

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA AQUINO SIMÕES

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DE UMA FORMULAÇÃO
NATURAL PARA O CONTROLE E TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES
INFLAMATÓRIAS DO COURO CABELUDO E CICLO CAPILAR**

VILA VELHA

2024

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DE UMA FORMULAÇÃO
NATURAL PARA O CONTROLE E TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES
INFLAMATÓRIAS DO COURO CABELUDO E CICLO CAPILAR**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

GABRIELA AQUINO SIMÕES

VILA VELHA
2024

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S593e

Simões, Gabriela Aquino.

Estudo das propriedades bioativas de uma formulação natural para o controle e tratamento de disfunções inflamatórias do couro cabeludo e ciclo capilar / Gabriela Aquino Simões – 2024.

39 f. : il.

Orientador : Marcio Fronza.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2024.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Pele – Inflação. 3. Antioxidante.
I. Fronza, Marcio. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

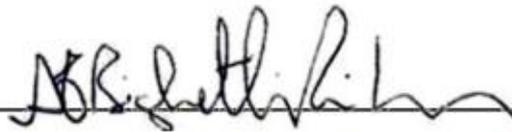
GABRIELA AQUINO SIMÕES

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DE UMA FORMULAÇÃO
NATURAL PARA O CONTROLE E TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES
INFLAMATÓRIAS DO COURO CABELUDO E CICLO CAPILAR**

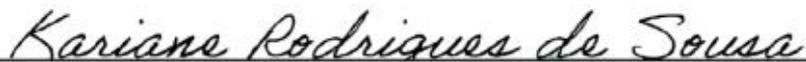
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2024.

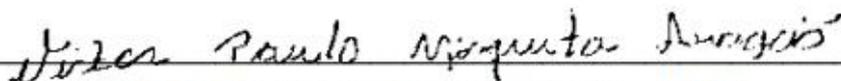
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Aparecida Erica Bighetti - UNICAMP

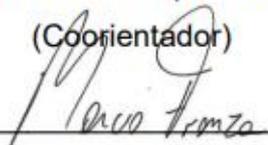


Profa. Dra. Kariane Rodrigues de Sousa - UENF



Prof. Dr. Victor Paula Mesquita Aragão – UENF

(Coorientador)



Prof. Dr. Marcio Fronza – UVV

(Orientador)

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 6 |
| 1.1 Dermatite seborreica..... | 7 |
| 1.2 Psoríase..... | 9 |
| 1.3 Eflúvio Telógeno | 10 |
| 1.4 Ativos Naturais..... | 11 |
| 1.4.1 Óleos Essenciais | 11 |
| 1.4.2 Óleos Vegetais..... | 13 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 15 |
| 3 OBJETIVOS | 16 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Obtenção da formulação natural, objeto do estudo..... | 17 |
| 4.2 Quantificação de polifenóis totais..... | 17 |
| 4.3 Quantificação de flavonoides..... | 17 |
| 4.4 Estudo da atividade antioxidante..... | 18 |
| 4.4.1 Determinação do sequestro do radical livre ABTS..... | 18 |
| 4.4.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)..... | 18 |
| 4.4.3 Teste do DPPH..... | 18 |
| 4.5 Estudo da atividade citotóxica in vitro..... | 19 |
| 4.7 Estudo do efeito da formulação sobre a proliferação celular | 20 |
| 4.8 Atividade anti-inflamatória in vitro da formulação em cultura de células | 20 |
| 4.8.2 Redução da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) | 21 |
| 4.8.3 Determinação de citocinas in vitro | 21 |
| 4.9 Análise estatística dos dados..... | 22 |
| 5. RESULTADOS | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1 Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides | 23 |
| 5.2 Atividade antioxidante do Tônico Capilar | 23 |
| 5.3 Efeitos do Tônico Capilar sobre a viabilidade de fibroblastos e macrófagos..... | 24 |
| 5.4 Proliferação de fibroblastos in vitro – BrDU | 25 |
| 5.5 Redução da produção de óxido nítrico in vitro..... | 26 |
| 5.6 Redução da produção do ânion superóxido in vitro..... | 27 |
| 5.7 Redução da produção de citocinas in vitro | 28 |
| 6. DISCUSSÃO | 29 |
| 7. CONCLUSÃO | 33 |
| 8. AGRADECIMENTOS..... | 33 |
| 9. REFERÊNCIAS | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS⁺ – 2,2-Azinobis (3-
etilbenzotiazol-6-sulfonato)

ANOVA – Análise de Variância

DHT - Dihidrotestosterona

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EROs – Espécies reativas de
oxigênio

FRAP – Poder antioxidante de
redução férrica;

IC₅₀ – Concentração do extrato
requerida para reduzir a quantidade
de radicais livres por 50%

IL-2 – Interleucina 2

IL-10 – Interleucina 10

LPS – Lipopolissacarídeo

MTT – (Brometo de 3-(4,5-
dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio)

NBT – Cloreto de Nitrozul de
Tetrazólio

NO – Óxido Nítrico

PBS – Tampão fosfato-salino

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides no tônico capilar puro.....21

Tabela 2. Atividade antioxidante do tônico capilar determinada pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP.....21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do tônico capilar sobre a viabilidade de fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e queratinócitos HaCAT (A). As células foram expostas por 24 h ao tônico capilar nas concentrações de 1 a 0,0625%. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm DP de células viáveis, comparada ao grupo controle, de três experimentos independentes (n=3). Efeito protetor da formulação natural avaliado em macrófagos contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B). Fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações da formulação na presença ou ausência de H₂O₂. Os resultados foram expressos como média \pm DP (n = 2). #Significativo (p <0,05) em comparação com o controle negativo sem H₂O₂. por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey..... 22

Figura 2. Efeitos proliferativo em cultura de fibroblastos do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1%. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para p < 0,05. *grupo tratado comparado ao grupo controle.....23

Figura 3. Efeito do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1% sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) após 24h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para p < 0,05. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS..... 24

Figura 4. Efeito da formulação natural testada nas concentrações de 0,063 a 1% sobre a concentração do radical ânion superóxido (O_2^-) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS.....25

Figura 5. Efeito do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1% sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias TNF- α em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS..... 26

RESUMO

Simões, Gabriela Aquino, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2024.
Estudo das Propriedades Bioativas de uma Formulação Natural para o Controle e Tratamento de Disfunções Inflamatórias do Couro Cabeludo e Ciclo Capilar.
Orientador: Prof. Dr. Marcio Fronza, Co-orientador: Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão.

Fatores externos e internos contribuem para o desequilíbrio do ciclo capilar favorecendo o surgimento das alopecias que levam ao enfraquecimento dos fios e a sua diminuição no couro cabeludo. O processo de troca dos fios do nosso cabelo ocorre de forma independente, ou seja, cada folículo se encontra em uma fase do ciclo capilar mantendo assim a uniformidade dos cabelos é mantida ao longo do tempo. A queda capilar corresponde a uma desordem no ciclo do folículo piloso natural do corpo, que podem ser causadas por hormônios, citocinas, fatores de crescimento, radiação ultravioleta e deficiências nutricionais. O aumento da queda capilar é uma queixa comum nos consultórios, clinicamente nomeada de alopecia. Entretanto, existem poucas opções de tratamento no mercado e a busca por produtos que auxiliam no controle da queda capilar aumenta a cada ano. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos de uma formulação natural para o controle e tratamento de disfunções do ciclo capilar e couro cabeludo. A atividade antioxidante do Tônico Capilar Royal D[®], objeto desse estudo, que é considerado uma formulação bioativa composta por ativos naturais, foi avaliada pelos métodos químicos do sequestro do radical livre (ABTS), e teste do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e pelo método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP). Estudos *in vitro*, em cultura de células, foram realizados para determinação da proliferação de fibroblastos, pelo método colorimétrico do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) para determinação da atividade anti-inflamatória pela inibição da produção de óxido nítrico, ânion superóxido e citocinas. Os resultados demonstraram que o tônico apresentou atividade antioxidante apresentando valores de IC50 de 3,8; 11,5 e 10,6 para os métodos do FRAP, ABTS e DPPH, respectivamente. Não obstante, a formulação demonstrou uma excelente viabilidade celular e eficiente ação estimuladora de macrófagos e fibroblastos (acima de 100%), aumentando a migração e a proliferação dessas células nas concentrações de 0,0625 a 1,0%. Os resultados obtidos demonstram que a formulação possui atividade antioxidante, não apresentou citotoxicidade *in vitro* e atividade estimulante sobre a proliferação e migração de fibroblastos. Assim, conclui-se que o produto poderá trazer novas possibilidades para o tratamento das disfunções couro cabeludo e ciclo capilar. Além disto, este trabalho caracteriza-se como inédito para a formulação, onde pela primeira vez foi descrito o potencial antioxidante da formulação.

