



A TECNOLOGIA DO PLASMA NO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE

Anelise L.V. Cubas^{a*}, Marina M. Machado^{a,b}, Elisa Helena S. Moecke^{a,c}, Tailini Lemes^a, João Marco K. Gelsleichter^a, Carlos Roberto de Oliveira Júnior^a, Kauan Santos Barcelos^a, Júlio Ramos dos Santos^a.

^a*Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), Palhoça, SC, Brasil, CEP 80137270.*

^b*Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88040900.*

^c*Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88034001.*

RESUMO

Melasma é uma doença dermatológica comum, caracterizada por máculas acastanhadas, mais ou menos escuras, simétricas de contornos irregulares, nas áreas fotoexpostas, especialmente, face, fronte, têmporas e que gera grande impacto na qualidade de vida dos pacientes. Movimenta grandes esforços da pesquisa no desenvolvimento de tratamentos, porém o conhecimento relacionado a sua fisiopatogenia ainda é muito restrito. O alvo para inibição do melasma é a enzima tirosinase, o regulador chave da produção de melanina. Os processos que utilizam jato de plasma, também são conhecidos como plasma frio e são denominados como um gás ionizado parcialmente, no qual a energia média dos elétrons é consideravelmente mais elevada do que a dos íons e moléculas de gás. Neste estudo foi utilizada a enzima tirosinase que foi extraída do cogumelo - *Agaricus bisporus* conhecido vulgarmente como cogumelo Paris ou champignon que é uma fonte rica em tirosinase. Resultados experimentais revelaram que o plasma diminuiu consideravelmente a síntese de melanina e inibiu a atividade da tirosinase de acordo com o tempo de exposição. Foram utilizados os tempos de 10, 15 e 20 minutos e o melhor resultado deu-se no tempo de 20 minutos onde houve uma redução de 39,58% na ativação da enzima tirosinase.

Palavras-chaves: plasma frio, melasma, tirosinase

ABSTRACT

Melasma is a common skin disease characterized by stains brownish, more or less dark, symmetrical with irregular borders, in sun-exposed areas, especially the face, forehead, temples and generates major impact on quality of life of patients, moves large research efforts in developing treatments. but knowledge related to its pathogenesis is still very restricted. The target for inhibition of the enzyme tyrosinase in melasma is the key regulator of melanin production. The processes that use plasma jet are also known as cold plasma and are referred to as a partially ionized gas in which the average energy of the electrons is considerably higher than that of the ions and gas molecules. Energy

produced for generating the cold plasma is very small and is proportional to the increase in temperature is near 25 ° C. In this study we used the enzyme tyrosinase which was extracted from the mushroom - *Agaricus bisporus* mushroom commonly known as Paris or champignon which is a rich source of tyrosinase. Experimental results revealed that the plasma decreased the melanin synthesis and tyrosinase activity inhibited according to the exposure time. The times used, 10, 15 and 20 minutes and gave the best results at the 20 minute time where there was a 39.58% reduction in activation of the enzyme tyrosinase.

Keywords: plasma jet, melasma, tyrosinase

INTRODUÇÃO

Muitas são as insatisfações do ser humano em relação a seu corpo, e sua aparência. Há muitos anos, procura-se desenvolver métodos para alterar nossas características naturais da pele assim como as que vamos adquirindo com o tempo. A cor da pele é uma dessas características que tentamos alterar. A coloração da pele e dos cabelos é determinada pela composição de fatores como vascularização, quantidade de carotenos e, principalmente, pelo nível de melanina presente, sofrendo influência de fatores genéticos e raciais, hormonais e fatores externos, como a radiação ultravioleta (Su, 1999; Steiner, 1996).

Muitas dessas características são determinadas pela enzima da tirosina presente na pele humana. Quando ocorre a exposição do sol excessiva transcorre simultaneamente o aumento da atividade da tirosinase ocasionando assim as manchas da pele que conhecemos como o melasma, fazendo assim ocorrer uma alteração na tonalidade da pele. Conforme CARDOSO, Erica de Tássia Carvalho apresenta em seu artigo “Inibição da atividade da Tirosinase por análogos do ácido Kójico”

“A tirosinase é conhecida como a “enzima chave” da biossíntese da melanina, pigmento que confere a cor ao cabelo, a pele e aos olhos e que exerce uma função fundamental na proteção da pele contra os raios UV”. Porém o melasma ocorre devido ao contato excessivo da pele humana com o sol, podendo ocorrer por outros diversos motivos, segundo Steiner, 2009: “Embora a etiologia e a patogênese do melasma não estejam completamente esclarecidas, existem vários fatores implicados. Em 30% dos casos, a ocorrência familiar sugere predisposição genética”.

