



Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, citotóxica e cicatrizante de extratos de origem natural

Rafaela Baldassari Silvestre¹; Fernanda Borges de Almeida¹; Mariana da Silva Martins¹; Daniel Weingart Barreto²; Vera Isaac¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP)

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Palavras-chave

Antioxidante;
Citotoxicidade;
Cicatrização;
in vitro;

Extratos naturais

Keywords

Antioxidant;
Cytotoxicity;
Wound healing;
in vitro;
Natural extracts

Resumo: Devido à crescente preocupação com o estilo de vida sustentável, produtos de origem natural estão ganhando mais espaço no mercado. Cosméticos a base de derivados vegetais recebem o nome de fitocosméticos e, para possibilitar seu uso, é necessário garantir sua segurança e eficácia. Em vista disso, o presente trabalho avaliou a atividade antioxidante, citotóxica e cicatrizante *in vitro* dos extratos de *Stryphnodendron adstringens*, *Centella asiatica* e HYPKIN®. Foi realizada a quantificação do Teor de Compostos Fenólicos Totais com a metodologia do Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi determinada frente aos radicais DPPH° e ABTS°+. Foram utilizadas as linhagens HDFa, HaCat e HepG2 para a citotoxicidade (MTT), e as linhagens HDFa e HaCat para a cicatrização. O extrato HYPKIN®, nas concentrações testadas, não possui compostos fenólicos e não apresentou atividade antioxidante. O extrato de *S. adstringens* possui 44,23±0,68 µg de CFEAG/100 µg, apresentou um EC50 de 3,93 µg/mL frente ao DPPH° e de 1,88 µg/mL equivalente a 1000 µM de Trolox frente ao ABTS°+. Os IC50 nas linhagens HaCat, HDFa e HepG2, foram de 0,1036±0,0312 mg/ml, 0,1974±0,0439 mg/mL e 0,1084±0,006 mg/mL, respectivamente. O extrato de *C. asiatica* possui 4,36±0,42 µg de CFEAG/100 µg de extrato, com o EC50 de 61,82 µg/mL frente ao DPPH° e de 38,1 µg/mL equivalente a 1000 µM de Trolox frente ao ABTS°+. Os IC50 nas linhagens HaCat, HDFa e HepG2 foram de 0,5590±0,1043 mg/mL, 0,4797±0,0367 mg/mL e 0,4675±0,0677 mg/ml, respectivamente. Os três extratos apresentaram atividade cicatrizante frente à linhagem HDFa.

Abstract: Due the increasing concern for sustainable lifestyle, products of natural origin are gaining greater prominence in the market. Cosmetics based on plant derivatives are referred to as phytocosmetics and, to enable their use, it is necessary to guarantee their safety and efficacy. In this regard, the present study evaluated the antioxidant, cytotoxic and the wound healing *in vitro* activities of *Stryphnodendron adstringens*, *Centella asiatica* and HYPKIN® extracts. The Total Phenolic Compounds Content quantification was performed using the Folin-Ciocalteu methodology and the antioxidant activity was determined with DPPH° and ABTS°+ radicals. The cell lines HDFa, HaCat and HepG2 were used for cytotoxicity assay (MTT), whereas HDFa and HaCat cell lines were applied in the wound healing assay. The HYPKIN® extract, at the concentrations tested, doesn't contain phenolic compounds and didn't show antioxidant activity. The *S. adstringens* extract contains 44.23±0.68 µg of CFEAG/100 µg, presenting an EC50 of 3.93 µg/mL for DPPH° and 1.88 µg/mL equivalent to 1000 µM of Trolox for ABTS°+. The IC50 for HaCat, HDFa and HepG2 were 0.1036±0.0312 mg/mL, 0.1974±0.0439 mg/mL and 0.1084±0.006 mg/mL, respectively. The *C. asiatica* extract contains 4.36±0.42 µg of CFEAG/100 µg of extract, with EC50 of 61.82 µg/mL for DPPH° and 38.1 µg/mL equivalent to 1000 µM of Trolox for ABTS°+. The IC50 for HaCat, HDFa and HepG2 were 0.5590±0.1043 mg/mL, 0.4797±0.0367 mg/mL and 0.4675±0.0677 mg/ml, respectively. The three extracts demonstrated healing activity in HDFa cell line.



Introdução

Fitocosméticos

A dependência humana da biodiversidade para a obtenção de alimentos, cosméticos e materiais com a utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é datada desde à antiguidade (SOUZA et al., 2007). A crescente valorização de práticas sustentáveis pelos consumidores tem incentivado a indústria a investir no desenvolvimento de produtos que conciliem dimensões econômicas, sociais e ambientais (FERRO et al., 2006). Nos últimos anos, o mercado de produtos naturais cresceu de 8 a 25%, enquanto o de produtos sintéticos cresceu de 3 a 10% (MIGUEL, 2011). O Brasil, detentor de 15 a 20% da biodiversidade mundial, favorece a preferência por produtos naturais, no qual a utilização de plantas medicinais faz parte da cultura brasileira devido sua acessibilidade e baixo custo (BRAGA E DA SILVA, 2021). Na indústria cosmética, o aumento da longevidade e a preocupação com a qualidade de vida têm impulsionado o uso de extratos vegetais e substâncias ativas isoladas. Alguns exemplos são o açaí e o guaraná, ricos em vitaminas e compostos bioativos, utilizados em produtos antioxidantes e antienvhecimento (DELFINO, 2024).

***Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville**

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville, conhecido como barbatimão, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro rica em taninos, flavonoides, terpenos e alcaloides, na qual é utilizada tradicionalmente como antisséptico, antimicrobiano e cicatrizante (SOUZA-MOREIRA et al., 2018), com estudos que comprovam suas propriedades anti-inflamatória, antiulcerogênica, cicatrizante, antioxidante, antimutagênica e antiviral (RIBEIRO et al., 2022). O barbatimão integra a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS devido à sua eficácia e baixa toxicidade, sendo usada em pomadas e cremes (PELLENZ et al., 2018).

***Centella asiatica* (L.) Urb**

A *Centella asiatica* é uma planta tradicional na medicina ayurvédica para tratar asma, úlceras, eczemas e distúrbios psicológicos, e é empregada empiricamente como antipirético, diurético, antibacteriano, antiviral e cicatrizante (BYLKA et al., 2013). Na medicina convencional, é usada em pomadas, comprimidos, soluções e preparos homeopáticos, tendo como principais compostos ativos os triterpenos (ácido asiático, ácido madecásico e asiaticosídeo) e os flavonoides, que estimulam a cicatrização e reduzem a inflamação por meio do aumento de colágeno e proliferação de fibroblastos (ARORA et al., 2018). É utilizada em produtos como o Madecassol®, que demonstram eficácia na prevenção de estrias em mulheres grávidas (BYLKA et al., 2013).

HYPKIN®

As algas marinhas têm ganhado destaque devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunoestimulantes, antimicrobianas e antitumorais (AFONSO, 2021), sendo os polifenóis, flavonoides, carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados, ácido fólico e ácido ascórbico, os responsáveis por essas propriedades (ORTIZ-VIEDMA, 2021). O extrato HYPKIN®, desenvolvido pela ASSESSA, é obtido das algas das classes Rhodophyceae (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas pardas), sendo um bioativo multifuncional comprovadamente benéfico para a integridade, regeneração e saúde da pele (ASSESSA, 2021).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, originários do metabolismo secundário das espécies vegetais, são constituídos pelos flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, fenóis simples, ligninas e cumarinas (ROCHA, 2021). Suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiproliferativas, têm atraído a atenção científica, sendo potenciais aliados no combate de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (RAHMAN et al., 2021). Na cosmética, destacam-se por melhorarem a hidratação e elasticidade da pele, por serem coadjuvantes na fotoproteção solar e suas propriedades antienvhecimento e antioxidantes (CHERUBIM et al., 2020). Os antioxidantes são responsáveis por retardarem ou inibirem a oxidação nos organismos, sendo essenciais no combate aos radicais livres, que, quando produzidos em excesso, podem causar estresse oxidativo, doenças, envelhecimento precoce e podem danificar moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos no reparo tecidual, dificultando a cicatrização (RAHMAN et al., 2021).

É importante ressaltar que a quantidade de metabolitos secundários pode variar conforme a estação do ano e as condições ambientais, como umidade, composição do solo, temperatura e estresse hídrico, afetando os níveis de compostos fenólicos (SANTOS et al., 2006). Portanto, estudos contínuos sobre as espécies são essenciais para aprofundar o conhecimento sobre sua constituição química e efeitos farmacológicos, possibilitando o desenvolvimento de produtos (SOUZA-MOREIRA et al., 2018).

Cicatrização

O processo de cicatrização envolve interações complexas e é dividido em inflamação, proliferação e remodelação. Na fase de inflamação, células como monócitos e neutrófilos são recrutadas, ativando a cascata de coagulação com o recrutamento de fibrina, resultando em sinais de calor, rubor e dor. Na fase proliferativa, fibroblastos produzem colágeno e elastina para sintetizar a matriz e promover a reepitelização. Na fase de remodelação, o colágeno previamente produzido é organizado e depositado (SANTANA, 2021). Na indústria cosmética, há uma constante busca por novos produtos com ativos cicatrizantes, como, por exemplo, para o tratamento de estrias, que são lesões cutâneas na camada dérmica que resultam em cicatrizes lineares visíveis devido ao rompimento das fibras colágenas e elásticas (PINHEIRO E DE SOUZA, 2021).

Citotoxicidade

Mesmo que a utilização de espécies vegetais possa apresentar inúmeras vantagens, é necessário ter cautela em sua utilização, pois as espécies podem proporcionar efeitos adversos, como, por exemplo, a toxicidade, sendo uma preocupação para a saúde pública, visto que, no Brasil, muitas espécies vegetais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação científica, mostrando a importância da realização de novos estudos ressaltando a necessidade de ensaios para garantir a segurança e a efetividade (JUNIOR E PINTO, 2005).

A indústria cosmética tem substituído ensaios em animais por experimentos *in vitro*, como os de cultivo celular, permitindo a análise do comportamento das células em ambientes controlados (CHIARI, 2011). Assim, ao associar o conhecimento tradicional sobre espécies ve-

getais medicinais com pesquisas científicas, há uma potencialização no desenvolvimento de produtos, o que torna possível garantir a segurança e eficácia de um composto, estabelecendo seus efeitos terapêuticos e adversos, além de padronizar sua composição, permitindo o uso seguro pela população (MIGUEL, 2011). Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, citotóxica e cicatrizante dos extratos de *S. adstringens* (Mart.) Coville e de *C. asiatica* (L.) Urb., fornecidos pela empresa Schraiber, e o HYPKIN®, fornecido em parceria com a empresa ASSESSA.