Palavras-chaves: Tônico capilar natural, alopecia, dermatite seborreica, psoríase, antioxidante, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Simões, Gabriela Aquino, M.Sc, Vila Velha University – ES, February 2023. **Study Of The Bioactive Properties Of A Natural Formulation For The Control And Treatment Of Inflammatory Dysfunctions Of The Scalp And Hair Cycle.** Advisor: Prof. Dr. Marcio Fronza, Co-advisor: Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão.

External and internal factors contribute to the imbalance of the hair cycle, favoring the emergence of alopecias that lead to hair weakening and reduction on the scalp. The process of hair follicle turnover occurs independently, meaning each follicle is in a phase of the hair cycle, thus maintaining hair uniformity over time. Hair loss corresponds to a disorder in the natural hair follicle cycle of the body, which can be caused by hormones, cytokines, growth factors, ultraviolet radiation, and nutritional deficiencies. Increased hair loss is a common complaint in clinics, clinically termed alopecia. However, there are few treatment options available in the market, and the search for products that aid in controlling hair loss increases each year. In this context, the objective of this study was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties, as well as the ability to stimulate fibroblast proliferation of a natural formulation for the control and treatment of hair cycle and scalp dysfunctions. The antioxidant activity of Royal D® Hair Tonic, the subject of this study, which is considered a bioactive formulation composed of natural actives, was evaluated by chemical methods of free radical scavenging (ABTS), DPPH radical test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method. In vitro studies, in cell culture, were performed to determine fibroblast proliferation, by the MTT colorimetric method (bromide of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium]), for determination of anti-inflammatory activity by inhibition of nitric oxide production, superoxide anion, and cytokines. The results showed that the tonic exhibited antioxidant activity with IC₅₀ values of 3.8; 11.5, and 10.6 for the FRAP, ABTS, and DPPH methods, respectively. Furthermore, the formulation demonstrated excellent cell viability and efficient stimulation of macrophages and fibroblasts (above 100%), increasing the migration and proliferation of these cells at concentrations from 0.0625 to 1.0%. The results obtained demonstrate that the formulation has antioxidant activity, did not show in vitro cytotoxicity, and had stimulating activity on fibroblast proliferation and migration. Thus, it is concluded that the product could bring new possibilities for the treatment of scalp and hair cycle dysfunctions. Furthermore, this work is characterized as innovative for the formulation, where for the first time the antioxidant potential of the formulation was described.

Keywords: Natural hair tonic, alopecia, seborrheic dermatitis, psoriasis, antioxidant, anti-inflammatory.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento capilar ocorre em quatro fases distintas conhecidas como fase anágena, catágena, telógena e quenógena. A fase anágena ou de crescimento caracteriza-se por intensa atividade mitótica na matriz do folículo piloso; no couro cabeludo, dura cerca de seis anos. A fase catágena é um período de transição entre a fase de crescimento e a de repouso e, no cabelo, tem duração de três a quatro semanas. É também denominada fase de regressão ou involução. Na fase telógena ou de repouso, o pelo se separa da papila dérmica sendo facilmente destacado. Esta fase dura em média cem dias no couro cabeludo. Uma queda fisiológica de pelos telógenos pode ocorrer ao pentear, lavar ou friccionar o couro cabeludo. A queda de um pelo telógeno normal delimita o fim de um ciclo e o início de outro, com a substituição por um novo pelo na mesma localização (Plikus et al., 2009).

Ao final da fase telógena, o pelo se desprende completamente do folículo, passando a ser um pelo exógeno, enquanto um novo anágeno já está presente em sua região inferior. A fase quenógena é um período de latência em que não há pelo no canal folicular, após essa fase começa um novo ciclo capilar. Em média, 80 a 90% dos folículos encontram-se na fase anágena, enquanto apenas 10 a 20% apresentam-se na fase catágena ou telógena (Plikus et al., 2009).

O processo de troca dos fios ocorre de forma independente entre os folículos, desta forma, a uniformidade dos cabelos é mantida ao longo todo o tempo (Plikus et al., 2009). Em geral, o ciclo capilar resulta na troca de todos os fios de cabelo no período de 3 a 6 anos. Se consideramos a percentagem de fios na fase telógena, o número total de fios no couro cabeludo e o tempo para a queda do fio depois que entra na fase telógena, pode se concluir que uma pessoa perde em média de 30 a 45 fios de cabelo por dia (Majeed et al., 2020).

Alterações no ciclo capilar estão relacionadas a fatores internos, como problemas hormonais, estresse, doenças inflamatórias e imunológicas ou a fatores externos, como a exposição à poluição e hábitos de vida, por exemplo o tabagismo, alimentação pobre em nutrientes e higiene inadequada do couro cabeludo. Modificações no ciclo capilar diminuem o tempo adequado para a fase anágena, tornando a fase exógena precoce ou prolongando a fase telógena, de tal forma que

ocorre um grande período de latência (quenógena), como consequência observa-se importante queda dos fios de cabelo (Choi, 2018).

Além da perda importante de fios, essas alterações levam ao aparecimento de algumas disfunções do couro cabeludo como a dermatite seborreica e psoríase que proporcionam o eflúvio telogêno.

1.1 Dermatite seborreica

A dermatite seborréica ou eczema seborreico pode ser caracterizada como uma alteração crônica, não contagiosa e recorrente, em que ocorre inflamação nas áreas da pele onde existe um maior número de glândulas sebáceas. Observa-se por lesões descamativas avermelhada, arredondadas, ovaladas, localizadas em áreas mais oleosas como couro cabeludo, face, colo e dorso (Sobral et al., 2011).

A prevalência da dermatite seborreica do couro cabeludo acomete de 3-5% da população jovem e até 14,3% da população idosa (Lin et al., 2021). A dermatite seborreica (DS) e a caspa são comuns problemas dermatológicos que impactam as áreas seborreicas do corpo. Consideradas como uma condição básica semelhante, compartilham diversas características e respondem a tratamentos similares, divergindo apenas na localização e na intensidade (Borda et al., 2015).

A caspa se restringe ao couro cabeludo, causando coceira e descamação sem inflamação visível. Já a DS afeta não apenas o couro cabeludo, mas também a face, a região retroauricular e o tórax superior, resultando em descamação, formação de crostas, inflamação e prurido, podendo apresentar um eritema pronunciado. Tanto na DS quanto na caspa, a descamação geralmente assume tonalidades brancas a amareladas e pode ser de natureza oleosa ou seca (Borda et al., 2015).

A microbiota da pele está relacionada diretamente como uma das causas da dermatite seborreica, onde está presente o fungo *Malassezia spp.* Este microorganismo apresenta características lipófilas e se concentra particularmente em regiões ricas em glândulas sebáceas, que ocasiona o surgimento de eritema e prurido. A classificação atual inclui o gênero *Malassezia* na família *Cryptococcaceae*, da classe dos Blastomicetos (Nakabayashi et al., 2000).

O *Malassezia* é um fungo dimórfico de grande pleomorfismo que, por ter sido inicialmente classificado a partir de critérios morfológicos, foi denominado *Pityrosporum ovale* (células ovais com gemulação de base larga) e *orbiculare* (células redondas com gemulação de base estreita). Mais tarde, concluiu-se que ambas as formas eram variantes morfológicas da mesma espécie. Atualmente, por meio de métodos sorológicos e genéticos, o gênero *Malassezia* é dividido em sete espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae* (Sobral et al., 2011).

Nakabayashi et al. (2000) observaram que a espécie *Malassezia* é a mais prevalente na dermatite seborreica, encontrado 35% de *M. furfur* e 22% de *M. globosa* nos indivíduos com dermatite seborreica. Foi observado *M. globosa* em 67% da amostra, seguida de *M. furfur* e *M. sympodialis* (Nakabayashi et al., 2000).

