

ANÁLISE “IN VITRO” E “IN VIVO” DO POTENCIAL IRRITANTE DE TENSOATIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

RESUMO

Os detergentes possuem propriedades físico-químicas cruciais para o aparecimento de reações inflamatórias na pele. Para diminuir o potencial de toxicidade, os tensoativos derivados de aminoácidos mimetizam os compostos naturais e apresentam alta eficácia, além de pequeno impacto ambiental. O baixo poder de irritação destes novos derivados pode ser avaliado através de testes “in vitro” e/ou “in vivo”. A partir de soluções a 5% de cada um dos tensoativos estudados e claras de ovos foi realizado teste de desnaturação protéica. Também se fez teste de irritação dérmica primária e cumulativa com os detergentes que mostraram ser menos irritantes. No teste “in vitro”, Amisoft CS-II[®], Amisoft LS-II[®], Amisoft MS-II[®] não apresentaram ação sobre as proteínas do ovo, enquanto Amilite GCS-II[®] e LSS, ao serem comparados com o controle, apresentaram diferença significativa, caracterizando desnaturação protéica. No teste “in vivo”, não foi observado edema ou eritema na pele de nenhum dos animais submetidos ao teste. Com isso, Amisoft CS-II[®], Amisoft LS-II[®], Amisoft MS-II[®] não são tensoativos potencialmente irritantes e pode-se afirmar que os métodos propostos são satisfatórios para avaliação de irritabilidade.

Palavras-chave: irritabilidade, tensoativos derivados de aminoácidos, desnaturação protéica, toxicidade dérmica

SUMMARY

The detergents have physicochemical properties crucial for eliciting irritants skin reactions. To decrease the potential of toxicity, surfactants, obtained from amino acids, mimics of natural compounds, are biodegradable and not skin irritation. The low toxicity of these amino acids based surfactants can evaluate in vitro and in vivo. With solutions 5% of the detergents proposed and egg white protein denaturing tests have been carried out. Moreover, tests of dermal irritation have also been performed with the detergents with low toxicity. In vitro test, Amisoft CS-II[®], Amisoft LS-II[®], Amisoft MS-II[®] had not presented action in the albumin; however Amilite GCS-II[®] and sodium lauryl sulphate had presented protein denaturation. In vivo test, nether edema nor erythema was detected in the animals. With this, Amisoft CS-II[®], Amisoft LS-II[®], Amisoft MS-II[®] are safe surfactants and the proposed tests are satisfactory for evaluation of irritability.

Keywords: irritability, amino acids based surfactants, protein denaturation, dermal toxicity

INTRODUÇÃO

Os tensoativos são produtos químicos de elevada importância mundial, visto que diariamente são consumidos em larga escala, o que acaba afetando negativamente tanto o ecossistema como a população (1). Em função disso, os profissionais responsáveis pela elaboração de produtos de higiene têm se

mostrado cada vez mais preocupados com a síntese de detergentes biodegradáveis e biocompatíveis com a pele dos consumidores sem causar irritações dérmicas especialmente para aqueles com problemas dermatológicos, tais como acne, psoríase e dermatite de contato (2).

Bárbara da Silva e Souza Lorca^{1},
Nádia Maria Volpato²,
Laís Bastos da Fonseca¹ e
Elisabete Pereira dos Santos¹*

¹Faculdade de Farmácia
Universidade Federal do
Rio de Janeiro

²Faculdade de Farmácia
Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

*Autora para correspondência:
Farmácia Universitária – UFRJ
CEP: 21941-590
Rio de Janeiro. RJ
Fone: (21) 2260-7381
E-mail: balorca@viafirenze.com.br

A pele é um órgão imunocompetente, totalmente capaz de iniciar uma reação inflamatória em resposta a produtos irritantes (3). Grande parte dos detergentes possui propriedades físico-químicas que são cruciais para o aparecimento destes eventos, ou seja, a ligação destas moléculas com a queratina juntamente com a desnaturação de proteínas, causada pela entrada de irritantes no estrato córneo (4) levam a alterações na membrana que estão diretamente relacionadas à indução de respostas cutâneas (5). Outro evento é a delipidação, processo no qual a balança de lipídeos é modificada, levando a uma alteração que diminui a função de barreira exercida pelo estrato córneo (6).