Metodologia

Quantificação do Teor de Compostos Fenólicos

Para a quantificação do Teor de Compostos Fenólicos, foi utilizada a metodologia que emprega o reagente Folin-Ciocalteu, com modificações, na qual 0,5 mL da amostra de cada extrato, ou do solvente (branco), foram adicionadas à 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada (1:10) e deixados em repouso durante 8 minutos, ao abrigo de luz. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (4%) e deixados em repouso por 2 horas, também ao abrigo de luz. A leitura da absorbância foi feita a 740 nm, em espectrofotômetro. Foi feita uma curva analítica de ácido gálico nas concentrações variando de 10 a 100 µg/mL (SINGLETON, 1965) e o teor de compostos fenólicos totais foi calculado a partir da equação da reta da curva analítica do ácido gálico. Os resultados foram expressos em µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico em 100 µg ou 100 mg de extrato. A concentração do extrato de *S. adstringens* utilizada foi de 10 µg/mL, a do extrato de *C. asiatica* de 150 µg/mL e a do HYPKIN® de 10 mg/mL.

Avaliação da atividade antioxidante

Ensaio do radical DPPH°

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada frente à captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH°), utilizando a metodologia da EMBRAPA com modificações (RUFINO et al, 2007).

A solução do radical DPPH° foi preparada na concentração de 0,024 mg/mL em álcool metílico para a construção de uma curva analítica em concentrações de 10 µM a 60 µM. Em seguida, ao abrigo de luz, uma alíquota de 0,1 mL das diferentes concentrações das amostras foi transferida para um tubo de ensaio junto a 3,9 mL da solução do radical DPPH°, sendo homogeneizados e colocados, em repouso, durante 30 minutos. Após esse tempo, foi realizada a leitura das absorbâncias por meio de espectrofotometria no comprimento de onda de 515 nm (RUFINO et al., 2007). As concentrações do extrato de *S. adstringens* foram de 1 a 6 µg/mL, do extrato de *C. asiatica* de 5 a 120 µg/mL e do HYPKIN® de 1 a 10 mg/mL. Para o cálculo do EC50 utilizou-se a equação da reta obtida a partir das absorbâncias medidas, substituindo o valor de "y" pela absorbância correspondente a 50% da concentração do radical DPPH°.

Ensaio do radical ABTS^{o+}

Para a obtenção da solução do radical livre do ABTS^{o+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), foram adicionados 5 mL da solução estoque do radical ABTS^{o+} (7 mM), preparada na concentração de 3,84 mg/mL, em água destilada, junto a 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM), preparada na concentração de 37,84 mg/mL, em água destilada. Essa solução foi deixada em repouso, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, por 16 horas. Após esse tempo, a solução do radical livre foi solubilizada em álcool etílico absoluto até a obtenção de uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$, a 734 nm no espectrofotômetro. Em seguida, 30 µL das soluções das amostras em diferentes concentrações foram adicionadas a 3 mL do radical ABTS^{o+} recém obtido. Foi feita uma pausa de 6 minutos e as absorbâncias das amostras foram lidas a 734 nm. O Trolox foi utilizado como padrão para o experimento, sendo construída uma curva com concentrações variando de 100 a 2.000 µM. O ensaio foi realizado em triplicata com cinco concentrações diferentes, variando de 0,25 a 4 µg/mL para o *S. adstringens*, de 5 a 80 µg/mL para a *C. asiatica* e de 2 a 10 mg/mL para o HYPKIN[®]. O cálculo da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox do extrato foi realizado pela equação da reta, sendo o "y" substituído pelo valor da absorbância encontrada na concentração de 1000 µM de Trolox. Em seguida, o resultado encontrado foi dividido por 1000, obtendo-se o valor em mg, sendo expresso em µM Trolox/mg do extrato.

Avaliação da Citotoxicidade Ensaio com o corante MTT

O ensaio colorimétrico do corante Metiltetrazolium, MTT, foi realizado de acordo com as normas da ISO (2009) com modificações, utilizando as células de fibroblastos humanos (HDFa), queratinócitos humanos (HaCat) e hepatocarcinoma humano (HepG2).

Em uma microplaca de 96 poços foram semeados 100 µL de suspensão celular na concentração de 1×10^5 células/mL, sendo incubada na estufa a 37 °C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, foram adicionados os tratamentos das amostras em diferentes concentrações e os controles negativo (meio DMEM a 5%) e o positivo (DMSO a 10%), sendo a microplaca incubada por mais 24 horas na estufa. No último dia, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (1 mg/mL em PBS) em cada poço, ficando em repouso, na estufa, por 2 horas. Após esse tempo, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico para completa solubilização dos cristais de formazana. As absorbâncias foram avaliadas em espectrofotômetro com leitor de microplacas. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicatas independentes.

As concentrações foram ajustadas por meio de ensaios pilotos e dos resultados dos ensaios de atividade antioxidante, sendo de 0,0125 a 0,4 mg/mL para o extrato de *S. adstringens* e de 0,03125 a 1 mg/mL para a *C. asiatica*. Com o uso do programa GraphPad Prism (versão 5.01), por meio de uma curva de regressão não linear, utilizando a concentração (log) versus a porcentagem de células viáveis, foram calculadas as concentrações que inibem 50% (IC50) e 30% (IC30) da viabilidade celular, que correspondem ao valor máximo aceito para a concentração não ser considerada citotóxica. Os valores da viabilidade celular foram relatados como média \pm desvio padrão (DP).

Ensaio de cicatrização

O ensaio de cicatrização foi realizado pela metodologia descrita por Walter e colaboradores, com modificações (WALTER et al, 2010).