Em relação ao sistema imunológico, em pacientes com dermatite seborreica é observado um aumento no número de células T natural killer (NK), além de baixos títulos de anticorpos da classe IgG (Sobral et al., 2011). Nos indivíduos com dermatite seborreica, promove-se uma ativação linfocitária e conseqüentemente redução da produção de IL-2 e IFN- γ e aumento da produção de IL-10 (Sobral et al., 2011).

Faergemann et al., (2001) observaram maior quantidade de células NK1+ e CD16+ associadas à ativação do complemento nas lesões de dermatite seborreica, quando comparadas à pele não-acometida dos mesmos pacientes ou à pele de indivíduos sem dermatite seborreica, o que sugere a presença de intensa resposta imune irritativa não-alérgica (Faergemann et al., 2001).

Watanabe et al. (2001) demonstraram que a *M. Furfur* não leva à produção de citocinas pelos queratinócitos enquanto as outras espécies de *Malassezia* o fazem. Além disso, relataram que, dependendo da espécie de *Malassezia* pode-se observar um perfil distinto de interleucinas inflamatórias produzidas. Por exemplo, quando há produção de IL-8, há atração de neutrófilos e, clinicamente, há foliculite por *Malassezia*; da mesma forma, a não-produção de MCP-1, um agente quimiotático para monócitos, determina clinicamente a dermatite seborreica (Watanabe et al., 2001).

1.2 Psoríase

A psoríase é considerada uma doença autoimune, caracterizada por placas cutâneas eritematosas, escamosas e hiperkeratóticas. Existem diversas apresentações clínicas da doença, sendo a crônica em placa a mais comum, também conhecida como psoríase vulgar. Entretanto, por ser uma doença sistêmica, tem manifestações extra cutâneas, tais como alterações ungueais e articulares (Krueger, J. G. et al., 2019).

Por apresentar alterações cutâneas, que na maioria das vezes podem cobrir a maior parte do corpo, essa doença pode causar estresse significativo e estigma social. Por se tratar de uma doença autoimune, a etiologia da psoríase é multifatorial com influências genéticas, imunológicas e ambientais, em que a epiderme e a proliferação capilar são afetadas pela liberação excessiva de linfócitos, que tem interação com os fatores já citados. Evidências apontam para uma inflamação dérmica que leva a uma hiperplasia dos queratinócitos e a remodelação da pele através da hiperativação local de vias que normalmente mantem a imunidade da barreira cutânea (Krueger, J. G. et al., 2019) .

Observa-se a necessidade da presença de um conjunto de fatores (genéticos, imunológicos e ambientais) para o surgimento da doença. As pré-disposições genéticas podem estar associadas, mas a transmissão pais e filhos não obedecem ao padrão mendeliano, tendo uma herança multifatorial e não sendo explicada apenas pela associação a antígenos de histocompatibilidade (HLA). A psoríase é uma doença inflamatória caracterizada pela expansão e ativação de células T helper (Th)1, Th17 e Th22, e pela produção de citocinas que lhes estão associadas, de entre as quais se destacam o interferão (INF)- γ , o fator de necrose tumoral (TNF)- α , a IL-17 e a IL-22 (Torres et al., 2014).

Krueger et al. (2019) sugeriram um papel patogênico dominante para a IL-17 nos pacientes com psoríase. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória, produzida pelos linfócitos Th17 juntamente com outras citocinas efetoras, como a IL-17F e IL-22 (Krueger et al., 2019).

Terapias que visam a via IL-23/IL-17A através do bloqueio da IL-17A ou IL-23, têm demonstrado eficácia clínica no tratamento da psoríase, fornecendo evidências convincentes de que a IL-23/IL-17 é um fator chave da inflamação da pele (Wittmann et al., 2018).

De modo geral, quando ocorre a ativação de células residentes da pele, estas produzem IFN- α , IFN-g e TNF- α pró-inflamatórios, que ativam o mieloide células dendríticas para produzir IL-12 e IL-23. Embora a IL-12 desencadeie vias Th1 pró-inflamatórias, a IL-23 atrai, expande e polariza as células Th17 e outros leucócitos para secretar IL-17A e outras citocinas, incluindo IL-17F e IL-26. Sinais de IL-17A através de receptores de IL-17, com efeitos distintos em diferentes tipos celulares. A IL-23 atua como um condutor central da inflamação na psoríase e em outras doenças imuno inflamatórias, promovendo a expansão de células Th17 patogênicas nos tecidos (Wittmann et al., 2018).

1.3 Eflúvio Telógeno

O crescimento do cabelo é controlado por um ciclo repetitivo único composto pelas fases anágena, catágena, exogêna, telógena e quenogêna (Stenn et al., 2001).

As células da papila dérmica, um grupo de fibroblastos especializados dentro do bulbo do folículo piloso, têm uma função essencial no controle do crescimento capilar não apenas no ciclo capilar normal, mas também na patogênese de certas condições, por exemplo, alopecia androgênica (Inui et al., 2003).

Portanto, os fatores que afetam as funções das células da papila dérmica influenciando e favorecendo a queda de cabelo são de grande importância do ponto de vista terapêutico.

A queda dos fios de cabelos é uma queixa comum nos consultórios, sendo clinicamente nomeada como alopecia. Os principais tipos de alopecia são conhecidos como alopecia areata, alopecia androgênica e eflúvio telógeno. A etiologia da alopecia areata é desconhecida, porém pode estar associada a problemas autoimunes. Já a alopecia androgênica é caracterizada pela queda dos fios por alterações hormonais e fatores genéticos. A etiologia do eflúvio telógeno caracteriza-se pelo desequilíbrio no ciclo biológico de crescimento dos fios, devido ao processo inflamatório, caracterizado pelo aumento da percentagem dos fios na fase telógena (Grover et al., 2013).

Cerca de 10 milhões de pessoas no mundo sofrem de alopecia. As consequências para os indivíduos afetados estão relacionadas à baixa autoestima e

transtornos psicológicos como ansiedade e depressão, que afetam de forma significativa a qualidade de vida (Buffoli et al., 2013).

A busca por produtos que auxiliam na melhora da queda capilar aumenta a cada ano. Por isso, diversas indústrias e centros de pesquisa buscam desenvolver produtos cosméticos e medicamentosos com o objetivo de controlar o processo de queda dos fios e promover o crescimento capilar (Buffoli et al., 2013).

1.4 Ativos Naturais

O uso da flora ao longo dos anos vem ajudando a humanidade a tratar diversas doenças, possibilitando abrir novos caminhos para estudos que visam buscar novos ativos para novos tratamentos (Ramsey et al., 2020).

Além de abastecer a humanidade, o reino vegetal continua a ter uma importância considerável em nossa vida diária, é considerado uma fonte potencial de milhares de novos materiais e ativos como fragrâncias, aromatizantes, corantes, fibras, quelantes de materiais pesados e muitos compostos úteis de grande valor terapêutico (Gad et al., 2021).

Plantas com séculos de uso na medicina popular vêm sendo investigadas, pois possuem grandes informações em seus componentes químicos biologicamente ativos, responsáveis por muitos efeitos medicinais e terapêuticos. Apesar do grande número de drogas sintéticas e semissintéticas, os agentes medicinais mais valiosos ainda em uso são obtidos a partir de plantas medicinais (Ramsey et al., 2020).

Diante deste contexto, o uso de produtos do metabolismo secundário de plantas como os extratos vegetais, óleos essenciais e óleos vegetais em formulações terapêuticas e cosméticas, vem crescendo nas últimas décadas. Um dos fatores desse crescimento é a busca por produtos naturais e veganos; também a valorização ambiental tem proporcionado o uso de plantas medicinais para fins terapêutico.

1.4.1 Óleos Essenciais

Nas últimas décadas, a indústria de óleos essenciais construiu um mercado sólido, promissor e muito rentável. O uso de óleo essencial já faz parte da nossa rotina

estando presente em aromatizantes de alimentos, sabonetes, shampoos, produtos para cabelos, colônias e até em sabão em pó para roupas (Ramsey et al., 2020).

Muitas pessoas optam por tratamentos com óleos essenciais por serem uma alternativa mais segura quando comparados aos tratamentos farmacológicos, devido ao apelo de que são mais naturais. Entretanto existem poucas pesquisas sobre os óleos essenciais, o que torna pouco claro os potenciais efeitos benéficos e/ou efeitos adversos, tornando necessários mais estudos para verificar os seus verdadeiros efeitos sobre a saúde (Ramsey et al., 2020).

Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngica e antivirais. Também são conhecidos para aliviar o estresse e têm sido usados em alguns tratamentos, como o distúrbio do sono, doenças cardiovasculares, alopecias e doenças do couro como a dermatite seborreica e psoríase (Ramsey et al., 2020).

Os óleos essenciais são substâncias complexas presentes em plantas aromáticas e extraídas por destilação a vapor do material vegetal. Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de compostos, constituídos em maior parte por substâncias por terpenos e outros compostos aromáticos (Groot et al., 2016) .

Os óleos essenciais de plantas que contêm luteonina, e seus glicídios, por exemplo, são descritos pelas suas propriedades anti-inflamatórias. Vários mecanismos podem estar envolvidos no processo inflamatório, como ativação do fator nuclear-kappa B (NF-kappa B) aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas (por exemplo, TNF, IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS), e alguns trabalhos mostraram que a luteolina inibe atividade de NF-kappa B (LÓPEZ et al., 2009).

O óleo essencial de capim-limão é amplamente usado em produtos farmacêuticos tópicos devido aos seus efeitos terapêuticos anti-inflamatórios. Mohamed et al (2014). mostraram em estudos *in vitro* que o citral presente no óleo essencial de capim-limão demonstrou ação inibitória na produção de IL-1b e IL-6 em macrófagos. Além do citral, o geranial, neral, e carvona, presentes no óleo essencial inibem citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Boukhatem et al., 2014).

O óleo essencial de capim-limão mostrou efetividade em 1.114 cepas de diferentes micróbios, incluindo fungos, leveduras e bactérias de 29 gêneros e 105

espécies, e circulou cerca de 425 isolados microbianos sensíveis a óleo essencial de capim-limão. Sugere-se que uma baixa concentração de óleo essencial de capim-limão inibe o crescimento e desenvolvimento microbiano (bacteriostático, fungistático e virustático), enquanto uma concentração mais alta causa destruição irreversível levando à morte microbiana (bactericida, fungicida e virucida) (Mukarram et al., 2022).

1.4.2 Óleos Vegetais

Outra categoria de bioativos que também é muito explorada para o tratamento de afecções do couro cabeludo são os óleos vegetais. Os óleos vegetais têm sido há tempos usados na pele para fins cosméticos e farmacêuticos, por possuírem muitos benefícios fisiológicos, a destacar a formação de uma barreira protetora para o couro cabeludo.

Os óleos vegetais são ricos em ácidos graxos que exercem um papel importante na cicatrização, além dos ácidos oleicos e linoleicos. Outros componentes presentes são os compostos fenólicos e tocoferóis, que possuem ação antioxidante e podem modular o processo de homeostase da barreira cutânea e inflamação (Gad et al., 2021).

Os óleos vegetais de jojoba, abacate, soja e amêndoas quando aplicados de forma tópica permanecem na superfície do couro cabeludo, sem penetração profunda nas primeiras camadas superiores do extrato córneo, mesmo que os triglicerídeos não penetrem profundamente o extrato córneo, o glicerol contribui para a hidratação do extrato córneo (Gad et al., 2021).

De acordo com Carluccio, um dos óleos vegetais eficazes no processo inflamatório é o óleo de oliva (azeite), que demonstrou atividade anti-inflamatória (Carluccio et al., 2003). Estudos em camundongos mostram que aplicação tópica de azeite de oliva em úlceras, melhorou a cicatrização por meio dos efeitos anti-inflamatórios, reduzindo os danos oxidativos e promovendo a reconstrução dérmica (Donato-Trancoso et al., 2016).

A eficácia do óleo tópico de semente de rosa mosqueta foi testada juntamente com vitaminas lipossolúveis orais em diferentes dermatites inflamatórias, como eczema, neurodermatite e queilite, com resultados promissores (Lin, T. K., 2021).

1.4.3 Extratos Vegetais

Outra categoria de produtos naturais são os extratos vegetais. Devido à crescente busca por ativos naturais, os extratos estão cada vez mais em foco. Os extratos são obtidos por maceração (extração até o equilíbrio com água ou álcool) ou percolação (extração até a exaustão com água ou álcool). Um fator chave na produção é a seleção do agente de extração. Os constituintes solúveis em água (hidrofílicos) podem ser extraídos com água, enquanto os constituintes solúveis em gordura (lipofílicos) são extraídos de uma parte específica da planta com álcool ou outros solventes (Hiipakka et al., 2001).

Recentemente, foi relatado que uma das catequinas presentes no extrato de chá verde (EGCG), pode ser útil na prevenção e/ou tratamento da alopecia androgenética inibindo seletivamente a atividade da 5 alfa redutase (Hiipakka et al., 2001). O estudo foi realizado *in vivo* e *in vitro*, onde células da papila dérmica de humanos normais foram cultivadas e um modelo do folículo capilar foram usados como modelo *in vitro* e amostras de tecidos do couro cabeludo, após aplicação do EGCG foram usadas como modelo *in vivo* (Kwon et al., 2007).

Os produtos para controle da queda e promoção do crescimento capilar são produzidos com ativos sintéticos ou naturais. Considerando a maior probabilidade de reações adversas com componentes sintéticos, os consumidores buscam cada vez mais por produtos com ativos naturais, em virtude da baixa taxa de reação adversa e do menor impacto ambiental causado por esses produtos. Porém a comprovação científica desses produtos é escassa (Majeed et al., 2020). Sendo assim, é de extrema importância garantir a tolerabilidade destas novas formulações avaliando os riscos e garantindo as melhores condições de uso.

2 JUSTIFICATIVA

Cerca de 10 milhões de pessoas no mundo sofrem de disfunções do couro cabeludo resultando no eflúvio telógeno e alopecias. As consequências da queda capilar estão relacionadas à baixa autoestima e transtornos psicológicos como ansiedade e depressão, afetando de forma significativa a qualidade de vida (Buffoli et al., 2001).

A busca por produtos que auxiliam no controle da queda capilar e melhora da saúde do couro cabeludo, aumenta a cada ano. Assim, diversas indústrias e centros de pesquisa buscam desenvolver produtos cosméticos com o objetivo de retardar ou impedir esse processo.

Além disso, consumidores buscam cada vez mais por produtos com ativos naturais, e do menor impacto ambiental causado por esses produtos. Porém, sua comprovação científica é escassa (Majeed, M. et al., 2020).

Sendo assim, é de extrema importância garantir a segurança e eficácia dessas novas formulações, para o seu uso seguro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos de uma formulação natural para o controle e tratamento de disfunções do ciclo capilar e couro cabeludo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar atividade antioxidante da formulação;
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* da formulação em cultura de células;
- Determinar a atividade sobre a proliferação de fibroblastos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* da formulação em cultura de macrófagos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da formulação natural, objeto do estudo

O tônico capilar, objeto de estudo deste trabalho foi gentilmente doado pela *Royal D*[®]. O tônico capilar compreende uma formulação natural bioativa composta por mais de setenta e quatro ativos naturais contendo diferentes vitaminas (Vitamina B3, B5, B6, Vitamina C e Vitamina E), aminoácidos (Arginina, glicina, alanina, serina, valina, prolina, treonina, isoleucina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico, Cistina biotecnológica), extratos vegetais (Alfalfa, Sweet Clover, Rosemary, Hop, Agrião indiano e Agrião do brejo) e ativos nano tecnológicos como as nanopartículas de Coenzima Q10 e Rosa Mosqueta. A formulação está sob proteção de patente nº BR 10 2020 022608 8. O Tônico foi disponibilizado pela empresa Trynt Group, que forneceu todas as quantidades necessárias para os testes do estudo.