Devido a estas alterações, grande parte da população acredita ter pele sensível e procura por produtos detergentes menos irritantes. Como o pH da pele aumenta consideravelmente após o uso regular de um sabonete convencional (7,8), o desenvolvimento de sabonetes sintéticos em barra (syndets) e a combinação de tensoativos naturais e sintéticos (combars), que possuem um pH menos alcalino do que os sabões tradicionais têm despertado um grande interesse das indústrias cosméticas e farmacêuticas (9).

Os surfactantes sintéticos, 5% (combars) a 80% (syndets), originam produtos menos irritantes, apresentam maior qualidade e quantidade de espuma (10), podem ser ajustados ao pH normal da pele, usualmente entre pH 5 e 6 (7) e fornecem à pele mais brilho, textura e leveza, características estas que podem ser atribuídas à capacidade destes produtos em manter a integridade da barreira do estrato córneo e fornecer uma maior hidratação cutânea (11).

Uma interessante estratégia para obtenção destes surfactantes mais adequados é através de modelagem molecular, mimetizando compostos naturais a partir de aminoácidos, oligossacarídeos, peptídeos e gliceróis (12). Destes derivados, os aminoácidos têm mostrado ser excelentes compostos para a síntese de biodetergentes com alta eficácia, baixo potencial de toxicidade e pequeno impacto ambiental. São preparados eficientemente por catálise química ou enzimática, podendo contribuir para o aumento da demanda de tensoativos “benéficos” na indústria farmacêutica e de alimentos (2,13,14).

A análise dos tensoativos derivados de aminoácidos, ditos menos irritantes por apresentarem um pH mais próximo ao cutâneo, pode ser realizada através do teste de desnaturação de proteínas (15,16). Sendo confirmado pelos testes de irritação dérmica primária e cumulativa, preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos” (17).

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o grau de irritação de diferentes moléculas derivadas de aminoácidos e do lauril sulfato de sódio (LSS) através do teste de desnaturação de proteínas (15,16) e realizar testes de irritação dérmica primária e cumulativa (18) com os detergentes que apresentaram menor índice de desnaturação, ou seja, são menos irritantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste de irritação “in vitro”

Em 1957, Blohm estudou a desnaturação da albumina do ovo (ovalbumina) através de uma série de sulfatos de sódio e mostrou que essa proteína possui uma solubilidade semelhante a das proteínas encontradas na epiderme, além de comprovar que os radicais lauril têm uma larga capacidade de promoverem desnaturação protéica (18).

Baseado neste ensaio foram preparadas soluções a 5%, dos surfactantes derivados de aminoácidos a serem avaliados (Amisoft CS-II[®], Amisoft LS-II[®], Amisoft MS-II[®] e Amilite GCS-II[®]) e o LSS, também em solução a 5%. Posteriormente, foram adicionados 10 gramas de claras de ovos, previamente homogeneizadas em agitador magnético por 5 minutos, a 2,5 gramas de solução de cada um dos tensoativos. A mistura formada (ovalbumina + tensoativo) permaneceu sob agitação por 2 minutos e, em seguida, foi realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Biospectro[®] SP-220). A solução controle empregada foi clara de ovo e água destilada, nas mesmas proporções das amostras com tensoativos.

Teste de irritação “in vivo”

De acordo com o “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos” (19), o teste de irritação dérmica primária foi realizado em coelhos albinos, de aproximadamente 1,5kg, que tiveram sua região dorsal dividida em quatro diferentes áreas. Cada um dos tensoativos selecionados foi aplicado nas áreas 1 e 2 (Figura 1), em quatro diferentes animais, previamente depilados, através de um patch oclusivo, composto por gaze estéril fixada ao animal com fita adesiva. As áreas 3 e 4 serviram de controle e, também, foram cobertas