Em uma placa de 24 poços, foram adicionados 500 µL de uma solução de colágeno Tipo 1, em uma concentração de 0,2 mg/mL, sendo incubada pelo período de 2 horas, a 37 °C, na estufa. Após esse tempo, a solução foi retirada e os poços foram lavados com 500 µL de PBS. Na sequência, foi adicionado 1 mL de suspensão celular, em uma concentração de 1.10^5 células/mL, sendo colocada novamente na estufa incubadora e deixada, em repouso, até a monocamada celular atingir a confluência necessária. Na sequência, foi realizado um risco centralizado com o auxílio de uma ponteira de 100 µL para obter o "arranhão" na monocamada celular. O meio foi retirado e os poços foram lavados com 500 µL de PBS, sendo então adicionado 1 mL dos tratamentos e do controle negativo (DMEM 10%). A concentração utilizada dos ativos no ensaio foi estipulada de acordo com o ensaio de citotoxicidade, a partir do cálculo do IC90.

Foram estipulados horários para realizar os registros do fechamento do "arranhão" até o fechamento completo do controle negativo: para a linhagem celular HDFa, no intervalo de 48h e, para a linhagem celular HaCat, no intervalo de 96h. Para a análise das imagens, foi utilizado o *software* ImageJ, sendo definidas três coordenadas y no eixo vertical da imagem, uma na parte superior, uma na parte inferior e uma na parte média do arranhão, para que a medição ocorresse sempre no mesmo ponto. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Resultados e discussão

Quantificação do teor de compostos fenólicos totais

Para a quantificação do teor de compostos fenólicos totais do HYPKIN[®], na concentração de 10 mg/mL, não apresentou valores de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico. Para o extrato do *S. adstringens*, em 10 µg/mL, foi obtido um valor de $44,23 \pm 0,68$ µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 µg do extrato. Para o extrato da *C. asiática*, em 150 µg/mL, foi obtido um valor de $4,36 \pm 0,42$ µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 µg do extrato.

Atividade Antioxidante do radical DPPH[°]

O extrato HYPKIN[®], nas concentrações testadas, apresentou linearidade nas absorvâncias, mostrando não haver atividade antioxidante nestas condições. Para o extrato de *S. adstringens*, o valor de EC50 encontrado foi de 3,93 µg/mL. E, para o extrato de *C. asiática*, o valor de EC50 encontrado foi de 61,82 µg/mL.

Atividade Antioxidante do radical ABTS^{°+}

O extrato HYPKIN[®], nas concentrações testadas, apresentou linearidade nas absorvâncias, mostrando não haver atividade antioxidante nestas condições. Para o extrato de *S. adstringens* foi encontrado o valor de 1,88 µg/mL equivalentes a 1.000 µM de Trolox. E, para o extrato do *C. asiática*, foi encontrado o valor de 38,1 µg/mL equivalentes a 1.000 µM de Trolox.

Os resultados da atividade antioxidante encontrados com o extrato de *S. adstringens* foram semelhantes aos de Silva (2018), com valores do EC50 igual a $5,88 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ para o radical DPPH° e de $2,01 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$ para o radical ABTS°+. Ribeiro et al (2015) testou uma outra espécie do gênero *Stryphnodendron*, por meio da metodologia do radical DPPH° e obteve valores de EC50 de $6,3 \mu\text{g/mL}$. Para o extrato de *C. asiatica*, Rahman e colaboradores (2013) testaram os extratos etanólico 100%, etanólico 50% e o extrato aquoso frente ao DPPH°, obtendo valores de EC50 de $40,4 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$, de $63,4 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ e de $56,3 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, ressaltando que o modo de extração também interfere nos valores dos metabólitos secundários e, por consequência, em sua atividade. Em relação ao extrato HYPKIN®, os presentes resultados corroboram com os encontrados por Ahn et al. (2004), que não obtiveram valores satisfatórios da atividade antioxidante frente ao radical DPPH° em algas pardas da espécie *Scytosiphon lomentaria*; porém. Fujimoto e Kaneda (1980) estudaram 21 espécies de algas marinhas, das quais cerca de 60% apresentaram atividade antioxidante, diferenças que podem ser atribuídas ao tipo de extração dos extratos, a fatores ambientais e de estresse enfrentados pelas espécies, ao método de coleta e, principalmente, às variações intrínsecas entre as espécies analisadas.

A correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante se torna possível, uma vez que os extratos de *S. adstringens* e de *C. asiatica* apresentaram teor de compostos fenólicos em sua composição e uma boa ação antioxidante, e o extrato do HYPKIN®, que não apresentou compostos fenólicos, não apresentou atividade antioxidante.

Avaliação da citotoxicidade

Ensaio com o corante MTT

Os valores de IC50 e IC30 obtidos no ensaio com o corante MTT realizados com as linhagens celulares HaCat, HDFa e HepG2 estão descritos na Tabela 1, sendo expressos com a média de 3 ensaios independentes \pm desvio padrão (DP).