4.2 Quantificação de polifenóis totais

O conteúdo de fenólicos totais presentes no tônico capilar foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Esquivel-alvarado et al., 2020). No ensaio, foram utilizados 200 µL de água ultrapura, 15 µL de reagente Folin-Ciocalteu, 30 µL do tônico capilar e 50 µL de carboato de sódio (20%, p/v) em microplaca. A absorbância foi medida imediatamente a 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido clorogênico por 100 ml do tônico (mg de EAC/100 ml do tônico). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.3 Quantificação de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi realizado por método espectrofotométrico empregando cloreto de alumínio conforme descrito na literatura com modificações (XU; CHANG, 2007). No ensaio, em microplaca foram adicionados 180 µL do tônico capilar e 15 µL de NaNO₂ 2,5 %. Após seis minutos foram adicionados 15 µL de AlCl₃ 10% e, após cinco minutos, foram adicionados 50 µL de NaOH 1M. Permaneceu por 10 minutos à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina. As leituras foram realizadas a 415 nm e os resultados expressos em miligramas

equivalentes de quercetina por 100 ml do tônico (mg eq quercetina/100 ml de tônico). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.4 Estudo da Atividade Antioxidante

4.4.1 Determinação do sequestro do radical livre ABTS

O método do sequestro do radical ABTS foi realizado de acordo com (Re et al., 1999) modificado. A solução de ABTS foi adicionada a diferentes concentrações do tônico capilar (100% a 3,13%), diluído em etanol e água, e reagiu no escuro por 6 minutos. A densidade óptica foi medida a 734 nm utilizando um leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Multi-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). A atividade antioxidante foi expressa como valor IR 50 (%) obtido por meio de três experimentos independentes.

4.4.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

O ensaio de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) foi baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica). A solução do FRAP foi adicionada a diferentes concentrações do tônico capilar diluída em etanol e/ou água, deixando reagir por 10 minutos e logo em seguida realizada leitura da densidade óptica em 585 nm utilizando um leitor de microplacas (Leitor de Microplacas Multi-Mode, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, EUA). A atividade antioxidante foi expressa como valor IR 50 (%) obtido por meio de três experimentos independentes.

4.4.3 Teste do radical DPPH

O método DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, porém na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor. Resumidamente, a solução de radical DPPH foi preparada em metanol e, em seguida, 270 μ L desta solução foi misturada com 30 μ L de solução do tônico capilar e mantido em local escuro por dez minutos. Em seguida, a absorbância foi medida a 517 nm onde metanol (98%),

solução de DPPH e ácido ascórbico como branco, controle e antioxidante padrão, respectivamente (BLOIS, 1958). A atividade antioxidante foi expressa como valor IR 50 (%) obtido por meio de três experimentos independentes.

4.5 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

Para investigar a atividade citotóxica foi utilizado o método colorimétrico do MTT, proposto por (Mosmann, 1983). Foram utilizadas cultura de células fibroblastos (L929), macrófagos (RAW 264.7) e queratinócitos (HACAT). As células foram incubadas com diferentes concentrações (1,0 - 0,0625%) por 24 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período a cultura foi incubada com o MTT por 2 horas e em seguida foi adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos com agitação para dissolução dos cristais de formazana. A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA (*Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices, USA*), utilizando-se filtros de 595 nm. Os resultados foram expressos em viabilidade percentual.

4.6 Efeito preventivo contra danos oxidativos *in vitro* causados por H₂O₂

O efeito protetor das amostras contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7, foram realizados de acordo com metodologia descrita por Lorençoni et al. (2021). Fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 96 poços a uma densidade de $7,0 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas as células foram expostas a diferentes concentrações do tônico capilar (1,0;0,5;0,25;0,125;0,0625%) e foi adicionado H₂O₂ 500 µM. Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e os resultados foram expressos como média ± DP de viabilidade celular (%).

4.7 Estudo do efeito da formulação sobre a proliferação celular

O efeito sobre a proliferação de fibroblastos foi determinado utilizando Kit de quantificação da proliferação celular – BrDU seguindo as especificações do fabricante. As células de fibroblastos foram mantidas em cultura com meio Dubelcco modified Eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, 5% de CO₂. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3000 células/poço, com 90 µL de meio sem SFB. Após 24 horas, os efeitos do tônico capilar nas concentrações de 1;0,5;0,25;0,125;0,0625% na proliferação de fibroblastos foram medidos com o análogo de timidina BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), após sua incorporação no DNA recém-sintetizado e sua detecção com um anticorpo anti-BrdU de acordo com as instruções e especificações do fabricante (Roche® Mannheim, Alemanha).

4.8 Atividade anti-inflamatória *in vitro* da formulação em cultura de células

4.8.1 *Produção de óxido nítrico*

A quantificação de óxido nítrico (NO) foi realizada pela determinação da influência do estresse oxidativo sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos. Os efeitos do tônico sobre a inibição da produção de óxido nítrico foi determinada em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeos (LPS). Macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir a 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1,0 - 0,0625%) do tônico capilar por 60 minutos antes ou depois da adição de LPS (1 µg/mL). Após as 24 h, o sobrenadante celular foi utilizado para a quantificação de nitrito onde a amostra foi misturada ao mesmo volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletilediamina em água; 1:1) e a concentração de nitrito calculada por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio. A leitura da absorbância das placas para a quantificação de nitrito foi feita em leitor de ELISA, utilizando-se filtros de 540 nm.

4.8.2 Redução da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ensaio do superóxido foi utilizado para determinar o efeito inibitório do tônico capilar sobre a produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS (CHOI, H. S. *et al.*, 2006). Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 96 poços e pré-tratadas com concentrações (1,0 – 0,0625%) do tônico capilar e estimuladas com LPS na concentração de 1 μ g/mL. Após incubação por 20h (5% de CO_2 a 37°C) o sobrenadante foi desprezado e adicionado cloreto de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1 mg/mL) e incubadas por 2 h. Após isso, as células passaram pela lavagem com metanol e secas e então os cristais de formazana formados foram dissolvidos e a densidade óptica mensurada a 630 nm, usando leitor de microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, Molecular Devices Spectra, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da produção de ânion superóxido.

4.8.3 Determinação de citocinas *in vitro*

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placas de 96 poços e incubados até atingir de 70-80% de confluência. As células foram expostas a diferentes concentrações (1,0 – 0,0625%) do tônico capilar por 60 minutos antes da adição de lipopolissacarídeos (LPS) (1 μ g/mL). Após 24 horas, o sobrenadante celular foi usado para quantificar a citocina TNF- α empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA – do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). A citocina foi detectada por meio de anticorpos de captura, e anticorpos biotinilados e amplificados com estreptoavidina-peroxidase de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific®). Foi utilizado o substrato o-Phenylenediamine (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada com o ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M) aos poços. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com filtro de 420 nm. A concentração de cada citocina foi determinada pela equação da reta comparando-se as absorbâncias das concentrações conhecidas da curva padrão para cada citocina com as absorbâncias obtidas nas amostras.

4.9 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad (San Diego, CA, EUA 176). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e/ou desvio padrão (DP). Variações estatísticas entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância multifatorial (ANOVA) seguidas de teste post hoc de Turkey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides

O conteúdo de fenólicos totais e flavonoides do tônico capilar estão representados na tabela 1. Os resultados para o teor de fenólicos e flavonoides mostram que o tônico capilar possui uma alta concentração de metabólitos secundários.

Tabela 1. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides no tônico capilar puro.

| Amostra | Fenólicos (mg equivalentes de ácido clorogênico/ml) | Flavonoides mg equivalentes de quercetina/ml |
|-----------------------|---|--|
| Tônico Capilar | 4,9 ± 0,18 | 2,4 ± 0,01 |

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados são expressos como média ± erro padrão

5.2 Atividade antioxidante do Tônico Capilar

O tônico capilar demonstrou atividade antioxidante nos três métodos químicos investigados: ABTS, DPPH e FRAP (Tabela 2). A atividade de captura de radicais livres foi expressa pelo valor do IR₅₀ em porcentagem. Os resultados demonstraram que o tônico apresentou atividade antioxidante exibindo valores de IR₅₀ de 3,68; 11,58 e 10,65 para os métodos do FRAP, ABTS e DPPH, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antioxidante do tônico capilar determinada pelos métodos do ABTS, DPPH e FRAP.