Muitos compostos inibidores e ativadores da tirosinase têm se tornado cada vez mais importantes em produtos medicinais e cosméticos. Por exemplo, os inibidores da tirosinase são usados em medicamentos e cosméticos clareadores, ao passo que os

compostos que tendem a aumentar a melanogênese, como ativadores de tirosinase podem proteger a pele humana contra o dano da radiação UV solar (Okombi et al, 2006). A importância deste tratamento se torna cada vez mais necessário devido a alguns estudos psicológicos informando que o estado psicológico do paciente afeta diretamente em seu tratamento.

Nos últimos anos, a tecnologia de plasma tem sido utilizada para tratar células vivas e tecidos, incluindo a proliferação de células, separação celular, a ligação de células, apoptose celular, a necrose celular, coagulação do sangue, cicatrização de feridas e terapia de tumores (Daeschlein et al., 2012; Kalghatgi et al., 2010; Fridman et al., 2007). Um dos processos que se emprega o plasma, é conhecido como plasma frio. Este é designado como um gás ionizado parcialmente, no qual a energia média dos elétrons é consideravelmente mais elevada do que a dos íons e moléculas de gás. A energia produzida para gerar o plasma frio é muito pequena sendo proporcional ao aumento da temperatura que fica próxima a 25°C. A descarga é formada através da aplicação de um campo elétrico intenso, o que provoca a formação de auto-propagação eletrônica dentro do volume de gás (Grothaus, 1996). Partindo deste pressuposto temos neste trabalho o intuito de averiguar o efeito do mecanismo da tecnologia do plasma no seguimento de inativação da atividade da tirosinase.

METODOLOGIA

Na pesquisa utilizamos a enzima do cogumelo *AgaricusBisporus*, a enzima extraída desde cogumelo é a mais semelhante a dos mamíferos. Para extração da enzima utilizamos 250 g do corpo de frutificação com 500 ml de Acetona. A mistura é filtrada a vácuo e posteriormente levada ao congelador pelo período de 24h.

Em seguida a mistura é ressuspensa com 40 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6 e novamente é levado ao congelador pelo período de 24h. Subsequente a isso o resíduo é centrifugado a temperatura ambiente em 4000 rpm durante 10 minutos por duas vezes subsequente. A partir deste momento a centrifuga resulta em um sobrenadante, que é o extrato enzimático em questão. Para que o extrato mantenha suas propriedades armazenamos o mesmo isolado da luz em um refrigerador doméstico.

A análise da enzima se dá através da utilização da tecnologia do plasma. Dissolvemos 2,7g de L- Tirosina com 75ml de água destilada. Assim como dissolvemos 3 ml do extrato adquirido com 30 ml de água destilada. A partir deste momento utilizamos, 4,5 ml da solução de L-Tirosina com 16,5 ml de solução tampão, mais, 3 ml

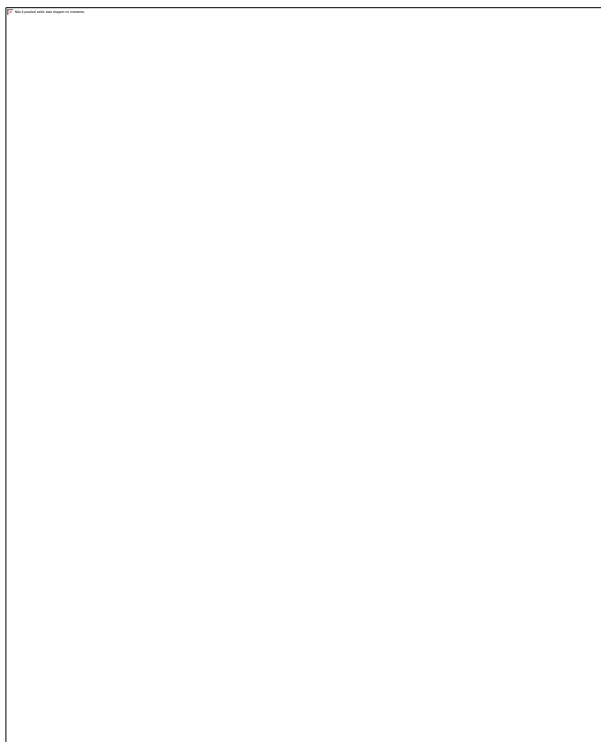
de extrato enzimático para passar no plasma e assim fazer a análise do resultado final. A análise é feita no espectrofotômetro durante uma hora, sendo analisada de 5 em 5 min.