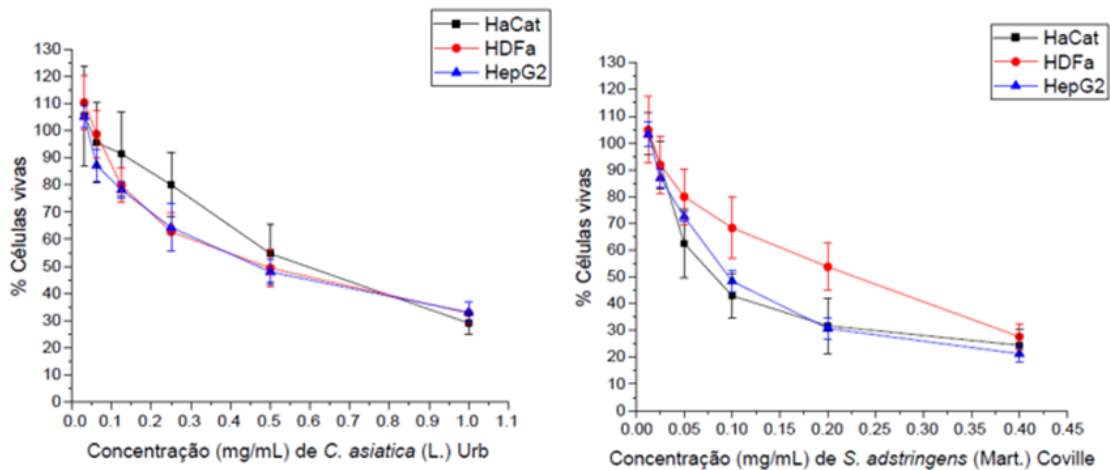
Tabela 1 - Valores de IC50 e IC30 (mg/mL) obtidos nos ensaios de citotoxicidade nas linhagens HaCat, HDFa e HepG2 por meio da metodologia que emprega o corante MTT

	<i>C. asiatica</i>	<i>S. adstringens</i>
IC₅₀ (mg/mL) HaCat	$0,5590 \pm 0,1043$	$0,1036 \pm 0,0312$
IC₃₀ (mg/mL) HaCat	$0,3267 \pm 0,1435$	$0,0515 \pm 0,0123$
IC₅₀ (mg/mL) HDFa	$0,4797 \pm 0,0367$	$0,1974 \pm 0,0439$
IC₃₀ (mg/mL) HDFa	$0,2401 \pm 0,0247$	$0,1005 \pm 0,0324$
IC₅₀ (mg/mL) HepG2	$0,4675 \pm 0,0677$	$0,1084 \pm 0,006$
IC₃₀ (mg/mL) HepG2	$0,2134 \pm 0,0479$	$0,0553 \pm 0,0015$

Fonte: Autores, 2022

As curvas de viabilidade celular estão representadas na Figuras 1, sendo os resultados expressos com a média de 3 ensaios independentes \pm desvio padrão (DP).

Figura 1 - Curva de viabilidade celular de *C. asiatica* e *S. adstringens* nas linhagens HaCat, HDFa e HepG2



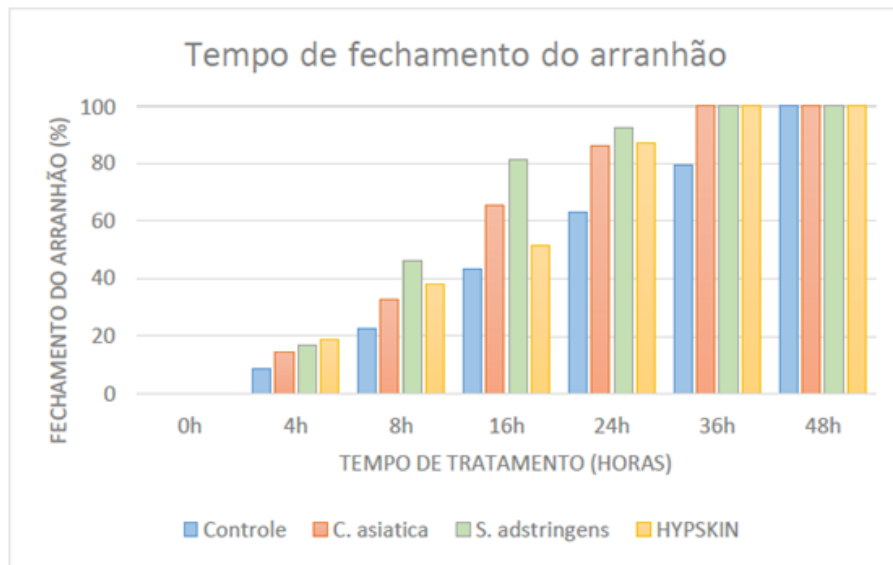
Fonte: Autores, 2022

Souza (2007) encontrou valores próximos aos relatados no presente trabalho para *S. adstringens*, a partir da análise em células de macrófagos da linhagem J774, apresentando valores de citotoxicidade na concentração de 0,156 mg/mL. Pellenz e colaboradores (2018) utilizaram linhagens de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (HFF- 1), constatando que nas concentrações de 0,012 mg/mL, 0,099 a 0,49 mg/mL houve uma ação protetora nos queratinócitos, e nas concentrações de 0,099 a 0,99 mg/mL não houve efeito citotóxico. An e colaboradores (2012) verificaram a ação protetora dose-dependente que o extrato de *C. asiatica* induz contra radiação UVB, sendo que, em baixas doses, o extrato leva à proliferação celular, e, em altas doses, pode gerar morte celular.

