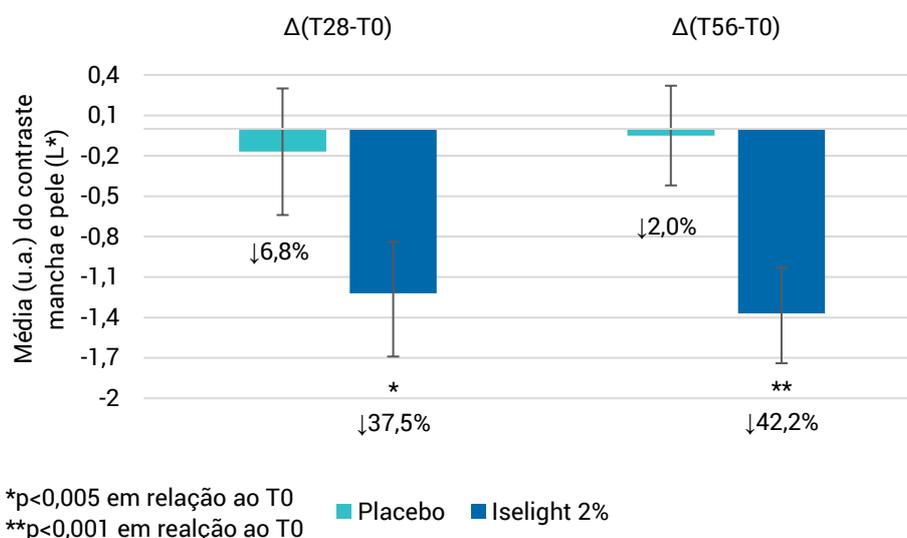


Figura 21: Contraste médio (L*), diferença entre T0 (tempo inicial) e T28 (tempo final após 28 dias de tratamento) e diferença entre T0 e T56 (tempo final após 56 dias de tratamento). *p<0,005 e **p<0,001 em relação ao T0.

Os resultados obtidos pelo Chroma Meter, demonstraram uma redução média de 37,5% e 42,2% no contraste entre mancha e pele (*L), após, respectivamente, 28 e 56 dias de tratamento com **Iselight 2%**.

3.5. Análise do clareamento de manchas faciais (Visia CR® (Canfield Scientific, Inc.))

3.5.1. Homogeneidade da pele

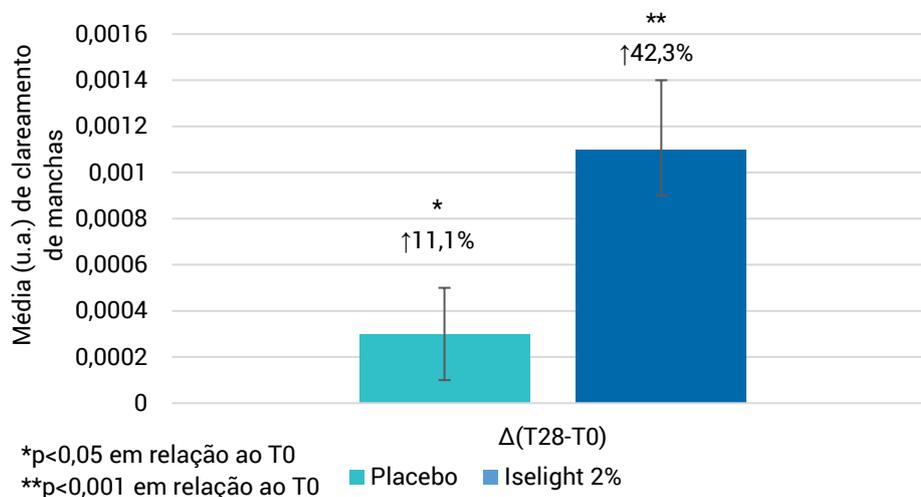


Figura 22: Homogeneidade do tom da pele. Média das medidas, diferença entre T0 (tempo inicial) e T28 (tempo final após 28 dias de tratamento). *p<0,05 e **p<0,001 em relação ao T0.