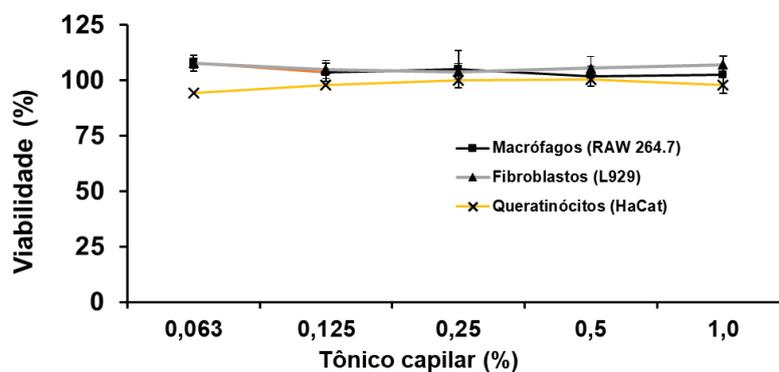
| Amostra | Atividade antioxidante (IR ₅₀) % | | |
|-----------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| | FRAP | ABTS | DPPH |
| Tônico capilar | 3,68 ^a ± 1,01 | 11,58 ^a ± 0,21 | 10,65 ^a ± 2,94 |
| Quercetina | 1,60 ^b ± 0,20 | 2,61 ^b ± 0,20 | 3,43 ^b ± 0,10 |

*Diferentes letras na mesma coluna significam diferenças estatísticas significativas. Estatística rodada no Programa R com p<0,05 de significância pelo teste Tukey.

5.3 Efeitos do Tônico Capilar sobre a viabilidade de fibroblastos e macrófagos

Inicialmente, foram realizadas análises para avaliar os efeitos do tônico capilar sobre a viabilidade celular *in vitro* utilizando as linhagens celulares de fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e queratinócitos HACAT. Os resultados obtidos revelaram de maneira conclusiva que o tônico capilar, nas diversas concentrações testadas, variando de 0,0625 a 1,0%, não apresentaram efeitos citotóxicos em ambas as linhagens celulares testadas (Figura 1A). Entretanto o tônico capilar não apresentou um efeito protetor às linhagens celulares de fibroblasto L929 e macrófagos RAW 264.7 nas diversas concentrações testadas, contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 500 μM (Figura 1B).

A



B

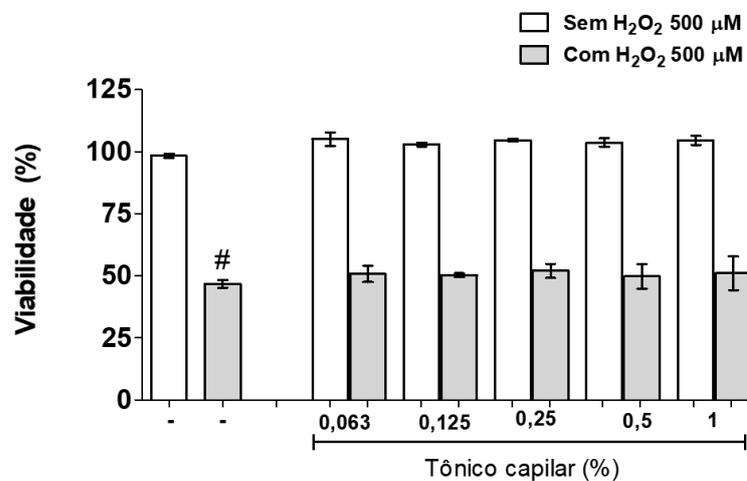


Figura 1. Efeito do tônico capilar sobre a viabilidade de fibroblastos L929, macrófagos RAW 264.7 e queratinócitos HaCAT (A). As células foram expostas por 24 h ao tônico capilar nas concentrações de 1,0 a 0,0625%. Os resultados são expressos em porcentagem média \pm DP de células viáveis, comparada ao grupo controle, de três experimentos independentes (n=3). Efeito protetor da formulação natural avaliado em macrófagos contra os danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B). Fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações da formulação na presença ou ausência de H₂O₂. Os resultados foram expressos como média \pm DP (n = 2). #Significativo (p <0,05) em comparação com o controle negativo sem H₂O₂. por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey.

5.4 Proliferação de fibroblastos *in vitro* – BrDU

O teste do bromodeoxiuridina (BrdU) foi conduzido para investigar os efeitos do tônico capilar sobre a proliferação celular. Os resultados revelaram aumentos notáveis na taxa de proliferação de fibroblastos *in vitro*. Em particular, observou-se um aumento significativo de 66% quando expostos à concentração de 0,5% do tônico, e um ainda mais expressivo aumento de 87% ao utilizar a concentração de 1,0%. Esses dados são representados na figura 2 destacando de maneira clara e quantitativa o impacto estimulante do tônico capilar.

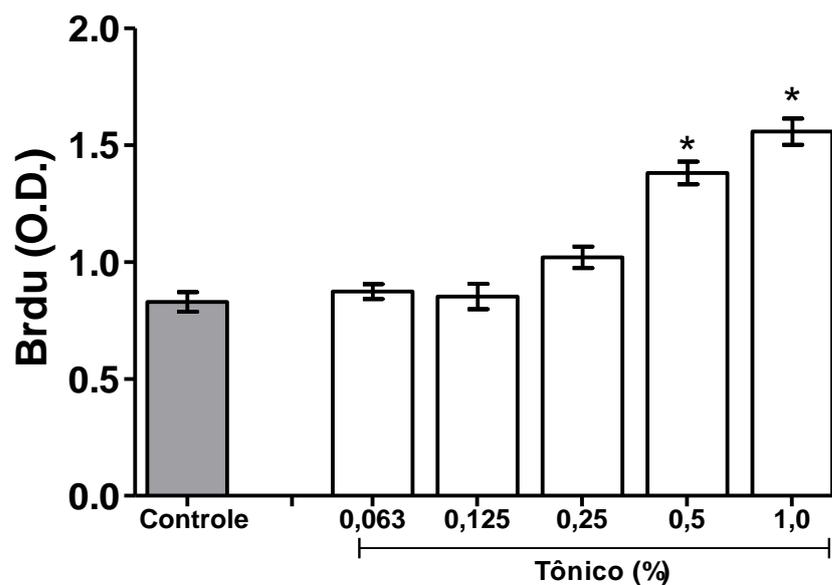


Figura 2. Efeitos proliferativo em cultura de fibroblastos do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1,0%. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. *grupo tratado comparado ao grupo controle.

5.5 Redução da produção de óxido nítrico *in vitro*

O tônico capilar, nas concentrações testadas 0,5% e 1,0%, foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO quando comparado ao grupo estimulado por LPS (Figura 3). Destacaram-se essas concentrações do tônico capilar, pois reduziram de forma significativa a produção de NO nas concentrações de 0,5 e 1%, alcançando reduções de 47,33 e 53,74% respectivamente (Figura 3)

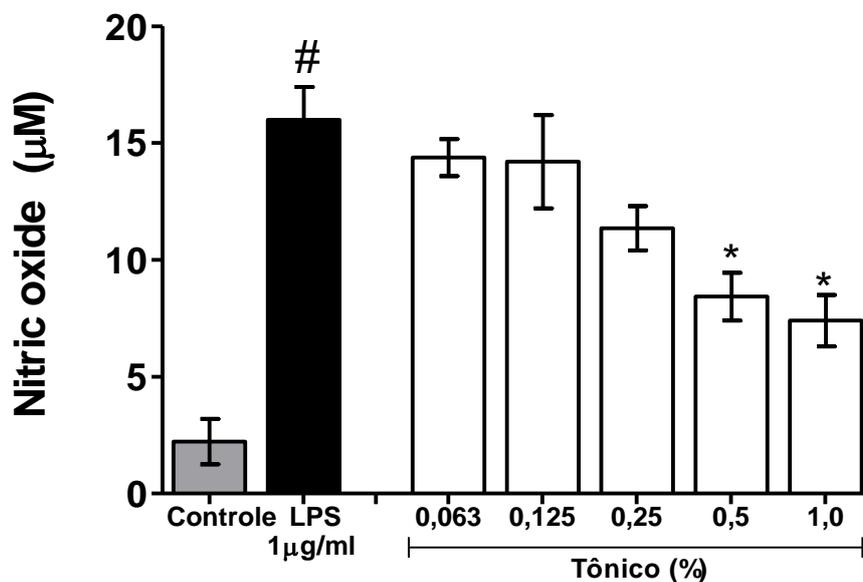


Figura 3. Efeito do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1,0% sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

5.6 Redução da produção do ânion superóxido *in vitro*

O tônico capilar também apresentou efeito inibitório na produção do radical superóxido de forma dose dependente em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (figura 4). As concentrações do tônico capilar a 0,25; 0,5 e 1,0% reduziram significativamente a produção de $O_2^{\bullet-}$, em 37,8; 45,1 e 49,1%, respectivamente quando comparada ao grupo estimulado por LPS. Destaque para as concentrações de 0,5 e 1% que apresentaram a melhor atividade com redução significativa da produção de $O_2^{\bullet-}$ alcançando inibições de 45,1 e 49,1% quando comparado ao grupo controle LPS (Figura 4).