Avaliação da Cicatrização

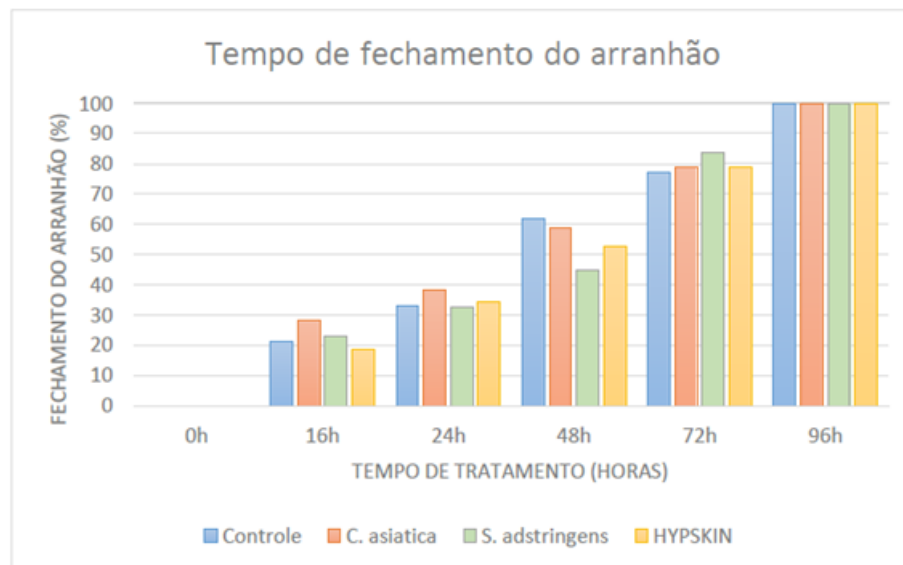
Os ensaios para a avaliação do processo de cicatrização foram realizados com as linhagens celulares HDFa e HaCat. Para o extrato de *C. asiatica* e *S. adstringens*, as concentrações foram definidas a partir do cálculo do IC90 dos ensaios de citotoxicidade, sendo elas, respectivamente 0,1 mg/mL e 0,02 mg/mL. Para o HYPKIN®, a concentração foi fornecida pela empresa, sendo 10 mg/mL. Os resultados estão expressos em unidade arbitrária (UA), junto à média e o desvio padrão de cada tratamento. Foram determinadas as porcentagens do fechamento do arranhão nos tempos estipulados, estando expressos na Figura 2 para a HDFa e na Figura 3 para a HaCat.

Figura 2 - Valores do fechamento do arranhão dos extratos testados em comparação ao controle negativo na linhagem celular HDFa



Fonte: Autores, 2022

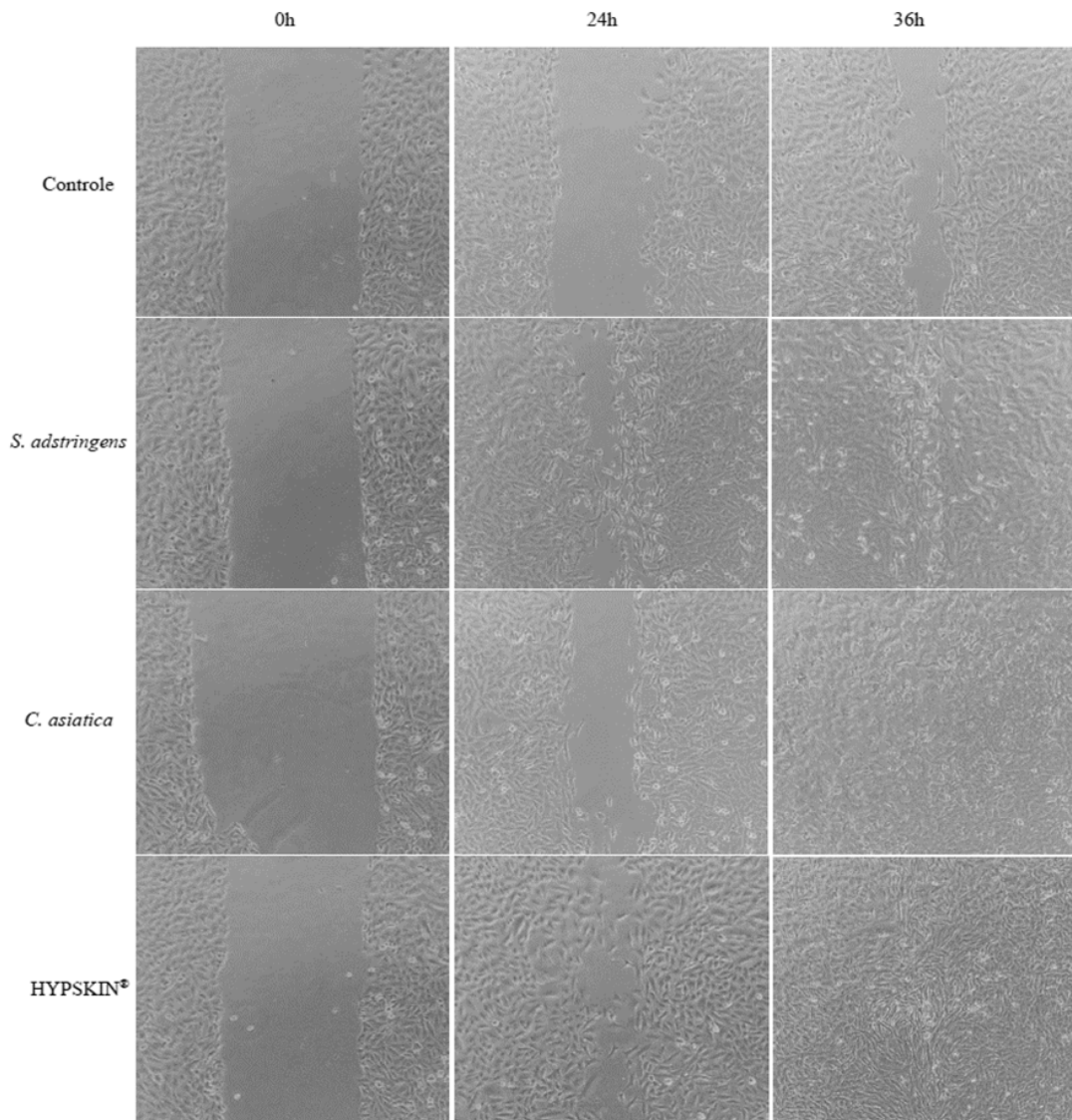
Figura 3 - Valores do fechamento do arranhão dos extratos testados em comparação ao controle negativo na linhagem celular HaCat.