São analisadas 2 amostras uma sem a ação do plasma e uma com a ação de 10 minutos consecutivos no plasma. Acreditávamos que a inibição da L-Tirosina aconteceria a partir da utilização do plasma, porém, nas primeiras análises esta metodologia ainda não alcançamos o resultado esperado.

O reator de plasma consiste em um cilindro de vidro e de geometria ponta-plano em relação aos eletrodos metálicos. Suas bases de suporte são compostas de tampas de teflon devido a sua baixa reatividade química. O eletrodo superior (cátodo) é ligado à fonte de alta tensão, já o inferior (ânodo) consiste em uma placa metálica condutora. No espaçamento entre os dois eletrodos ocorrem as descargas elétricas. A solução da mistura enzima-substrato é inserida no interior do reator de plasma para que o processo de tratamento seja iniciado.

O gás argônio como gás veículo, flui pelo tubo de quartzo a partir da entrada a uma velocidade controlável (entre 3 a 5 L/min), desta forma, um jato de plasma atmosférico é gerado em torno da saída do cilindro de vidro, sendo que o jato de plasma é apenas em contato com o líquido na superfície (Figura 1).

Figura 1. Esquema do tratamento da mistura enzima-substrato no reator de plasma.



A mistura enzima-substrato de volumes iguais (25 mL) foram submetidos ao tratamento por plasma em tempos de 10, 15 e minutos, sob agitação em agitador magnético (Figura 1). Também foram preparadas três amostras em iguais proporções, as quais não foram submetidas ao tratamento por plasma, para que fosse possível verificar a realização da atividade da enzima tirosinase, bem como comparação com as amostras submetidas ao processo de tratamento por plasma,

Após a aplicação do plasma nas amostras, as mesmas repousavam por um período de 15 minutos para serem submetidas a análise de espectrofotometria UV-Visível.

A atividade da tirosinase foi determinada por espectrofotometria UV-Visível (Hitachi U-2001), conforme descrito por Khatib (2005) com adaptações para atendimento do objetivo. A absorção a 280nm foi monitorada em função do tempo. As amostras submetidas as análises foram diluídas numa proporção de 1:10.

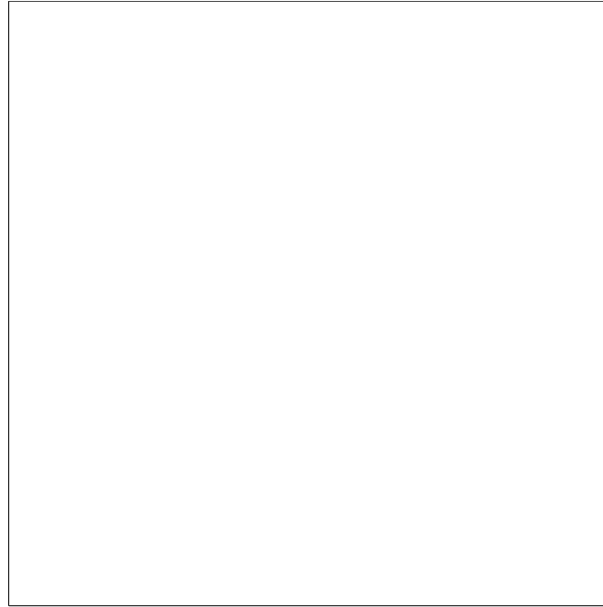
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da análise por espectrofotometria UV-Visível das amostras da mistura enzima-substrato de volumes iguais (25 mL) é apresentada na Tabela 01, onde se pode observar o comportamento das amostras com a exposição ou não ao reator plasmático (Figura 02).

Tabela 01. Resultados da inativação da enzima tirosinase por tratamento a plasma nos tempos de 10, 15 e 20 minutos.