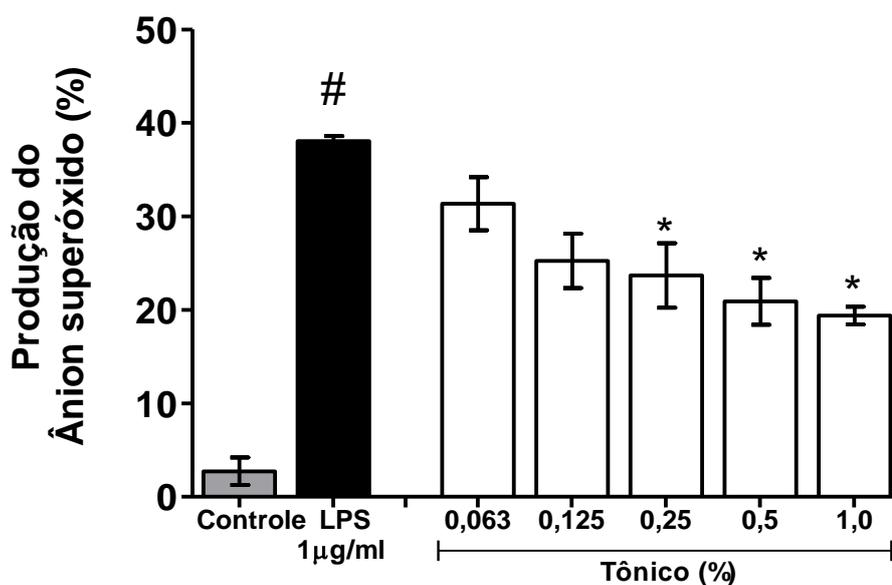


Figura 4. Efeito da formulação natural testada nas concentrações de 0,063 a 1,0% sobre a concentração do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

5.7 Redução da produção de citocinas *in vitro*

Com relação à produção de citocinas, os efeitos do tônico capilar na produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α foi determinado em cultura de macrófagos estimulados com LPS. Os resultados estão apresentados na Figura 5. O tônico foi testado em várias concentrações variando de 0,0625 a 1,0%. Destaque para a concentração de 1,0% que apresentou o melhor resultado na inibição em relação ao TNF- α (Figura 5).

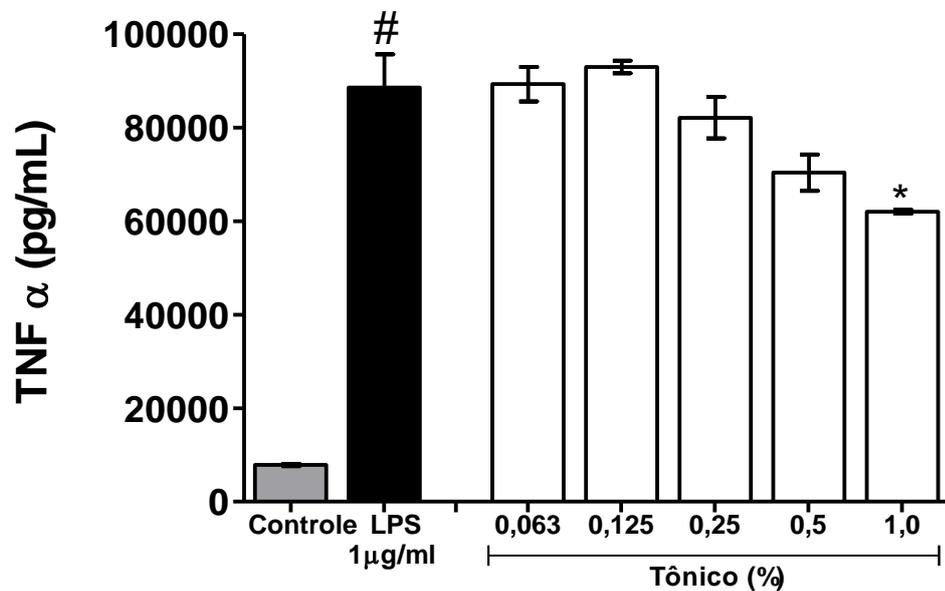


Figura 5. Efeito do tônico capilar testado nas concentrações de 0,063 a 1,0% sobre a concentração da citocina pró-inflamatórias TNF- α em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 μ g/mL) após 24 h de tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes. Significância estatística para $p < 0,05$. # grupo controle basal comparado ao grupo estimulado com LPS. *grupo tratado comparado ao grupo LPS.

6. DISCUSSÃO

A procura por produtos que ajudam a controlar a queda capilar e aprimorar a saúde do couro cabeludo cresce a cada ano. Conseqüentemente, indústrias e centros de pesquisa estão empenhados no desenvolvimento de novos produtos cosméticos com a finalidade de retardar ou prevenir esse processo. Tratamentos alternativos e medicamentos fitoterápicos naturais têm recebido destaque devido às suas vantagens, que incluem a minimização de efeitos colaterais, uma ampla gama de atividades que promovem o crescimento capilar e preços acessíveis (Herman et al, 2016). Pela primeira vez, neste estudo, investigaram-se os efeitos de uma formulação bioativa, com vários ativos naturais (Tônico Capilar). Os resultados obtidos demonstraram propriedades farmacoterapêuticas *in vitro* capazes de melhorar a saúde do couro cabeludo e folículo piloso de forma abrangente, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além da capacidade de estimular a proliferação e migração de fibroblastos.

Estudos evidenciam que plantas medicinais abundantes em flavonoides demonstram potencial para estimular o crescimento capilar, devido à sua atividade anti androgênica (inibição da testosterona e da 5-alfa-redutase) e à sua capacidade antioxidante (Tiwari, R. Et al., 2022).

O tônico capilar objeto deste estudo apresenta em sua formulação exclusivamente ativos naturais. A presença desses componentes naturais foi evidenciada pela concentração de metabólitos secundários, os quais demonstraram resultados que ressaltam e realçam a eficácia desta solução bioativa. Isso pode ser demonstrado pela sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, correlacionada à presença de compostos fenólicos e flavonoides. É amplamente reconhecido, e vários estudos têm evidenciado os impactos favoráveis dos compostos fenólicos e flavonoides provenientes de diversas fontes. Essa evidência é especialmente atribuída às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, resultando em efeitos benéficos em várias condições patológicas, como inflamação, alopecias, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e o envelhecimento precoce (Lima Cherubim, de et al., 2020; Lutz et al., 2019; Rahman, Md. M. et al., 2021). Neste contexto, é importante destacar e enaltecer a importância desta valiosa ferramenta

sustentável para o tratamento de disfunções do couro cabeludo e ciclo capilar em comparação aos tratamentos tradicionais.

Em nosso estudo, observou-se uma relação positiva entre o teor de fenólicos e flavonoides com a atividade antioxidante do tônico capilar. De forma similar, o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides observados em extrato metanólico de Chalota. A Chalota (*Allium ascalonicum* L.) da família Alliaceae é uma valiosa especiaria hortícola originária do Sudeste Asiático. Esta planta possui várias propriedades, incluindo atividades anticancerígenas, antidiabéticas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, além disso, vários benefícios da Chalota para a saúde foram relatados, incluindo cicatrização de feridas e manutenção de pele e cabelo saudáveis (Ruksiriwanich et al., 2022). No estudo de Godlewska et al. (2023) foi analisado a atividade antioxidante de produtos derivados de plantas biologicamente ativas. Uma das plantas analisada foi a folha de aloé vera que apresentou atividade antioxidante nos ensaios do FRAP, ABTS e DPPH, apresentando valores de IR₅₀ de 1,38; 0,86; 0,73% respectivamente (Godlewska et al., 2023). Em nossas pesquisas o tônico capilar mostrou uma excelente atividade antioxidante nos ensaios do FRAP, ABTS e DPPH, apresentando valores de IR₅₀ de 3,68; 11,58 e 10,65%, respectivamente. Quando comparamos o resultado da atividade antioxidante de apenas um extrato como o da folha de aloé vera, podemos observar que a sinergia dos extratos vegetais presentes no tônico capilar apresenta uma eficiente atividade antioxidante. Neste contexto, pela primeira vez na literatura, nossos resultados evidenciaram a atividade antioxidante do tônico capilar rico em extratos vegetais, e este resultado pode ser diretamente correlacionado com a presença significativa dos metabólitos secundários presentes nesta formulação.