Fonte: Autores, 2022

A partir da análise dos resultados, é possível perceber que, para a linhagem HDFa, todos os extratos apresentaram um fechamento completo dentro de 36 horas de tratamento, enquanto o controle apresentou 79,5% de fechamento nesse período, sendo completo após 48 horas. Já para a linhagem HaCat, é possível perceber que nenhum dos três extratos apresentou diferenças significativas do fechamento do arranhão em relação ao controle negativo, sendo que os quatro tratamentos apresentaram o fechamento de 100% no tempo de 96 horas. Estão representadas na Figura 4 as imagens referentes ao ensaio realizado com a linhagem celular HDFa para o controle negativo e os três extratos.

Figura 4 - Imagens do fechamento do "arranhão" no ensaio de cicatrização do controle negativo, *C. asiatica*, *S. adstringens* e HYPKIN® na linhagem HDFa.



Fonte: Autores, 2022

Para os resultados encontrados no ensaio *in vitro* de cicatrização, Pellenz e colaboradores (2019) analisaram em duas concentrações diferentes o extrato de *S. adstringens*, constatando que ambas promoveram um aumento na taxa de migração de fibroblastos. Alguns autores constataam que o possível mecanismo pelo qual *S. adstringens* estimula a proliferação celular está relacionado ao teor de tanino de sua casca (Trevisan et al., 2020).

Em relação à cicatrização obtida com o extrato de *C. asiatica*, Ribeiro (2016) constatou uma aceleração no processo de reepitelização e migração de queratinócitos *in vitro* e, também, na aceleração da cicatrização em feridas induzidas em ratos, a partir da formulação de um gel contendo o extrato com polissacarídeos sulfatados da alga marinha *C. crenulata*, tendo relação direta com os resultados obtidos pela ação do extrato de HYPKIN®, no ensaio de cicatrização, com as células HDFa.

Além disso, é possível relacionar os valores encontrados entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de *C. asiatica* e de *S. adstringens* com a ação cicatrizante, já que os antioxidantes inibem a formação de radicais livres, diminuindo o dano tecidual causado por eles (PACE, 2006); porém, isso não é uma regra, uma vez que o extrato HYPKIN® não possui compostos fenólicos em sua composição e não apresentou atividade antioxidante frente aos radicais testados, mas demonstrou ser responsável por causar uma aceleração no fechamento do arranhão, em fibroblastos.

Conclusão

Após a análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato HYPKIN®, nas concentrações testadas, não apresentou atividade antioxidante frente aos radicais testados e não possui compostos fenólicos em sua composição; porém, quando submetido aos ensaios de cicatrização in vitro, apresentou resultados relevantes com a linhagem celular HDFa, sendo um indicativo da atividade cicatrizante.

Em relação aos resultados dos extratos de *C. asiatica* e de *S. adstringens*, ambos possuem uma ótima atividade antioxidante e ação cicatrizante frente à linhagem celular HDFa, sendo que a concentração utilizada respeita os limites de citotoxicidade, tornando os extratos alvos de interesse para ensaios complementares, afim de garantir seu uso de modo correto e seguro para o desenvolvimento de produtos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à ASSESSA Indústria Comércio e Exportação LTDA pela doação do extrato HYPKIN, e à Scharaiber Produtos Naturais LDTA pela doação das tinturas de *Centella asiatica* e *Stryphnodendron adstringens*, utilizados no trabalho. Os autores também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida, à Fundação de amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Laboratório de Cosmetologia (LaCos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Araraquara, pelo suporte para o desenvolvimento do trabalho e pelo fornecimento das matérias-primas utilizadas.

Referências

- AFONSO, C.; CORREIA, A.P.; FREITAS, M.V.; BAPTISTA, T.; NEVES, M.; MOUGA, T. Seasonal changes in the nutritional composition of Agarophyton vermiculophyllum (Rhodophyta, Gracilariales) from the center of Portugal. *Foods*, v. 10, n. 5, p. 1145, 2021.
- AHN, C.B.; JEON, Y.J.; KANG, D.S.; SHIN, T.S.; JUNG, B.M. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. **Food Research International**, v. 37, p. 253-258, 2004
- AN, I; AN, S.; CHOE, T.; KANG, S.; LEE, J.H.; PARK, I.; JIN, Y.; LEE, S.; BAE, S.. *Centella asiatica* protects against UVB-induced HaCaT keratinocyte damage through microRNA expression changes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1349-1356, 2012.
- ARORA, R.; KUMAR, R.; AGARWAL, A.; REETA, K. H.;
- ARORA, R.; KUMAR, R.; AGARWAL, A.; REETA, K. H.; GUPTA, Y. K. Comparison of three different extracts of *Centella asiatica* for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: in vitro and in vivo study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1344-1352, 2018.