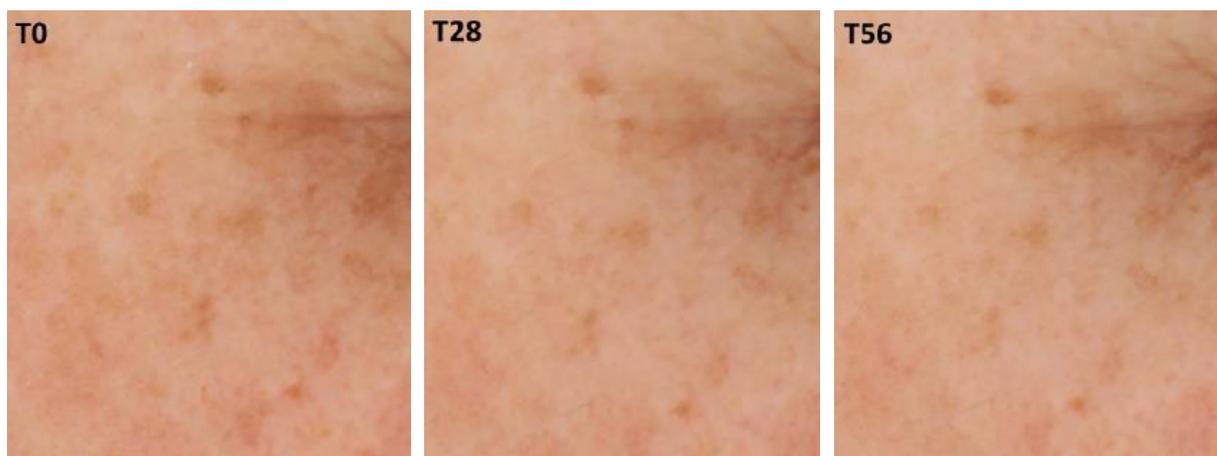


Figura 23: Clareamento das manchas faciais e aumento de homogeneidade da pele da face tratada com **Iselight** 2%, nos tempos 28 e 56 dias. Voluntário 1.

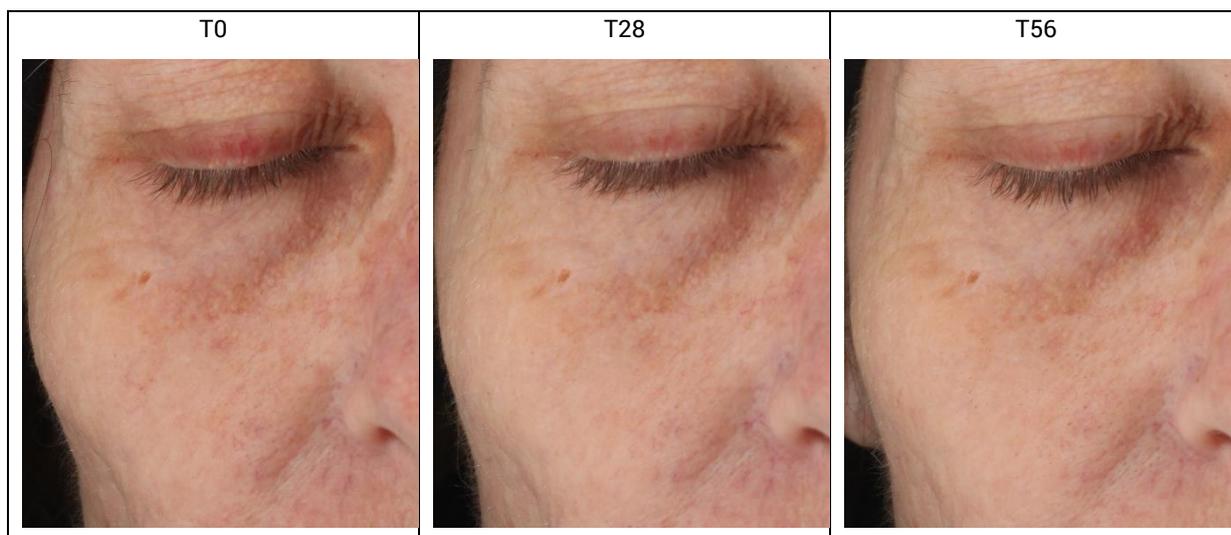


Figura 24: Clareamento das manchas faciais e aumento de homogeneidade da pele da face tratada com **Iselight 2%**, nos tempos 28 e 56 dias. Voluntário 2.

Os resultados obtidos pelo Visia CR® demonstraram um aumento médio de 42,3% na homogeneidade da face após 28 dias de tratamento com Iselight 2%.

3.6. Análise do relevo cutâneo (Visioscan® Courage+Khazaka electronic GmbH)

3.6.1. Índice de anisotropia (antebraço)

Anisotropia é uma palavra grega que descreve a dependência de uma propriedade física do material com a direção (o oposto de isotropia). Este conceito é usado em estudos dermatológicos para descrever a direção das linhas no estrato córneo. Ao longo os anos observa-se que ocorre uma transição de uma distribuição quase isotrópica das linhas cutâneas na pele jovem para uma distribuição altamente anisotrópica no tecido envelhecido, desta forma, neste estudo foi esperada a redução do índice de anisotropia.