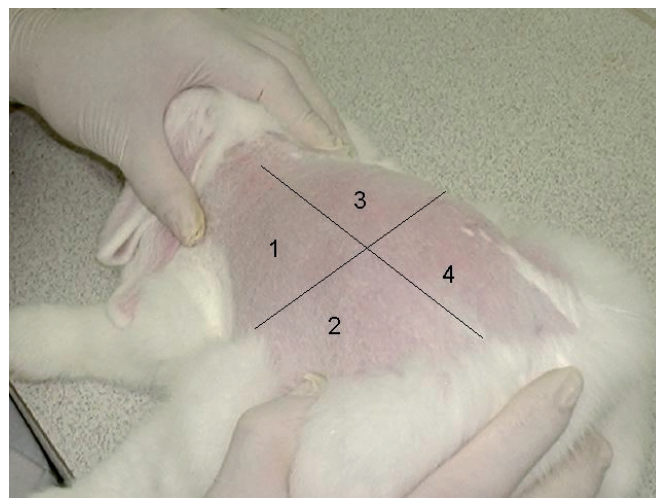


Figura 1. Áreas de aplicação das amostras

com o mesmo material. Após 4 horas de contato, o produto foi retirado, com auxílio de água. Passadas 24 e 72 horas da aplicação, foi avaliada a presença de eritema e/ou edema.

No caso do ensaio para irritação dérmica cumulativa, as aplicações foram feitas seguindo a mesma técnica, por um período de 10 dias consecutivos, com frequência diária e a observação da integridade da pele dos animais foi realizada a cada 24 e 72 horas após a última aplicação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos tensoativos através do método de análise da desnaturação de proteínas obteve valores de transmitância que podem ser observados na Tabela 1. Após avaliação estatística dos resultados através de análise de variância, com $\alpha = 0,05$, observou-se que $P \leq 0,001$ é considerado uma diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). Com isso, Amisoft LS-11[®] e Amisoft MS-11[®] não apresentaram ação sobre as proteínas do ovo nas condições avaliadas, pois seus valores comparados ao do controle não possuem diferença significativa. Já o Amisoft CS-11[®] aparece com valor estatisticamente diferente ao do controle (Tabela 1), mas como é um valor superior, também, não apresenta ação desnaturante.

Amilite GCS-11[®] e Lauril Sulfato de Sódio apresentaram diferença significativa ao serem comparados ao controle, caracterizando desnaturação de ovalbuminas.

Os testes de irritação dérmica primária e cumulativa foram realizados, especificamente, com aqueles tensoativos considerados não irritantes através do método proposto por Blohm (19), ou seja, Amisoft CS-11[®], Amisoft LS-11[®], Amisoft MS-11[®] e os resultados obtidos com os coelhos confirmaram o observado no teste "in vitro", já que a pele dos animais permaneceu íntegra, após 24 e 72 horas, entre os 10 dias consecutivos de aplicações e análises. (Figura 2)



Figura 2. Integridade da pele após aplicação

Amostra	Transmitância a 660 nm (%)
Controle (clara de ovo + água)	80,1
Lauril Sulfato de Sódio	10,5
Amilite LS-11 [®]	80,5
Amisoft MS-11 [®]	80,2
Amisoft CS-11 [®]	82,9
Amilite GCS-11 [®]	0,5

Tabela 1. Valores de Transmitância a 660nm

Comparações (controle x tensoativos)	Diferença entre Médias	t	P	Nível Crítico	Significante
Controle X Amilite GCS-11 [®]	79,600	273,324	$1,057 \times 10^{-20}$	0,010	Sim
Controle X LSS	69,567	238,872	$4,065 \times 10^{-20}$	0,013	Sim
Controle X Amisoft CS-11 [®]	2,767	9,500	0,00000254	0,017	Sim
Controle X Amisoft LS-11 [®]	0,367	1,259	0,237	0,025	Não
Controle X Amisoft MS-11 [®]	0,100	0,343	0,738	0,050	Não

Tabela 2. ANOVA - Comparação com o Grupo Controle

CONCLUSÃO

Os testes de irritação avaliados são métodos qualitativos e se mostraram eficazes aos que foram propostos.