Amostra	Tempo (min)	Aplicação do tratamento por plasma	Absorbância (Média)	Redução (%)
Amostra 1	10	SIM	0,571	7,45
		NÃO	0,617	
Amostra 2	15	SIM	0,520	37,65
		NÃO	0,834	
Amostra 3	20	SIM	0,412	39,58
		NÃO	0,682	

Figura 2. Amostra de enzima-substrato aplicadas ao tratamento por plasma.



Após a aplicação das amostras da mistura enzima-substrato de volumes iguais (25 mL) ao reator plasmático é notadamente observada a reação da enzima tirosinase ao substrato (L-tirosina), sendo que as amostras clarificadas não foram alteração de cor, e portanto, percebe-se a inativação da enzima tirosinase (Figura 3, 4 e 5).

Figura 3. Amostra de enzima-substrato antes e após aplicação do tratamento por plasma (10 minutos) (esquerda), comparada com a amostra não submetida ao tratamento por plasma (direita).

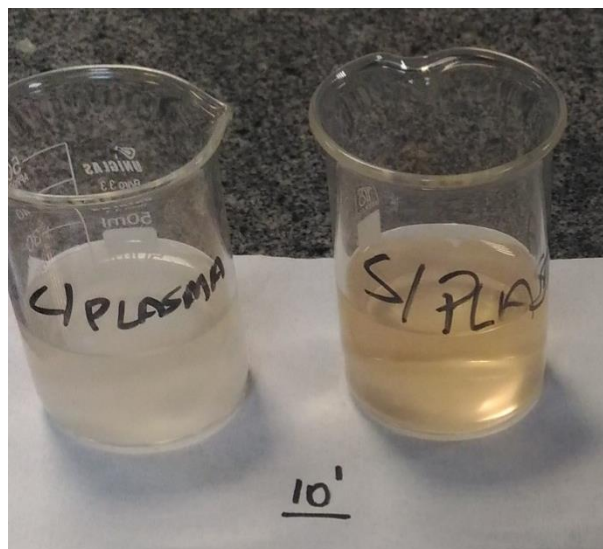


Figura 4. Amostra de enzima-substrato antes e após aplicação do tratamento por plasma (24 horas) (direita), comparada com a amostra não submetida ao tratamento por plasma (esquerda).

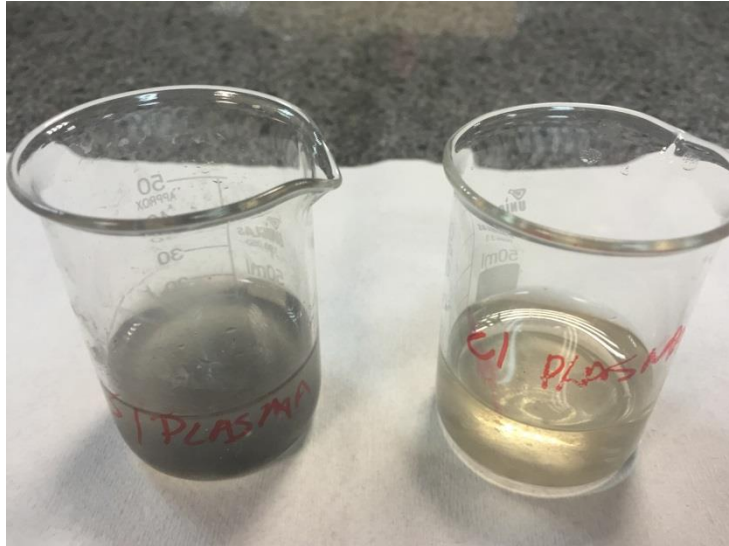
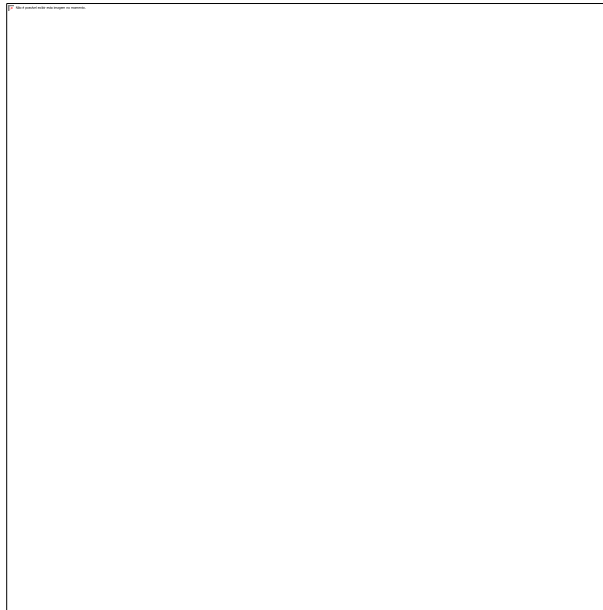


Figura 5. Amostras de enzima-substrato antes e após aplicação do tratamento por plasma (10, 15 e 20 minutos) (esquerda), comparadas com as amostras não submetidas ao tratamento por plasma (direita).