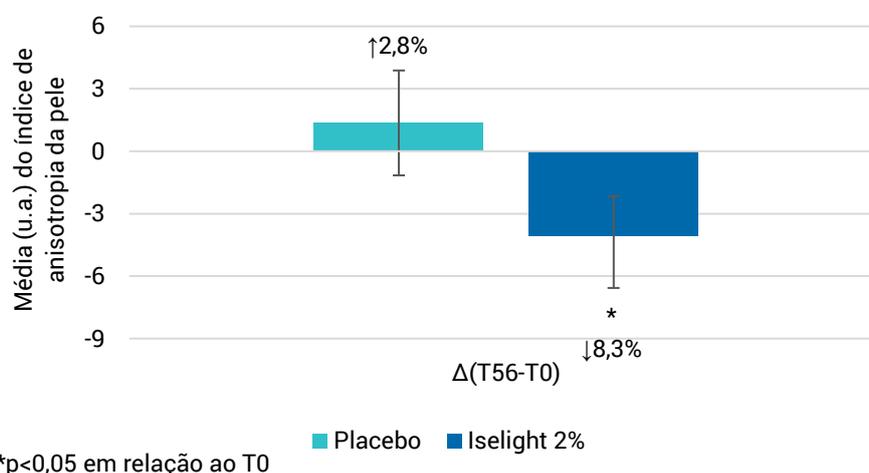


Figura 25: Índice de anisotropia da pele. Média das medidas, diferença entre T0 (tempo inicial) e T56 (tempo final após 56 dias de tratamento). *p<0,05 em relação ao T0.

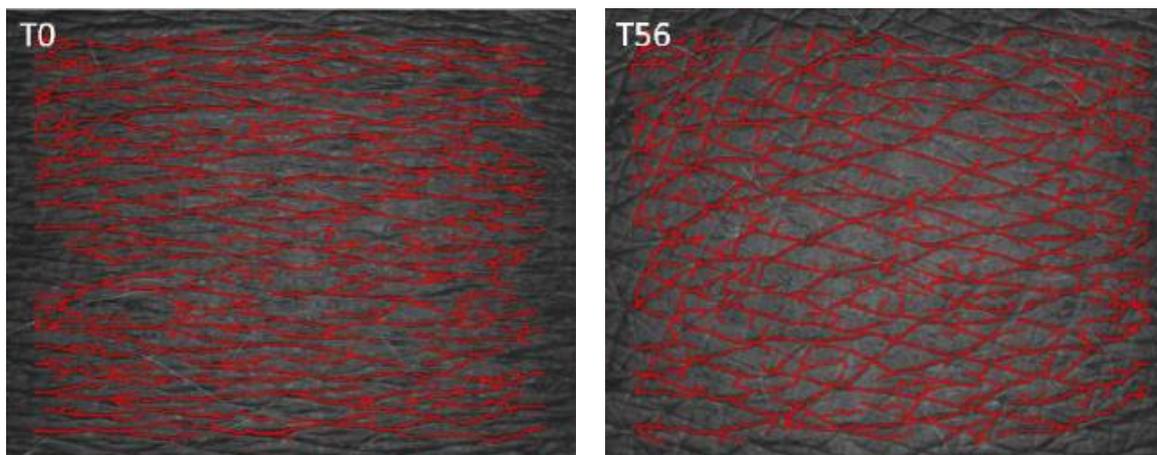


Figura 26: Melhora da textura da pele tratada com **Iselight 2%**, no tempo inicial (T0) e após 56 dias (T56).

Os resultados obtidos pelo VisioScan[®], demonstraram uma redução de 8,3% no índice de anisotropia da pele, após 56 dias de tratamento com **Iselight 2%**. Já o melhor resultado obtido entre os voluntários foi uma redução de 50,2% no índice de anisotropia da pele, após 56 dias de tratamento com **Iselight**.

Aplicação

Emulsões e géis com benefícios antienvhecimento e detox para pele.

Adicionar no final do processo em temperatura abaixo de 45°C.

Observação: Consultar legislação vigente quanto a restrições regulatórias locais referentes ao uso do termo “mancha” em produtos cosméticos.

Estabilidade e Compatibilidade

pH: 4,0-6,0

Concentração de Uso

2% (p/p).