- ASSESSA – Catálogo técnico. Disponível em: <<https://assessa.com.br/hypskin/>> Acesso em: 20 de outubro de 2021
- BRAGA, J.C.B; DA SILVA, L.R. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021
- BYLKA, W.; ZNAJDEK-AWIŻEŃ, P.; STUDZIŃSKA-SROKA, E.; BRZEZIŃSKA, M. Centella asiatica in cosmetology. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 46, 2013
- CHERUBIUM, D. J.; MARTINS, C. V.; FARINÃ, L.; LUCCA, R. A. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v.19, n. 1, p. 33-37, 2020.
- CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2011
- DELFINO, D.A.; SANTOS, G.C.M.; SOUSA, I.M.S.; SANTOS, K.F.M.; BUENO, K.M.; GABRIEL, M.E.; REIS, S.A. **Manipulação de sabonete líquido e creme antioxidante à base de extratos de guaraná e açaí com ação anti-aging para a pele.** Trabalho de Conclusão de Curso. ETEC. Mococa. 2024.
- FERRO, A.F.P; BONACELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, p. 489-501, 2006.
- FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. **Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*.** Bull. Japan Soc. Sci. Fish., v.46, p.1125- 1130, 1980
- INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519 – 528, 2005
- MIGUEL, M. L. Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. **Revista Geográfica De América Central**. vol 2. p1-15, 2011.
- ORTIZ-VIEDMA, J.; AGUILERA, J.M.; FLORES, M.; LEMUS-MONDACA, R.; LARRAZABAL, M.J.; MIRANDA, J.M.; AUBOURG, S.P. Protective effect of red algae (Rhodophyta) extracts on essential dietary components of heat-treated salmon. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1108, 2021.
- PACE, D.; CAMPOS, A.C.; GRAF, R. Efeito de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e ginkgo biloba) na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. **Rev Soc Bras Cir Plast**, v. 2, n. 21, p. 77-81, 2006.
- PELLENZ, N.; B, F.; AZZOLIN, V.F.; DUARTE, T.; BOLIGNON, A.; MASTELLA, M.H.; TEIXEIRA, C.F.; RIBEIRO, E.E.; DA CRUZ, I.B.M.; DUARTE, M.M.M.F. Analysis of in vitro cyto-and genotoxicity of barbatimão extract on human keratinocytes and fibroblasts. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- PELLENZ, N.L.K. **Investigação dos mecanismos associados ao efeito cicatrizante regenera-**

- tivo do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) em modelos celulares *in vitro*.** 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- PINHEIRO, T.G.; DE SOUZA, G.S. Epidemiological profile of adolescents who developed stretch marks and their relationship with the process of depression/anxiety. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 7182-7192, 2021.
- RAHMAN, M.; HOSSAIN S.; RAHAMAN A.; FATIMA, N.; NAHAR Y.; UDDIN, B.; BASUNIA, M.A. Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 6, p. 27-32, 2013.
- RAHMAN, M.; RAHAMAN, S.; ISLAM, R.; RAHMAN, F.; MITHI, F.M.; ALQAHTANI, T.; ALMIKHLAFI, M.A.; ALGHAMDI, S.Q.; ALRUWAILI, A.S.; HOSSAIN, S.; AHMED, M.; DAS, R.; EMRAN, T.B.; UDDI, S. Role of phenolic compounds in human disease: current knowledge and future prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 233, 2021.
- RIBEIRO, M.M.S.; DOS SANTOS, L.C.; NOVAIS, N.S.; VIGANÓ, J.; VGGI, P.C. An evaluative review on *Stryphnodendron adstringens* extract composition: Current and future perspectives on extraction and application. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115325, 2022.
- RIBEIRO, N.A. **Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: formulação de géis e análise dos seus efeitos na cicatrização em experimentos *in vivo* e *in vitro*.** 132 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2016.
- ROCHA, N.I.P. **Atividade Fotoprotetora de Extratos Vegetais: Uso em Produtos Cosméticos.** Tese de Mestrado. Universidade Beira Interior. 2021.
- RIBEIRO, T.G.; NASCIMENTO, A.N.; HENRIQUES, B.O.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; FRANCA J.R.; DUARTE, M.C.; LAGE, P.S.; ANDRADE, P.H.R.; LAGE, D.P.; RODRIGUES, L.B.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; FARACO, A.A.G; COELHO, E.A.F.; CASTILHO, R.O Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 165, p. 238-242, 2015.
- RUFINO, M.D.S.M.; ALVES, R.E.; DE BRITO, E.S; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.
- SANTANA, T.F. **Análise da inflamação e estresse oxidativo no processo de cicatrização tecidual após o uso combinado de lipossomas com curcumina em biomembranas de látex natural e ledterapia para regeneração tecidual em portadores de úlcera diabética.** 109 f., il. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Brasília, 2021.
- SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; BATISTA, F.; SANTOS, L.R.; FERRI, P.; FERREIRA, H.D; SERAPHIN, J.C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 552-556, 2006.
- SILVA, N.F. **Composição química, efeitos antifúngico, antioxidante e citotóxico de cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2018
- SOUZA-MOREIRA, T.M.; QUEIROZ-FERNANDES, G.M.; PIETRO, R.C.L.R. *Stryphnodendron* species known as "barbatimão": a comprehensive report. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 910, 2018.

- SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R.; PIETRO, R. C.; ISAAC, V. L. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2007.
- SOUZA, T.M. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (*Myrtaceae*) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2007.
- TREVISAN, D.A.C.; DA SILVA, P.V.; FARIAS, A.B.P.; CAMPANERUT-SÁ, P.A.Z.; RIBEIRO, T.D.V.R.; FARIA, D.R.; DE MENDONÇA, P.S.B.; DE MELLO, J.C.P.; SEIXAS, F.A.V.; MIKCHA, J.M.G. Antibacterial activity of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) against *Staphylococcus aureus*: in vitro and in silico studies. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 03, p. 259-271, 01 set. 2020.
- WALTER, M. N.M.; WRIGHT, K. T.; FULLER, H. R.; MACNEIL, S.; JOHNSON, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental cell research**, v.316, n. 7, p. 1271-1281, 2010.