O substrato escolhido para este trabalho foi a L-tirosina, que é um aminoácido não-essencial. As amostras foram submetidas ao tratamento por plasma para que fosse possível verificar a realização da atividade da enzima tirosinase, bem como comparação com as amostras não submetidas ao processo de tratamento por plasma. Após a aplicação do plasma nas amostras, as mesmas repousavam por um período de 15 minutos para serem submetidas a análise de espectrofotometria UV-Visível. A tabela 1

demonstra a ativação e a inativação da enzima tirosinase nos tempos de 10, 15 e 20 minutos. As leituras eram feitas de minuto em minuto, sendo o tempo controlado com o auxílio de um cronômetro. O melhor resultado deu-se no tempo de 20 minutos onde houve uma redução de 39,58% na ativação da enzima tirosinase.

Os resultados mostram que com o aumento do tempo de permanência das amostras ao reator de plasma, os valores dos três indicadores diminuíram gradualmente em comparação com os do grupo de controle. Os três valores de absorbância em comparação ao tempo de exposição ao reator de plasma foram: 0,571 – 10 min., 0,520 – 15 min e 0,412 – 20 min são todos menores.

CONCLUSÃO

A tirosinase é uma enzima que desempenha um papel fundamental na produção de melanina , em primeiro lugar, por catalisar a hidroxilação da tirosina em dopa , e em segundo lugar , catalisando a oxidação de DOPA a dopaquinona. Os resultados experimentais indicam que tratamento diminui significativamente a atividade da tirosinase de uma forma proporcional ao tempo de exposição ao plasma. Sendo que o teor de melanina, e atividade da tirosinase está intimamente relacionado com o melasma pois a síntese de melanina é regulada pela enzima tirosinase. Talvez em futuros estudos seja possível a aplicação na pele humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AnserAli; ZamanAshraf; NareshKumar; Muhammad Rafiq; FarukhJabeen; Ji Hoon Park; Ki Hong Choi; SeungHyun Lee; Sung-YumSeo; Eun Ha Choi; PankajAttri: Influenceof plasma-activatedcompoundsonmelanogenesisandtyrosinaseactivity. 2015 CHANG, TE-SHENG. AnUpdatedReviewofTyrosinaseInhibitors. InternationalJournalof Molecular Sciences, v. 10, p.2440-2475, 2009.

DAESCHLEIN, G.; SCHOLZ, S.; AHMED, R.; WOEDTKE, T. V.; HAASE, H.; NIGGEMEIER, M.; KINDEL, E.; BRANDENBURG, R.; WELTMANN, K-. D.; JUENGER, M. J. Hosp. Infect. 2012, 81, 177.

FRIDMAN, G.; SHERESHEVSKY, A.; JOST, M.; BROOKS, A.; FRIDMAN, A.; GUTSOL, A.; VASILETS, V.; FRIEDMAN, G. Plasma Chem. Plasma Process. 2007, 27, 163.

Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB et al. BiologyofMelanocytes. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine. v. 1. New York: Mcgraw-Hill; 1999. p.192-220.

KALGHATGI, S. U.; FRIDMAN, A.; FRIEDMAN, G.; CLYNE, A. M. *Ann. Biomed. Eng.* 2010, 38, 748.

MATSUI, Y; SUGIYAMA, K; KAMEI, M; TAKAHASHI, T; SUZUKI, T; KATAGATA, Y; ITO, T., 2010. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amount of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. *J Agric Food Chem* 58:11112–11118.

Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol.* 2006;2:567-78.

Xing-Min Shi, Zheng-Shi Chang, Xi-Li Wu, Guan-Jun Zhang, Zhao-Yu Peng, Zhuo-Yuan Dong, Xian-Jun Shao Inactivation Effect of Argon Atmospheric Pressure Low-Temperature Plasma Jet on Murine Melanoma Cells. 2013.