Referências Bibliográficas

- 1- GOLD, Michael H.; GALLAGHER, Conor. An evaluation of the benefits of a topical treatment in the improvement of photodamaged hands with age spots, freckles, and/or discolorations. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, v. 12, n. 12, p. 1468-1472, 2013.
- 2- FARAGE, Miranda A. et al. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutaneous and ocular toxicology*, v. 26, n. 4, p. 343-357, 2007.

- 3- RINNERHALER, Mark et al. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.
- 4- YAMAGUCHI, Yuji; BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The regulation of skin pigmentation. *Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 38, p. 27557-27561, 2007.
- 5- CHOI, Wonseon et al. Molecular and histological characterization of age spots. *Experimental dermatology*, v. 26, n. 3, p. 242-248, 2017.
- 6- PORTA, Eduardo A. Pigments in aging: an overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 959, n. 1, p. 57-65, 2002.
- 7- SKOCZYŃSKA, Anna et al. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, v. 34, n. 2, p. 97, 2017.
- 8- BOURNE, Geoffrey H. Lipofuscin. In: *Progress in brain research*. Elsevier, 1973. p. 187-201.
- 9- ROBISON, W. G.; KUWABARA, T.; BIERI, J. G. Deficiencies of vitamins E and A in the rat. Retinal damage and lipofuscin accumulation. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 19, n. 9, p. 1030-1037, 1980.
- 10- TERMAN, Alexei; BRUNK, Ulf T. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *Apmis*, v. 106, n. 1-6, p. 265-276, 1998.
- 11- HEWITT, Graeme; KOROLCHUK, Viktor I. Repair, reuse, recycle: the expanding role of autophagy in genome maintenance. *Trends in cell biology*, v. 27, n. 5, p. 340-351, 2017.
- 12- ABIGAIL N R, BRANTLEE S B, GAIL S M, HEATHER A. Efficacy of an Autophagy-Activating Skincare Regimen in the Treatment of Photoaging skin. *J Complement Med Alt Healthcare*. 2017; 1(5): 555574
- 13- FUNG, Jason. How to renew your body: Fasting and autophagy. *Diet Doctor*. Available in: <<https://www.dietdoctor.com/renew-body-fasting-autophagy>>. Wed. 27 Nov 2019.
- 14- ZANCAN, Uronal. Prêmio Nobel de Medicina de 2016 – AUTOFAGIA. 2016. Available in: <<https://www.youtube.com/watch?v=w-qbOnRblw4>>. Wed. 27 Nov 2019.
- 15- IVES, Laurel. O que é autofagia, o processo que pode fazer você perder peso e viver mais. *BBC News*. 08 May 2018. <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-44029045>>. Thu. 29 Nov 2019.
- 16- YANG, Jai-Sing et al. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus. *Biomedicine*, v. 7, n. 2, 2017.
- 17- HE, Congcong; SUMPTER, JR, Rhea; LEVINE, Beth. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1548-1551, 2012.
- 18- SCHWALM, Céline et al. Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 8, p. 3515-3526, 2015.
- 19- OKAMOTO, Koji. Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol*, v. 205, n. 4, p. 435-445, 2014.
- 20- GIORGIO, Selma. Autofagia celular em processos patológicos. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 35, n. 1, p. 125-136, 2014.
- 21- FENG, Yuchen et al. The machinery of macroautophagy. *Cell research*, v. 24, n. 1, p. 24, 2014.
- 22- GATICA, Damián; LAHIRI, Vikramjit; KLIONSKY, Daniel J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology*, v. 20, n. 3, p. 233-242, 2018.