Através do teste “in vitro” foi possível avaliar quais são os tensoativos, dentre os estudados, que não apresentam desnaturação de proteínas. Ou seja, aqueles que apresentaram valores maiores de transmitância, caracterizados pela não ocorrência de turvação, são os menos irritantes. Fato que foi confirmado pela avaliação “in vivo”, pois como já foi citado

anteriormente, as proteínas contidas na clara do ovo possuem uma solubilidade semelhante a das proteínas encontradas na epiderme.

AGRADECIMENTOS

À Ajinomoto® pela doação das matérias-primas para realização do trabalho.

À Farmácia Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo incentivo à pesquisa.

Referências

1. YING, G.G. *Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment*. **Environment International**, v.32, p.417–431, 2006.
2. INFANTE, M.R.; PÉREZ, L.; PINAZO, A.; CLAPÉS, P.; MORÁN, M.C.; ANGELET, M.; GARCÍA, M.T.; VINARDELL, M.P. *Amino acid-based surfactants*. *C. R. Chimie* v.7, p. 583–592, 2004.
3. BERNHOFER, L. P.; BARKOVIC, S.; APPA, Y.; MARTIN, K. M. *IL-1 α and IL-1 β Secretion from Epidermal Equivalents and the Prediction of the Irritation Potential of Mild Soap and Surfactant-based Consumer Products*. **Toxicology in Vitro**, v.13, p.231±239, 1999.
4. WELSS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRODER, K. R. *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models*. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p.231–243, 2004.
5. EFFENDY, I.; MAIBACH, H.I. *Detergent and Skin Irritation*. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.15-21, 1996.
6. HALL-MANNING T. J.; HOLLAND, G. H.; RENNIE2, G.; REVELL, P.; HINES, J.; BARRATT, M. D.; BASKETTER, D. A. *Skin Irritation Potential of Mixed Surfactant Systems*. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 233±238, 1998.
7. FROSCH, P.J. *Irritancy of soaps and detergents bars*, em “**Principles of cosmetics for the dermatologist**”, editado por P. Frost e S. N. Horwitz, The C.V. Mosby Company, p.5-15, 1982.
8. KORTING, H.C.; BRAUN-FALCO, O. *The Effect of Detergents on Skin pH and Its Consequences*. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.23-27, 1996.
9. WALSH, J.; ROSSON, G. *Syndet – A Skyn friendly alternative to soap*. **Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide**, p. 240-244, 2000.
10. GHAIM, J. B.; VOLZ, E. D. *Skin Cleansing Bars*. In *Handbook of Cosmetic Science and Technology*; BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H. I., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2001.
11. SUBRAMANYAN, K.; HAWKINS, S.; JOHNSON, A. *Cosmetic Benefits of Mild Cleansing Syndet Bars Versus Soap*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, p.88, 2005.
12. INFANTE, M.R.; PINAZO, A.; SEGUER, J. *Non-conventional Surfactants from Amino Acids and Glycolipids” Structure, Preparation and Properties*. *Colloids Surfaces A. Physicochem. Eng Aspects* v. 123 124 p.49 70, 1997.
13. TABOHASHI, T.; TOBITA, K.; SAKAMOTO, K.; KOUCHI, J.; YOKOYAMA, S.; SAKAI, H.; ABE, M. *Solution properties of amino acid-type new surfactant*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.20, p. 79–86, 2001.
14. VAN ROOSMALEN, M.J.E.; WOERLEE, G.F.; WITKAMP, G.J. *Amino acid based surfactants for dry-cleaning with high-pressure carbon dioxide*. **J. of Supercritical Fluids**, v.32, p. 243–254, 2004.
15. MOREN, A.K.; KHAN, A. *Phase Behavior and Phase Structure of Protein–Surfactant–Water Systems*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.218, p. 397–403, 1999.
16. GONZALEZ-PEREZ, A.; RUSO, J.M.; PRIETO, G.; SARMIENTO, F. *Physicochemical study of ovalbumin in the presence of sodium dodecyl sulphate in aqueous media*. **Colloid Polym Sci**, v. 282: p. 351–356, 2004.
17. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos*, maio, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>. Acesso em: 09 de janeiro de 2007.
18. BREUER, M.M. **Cosmetic Science**. New York: Academic Press, p.334-338, 1978.
19. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acesso em: 24 de novembro de 2006.