- 23- GRASSO, Daniel Hector; RENNA, Felipe Javier; VACCARO, Maria Ines. Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 6, p. 146, 2018.
- 24- SZKLARCZYK D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan; 47:D607-613.
- 25- TANIDA, Isei; UENO, Takashi; KOMINAMI, Eiki. LC3 and Autophagy. In: *Autophagosome and Phagosome*. Humana Press, 2008. p. 77-88.
- 26- HUANG, Rui; LIU, Wei. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy. *Autophagy*, v. 11, n. 5, p. 852-853, 2015.
- 27- NARENDRA, Derek et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*, v. 183, n. 5, p. 795-803, 2008.
- 28- National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2013 Sep 16 [cited 2020 Apr 15]. Available in: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PRKN>>.
- 29- KELLER, Jeffrey N. et al. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 36, n. 12, p. 2376-2391, 2004.
- 30- HÖHN, Annika et al. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 50, n. 5, p. 585-591, 2011.
- 31- RINNERTHALER, Mark et al. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.
- 32- TANAKA, Keiji. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, v. 85, n. 1, p. 12-36, 2009.
- 33- HINES, John; CREWS, Craig M. Infographic: Proteasome Basics. *The Scientist*. Available on: <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-proteasome-basics-31600>. April 30, 2017.
- 34- WENZEL, Thorsten; BAUMEISTER, Wolfgang. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nature structural biology*, v. 2, n. 3, p. 199-204, 1995.
- 35- PANKIV, Serhiy et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 33, p. 24131-24145, 2007.
- 36- WANG, Da-wei et al. The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37098, 2015.
- 37- KIM, Hei Sung et al. Autophagy in human skin fibroblasts: impact of age. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 8, p. 2254, 2018.
- 38- BULTEAU, A.-L.; PETROPOULOS, I.; FRIGUET, B. Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Experimental gerontology*, v. 35, n. 6-7, p. 767-777, 2000.
- 39- OLIVER, Cynthia N. et al. Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n. 12, p. 5488-5491, 1987.
- 40- YAMAWAKI, Yumiko et al. The impact of carbonylated proteins on the skin and potential agents to block their effects. *Experimental dermatology*, v. 28, p. 32-37, 2019.

- 41- GONOS, Efstathios S. et al. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging (Albany NY)*, v. 10, n. 5, p. 868, 2018.
- 42- NAM, Taewook et al. Emerging paradigm of crosstalk between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Molecules and cells*, v. 40, n. 12, p. 897, 2017.
- 43- SCOTT, Peter. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany*, v. 85, n. 2, p. 159-166, 2000.
- 44- BENTLEY, Joanne; MOORE, John P.; FARRANT, Jill M. Metabolomic Profiling of the Desiccation-Tolerant Medicinal Shrub *Myrothamnus flabellifolia* Indicates Phenolic Variability Across Its Natural Habitat: Implications for Tea and Cosmetics Production. *Molecules*, v. 24, n. 7, p. 1240, 2019.
- 45- SUAU, Rafael et al. Arbutin and sucrose in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 8, p. 2555-2556, 1991.
- 46- CHEIKHYOUSSEF, Ahmad; SUMMERS, Rowan Wayne; KAHAKA, Gladys K. Qualitative and quantitative analysis of phytochemical compounds in Namibian *Myrothamnus flabellifolius*. *International Science and Technology Journal of Namibia*, p. 071-083, 2015.
- 47- MOORE, John P. et al. An overview of the biology of the desiccation-tolerant resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Annals of Botany*, v. 99, n. 2, p. 211-217, 2007.
- 48- KRUGER, Lynette Anne. Towards an understanding of the mechanisms of desiccation tolerance in *Myrothamnus flabellifolius* (WELW.). 1998. Dissertação de Mestrado. University of Cape Town.
- 49- DRENNAN, P. M. et al. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. *Journal of plant physiology*, v. 142, n. 4, p. 493-496, 1993.
- 50- PLANTS OF THE WORLD ONLINE. *Coffea arabica* L., 2020. Disponível em: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:747038-1>
- 51- AFFONSO, Regina Celis Lopes et al. Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica* L.) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, 2016.
- 52- AMES, Bruce N.; SHIGENAGA, Mark K.; HAGEN, Tory M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- 53- YEN, Wen-Jye et al. Antioxidant properties of roasted coffee residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, 2005.
- 54- CAI, Rui; CHEN, Shuqing; JIANG, Shenhua. Chlorogenic acid inhibits non-enzymatic glycation and oxidation of low density lipoprotein. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Zhejiang University. Medical sciences*, v. 47, n. 1, p. 27-34, 2018.
- 55- LEWIS, Charles. *Enteroimmunology: A Guide to the Prevention and Treatment of Chronic Inflammatory Disease*. Psy Press, 2017.
- 56- ADAMS, Julian. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer treatment reviews*, v. 29, p. 3-9, 2003.
- 57- THIEULIN, C. et al. Mechanical and topographical anisotropy for human skin: Ageing effect. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 103, p. 103551, 2020.



As informações contidas nesta Literatura são fornecidas de boa fé. Recomendamos que nossos produtos sejam testados para se verificar a conveniência de seu uso antes de adotá-los a nível industrial. Estas informações não devem ser entendidas como concessão ou permissão para utilização de métodos ou composições cobertas por qualquer patente. É proibida a reprodução deste material sem autorização da **Chemyunion Ltda.**

SA: 14430/21