O estresse oxidativo é caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células e tecidos. O desequilíbrio neste mecanismo de proteção pode resultar no dano a moléculas celulares, tais como o DNA, proteínas e lipídios. Quando os níveis de EROs ultrapassam os mecanismos de defesa, as células entram em um estado de estresse (Hussain et al., 2016). Apesar de atuarem como segundos mensageiros em processos celulares, como na adaptação a estresses ambientais em concentrações baixas, as EROs assumem um caráter tóxico e prejudicial quando presentes em níveis elevados (Ho et al., 2020). Isso, por

consequente, está associado à inflamação, a qual pode resultar em modificações na estrutura das proteínas, no apoptose celular e na liberação de citocinas inflamatórias (Nakai et al., 2021).

No processo inflamatório, diversas células são ativadas, incluindo os macrófagos, o que resulta em um aumento na produção de mediadores inflamatórios, tais como NO, $O_2^{\cdot-}$, IL-6, TNF- α , entre outros (Man et al., 2022). A produção constante e fisiológica de radicais livres, como o NO e o $O_2^{\cdot-}$, é essencial para preservar a homeostase e contribuir para os mecanismos de defesa do organismo. No entanto, em quantidades excessivas, esses radicais livres podem comprometer as funções celulares (Man et al., 2022). O desequilíbrio entre esses radicais desempenha um papel no envelhecimento, na disfunção mitocondrial e na indução de vários eventos patológicos, como processos inflamatórios (Papaccio et al., 2022).

Assim como o restante da pele, o cabelo também está sujeito a fatores ambientais. A exposição à radiação ultravioleta, o tabagismo e aspectos nutricionais, reconhecidos como importantes contribuintes para o envelhecimento cutâneo extrínseco, têm um impacto semelhante na integridade e funcionalidade da derme, bem como na função do folículo piloso. Esses fatores interferem na síntese e diferenciação da queratina, além de influenciarem o ciclo capilar, acelerando a telogenização e a progressiva miniaturização do fio. Evidências experimentais sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo desempenha um papel significativo no envelhecimento do cabelo (Addor et al, 2018).

Neste contexto, as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias *in vitro* do tônico capilar são especialmente promissoras, devido à sua capacidade de inibir a produção de NO, $O_2^{\cdot-}$, e da citocina pró-inflamatória TNF- α . Esses resultados abrem novas oportunidades para a contínua busca e exploração sustentável de novas formulações naturais bioativas para o tratamento e prevenção de disfunções do couro cabeludo e ciclo capilar com reconhecidas propriedades farmacoterapêuticas. Ruksiriwanich et al. (2022) já demonstraram que os extratos de Chalota foram capazes de inibir a produção de NO e $O_2^{\cdot-}$ (Ruksiriwanich et al., 2022). A inflamação nos folículos capilares é desencadeada por estresse oxidativo e andrógenos. Lobo et al. relataram que a produção excessiva de NO e a expressão de iNOS em células da papila dérmica do folículo piloso foram induzidas por DHT (Dihidrotestosterona) (Wolf et al., 2003).

A presença de citocinas inflamatórias, quando combinada com o estresse oxidativo, pode amplificar a degradação da matriz extracelular e a transdução de sinalização pró-inflamatória (Man et al., 2022; Papaccio et al., 2022). O estresse oxidativo e a inflamação crônica podem desencadear uma série de eventos que contribuem na patogênese da alopecia androgenética, o acúmulo de danos celulares e a redução na capacidade de regeneração da pele (Addor et al, 2018). Portanto, a modulação adequada desses processos, observada especialmente pelo tônico capilar, pode reduzir o ambiente de estresse oxidativo intracelular e o processo inflamatório, contribuindo para a manutenção da integridade do ciclo capilar.

Os fibroblastos presentes na papila dérmica, situada na base dos folículos pilosos, são reconhecidos por promover a regeneração dos folículos capilares durante a fase anágena. Já foi observada uma correlação entre o tamanho do fio de cabelo e o número de células da papila dérmica. Essa relação é evidente tanto na variação entre folículos de diferentes indivíduos quanto em processos de declínio folicular, quando ocorre a progressiva telogenização em sucessivos ciclos capilares (Addor et al, 2018).

Estudos têm evidenciado a importância dos fibroblastos. Uma associação de micronutrientes e aminoácidos (Exímia Fortalze Kera D) composto das vitaminas A, C, D, E, as do complexo B (ácido fólico e pantotênico, biotina, niacina, piridoxina e tiamina) e oligoelementos (ferro, magnésio e zinco) promoveram a proliferação dos fibroblastos na papila dérmica. É por meio da papila dérmica que o bulbo capilar recebe e absorve os nutrientes essenciais para o desenvolvimento do cabelo. Evidências sugerem que a papila dérmica e seus fibroblastos influenciam o crescimento folicular, especialmente a proliferação e diferenciação celular da matriz do folículo piloso (Addor et al, 2018).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tônico capilar, contendo mais de setenta e quatro ativos naturais, apresentou concentrações elevadas de metabólitos secundários, incluindo fenólicos totais e flavonoides. O tônico capilar demonstrou a capacidade de reduzir o estresse oxidativo ao eliminar os radicais livres, e inibiu a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), evidenciando seu papel na modulação de processos inflamatórios e estresse oxidativo.

Além disso, o tônico capilar também demonstrou ter uma ação estimuladora sobre os fibroblastos, promovendo tanto a proliferação quanto a migração dessas células. Esses resultados sugerem que a formulação natural bioativa poderá desempenhar um papel importante na proliferação da papila dérmica do folículo piloso humano, conferindo condições para a síntese da haste. O estímulo à papila dérmica observado poderia contribuir para a queratinogênese, considerada extremamente relevante na estratégia da abordagem em alopecias de causas variadas, como a alopecia androgenética, areata, senescente ou mesmo no eflúvio telógeno

Assim, este estudo apresenta, pela primeira vez com sucesso, evidências de que o tônico capilar possui propriedades biológicas notáveis, incluindo efeitos antioxidantes, atividade anti-inflamatória e a capacidade de estimular a proliferação e migração de fibroblastos. Esses efeitos benéficos podem ser atribuídos ao acúmulo de compostos bioativos, como os fenólicos totais e os flavonoides. Portanto, conclui-se que o tônico capilar representa uma promissora formulação natural para a prevenção e tratamento de diversas disfunções do couro cabeludo e alopecias, contribuindo assim para o avançando desses tratamentos.

8. AGRADECIMENTOS

Esse estudo teve apoio financeiro da FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) e da Universidade Vila Velha.

9. REFERÊNCIAS

ADDOR, F. A. S. A.; MELO, C. S. A.; VIEIRA, J. C. The effects of an association of nutrients on human follicular dermal papilla: An in vitro study. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, 2018. v. 10, n. 3, p. 9–13.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BORDA et al. Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review. **Journal of Clinical & Investigative Dermatology**, 2015.

BOUKHATEM, M. N. *et al.* Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, 2014. v. 9.

BUFFOLI, B. *et al.* The human hair: from anatomy to physiology. **The International Society of Dermatology**. 2013.

CARLUCCIO, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A., & De Caterina, R. (2003). Olive Oil and Red Wine Antioxidant Polyphenols Inhibit Endothelial Activation Antiatherogenic Properties of Mediterranean Diet Phytochemicals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**.

CHOI, B. Y. Molecular Sciences Hair-Growth Potential of Ginseng and Its Major Metabolites: A Review on Its Molecular Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**. 2018.

CHOI, H. S. *et al.* A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, 2006. v. 27, p. 31–44.

de Lima Cherubim, D.J., Buzanello Martins, C.V., Oliveira Fariña, L., da Silva de Lucca, R.A., 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J. Cosmet. Dermatol.* 19, 33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>

DONATO-TRANCOSO, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; ROMANA-SOUZA, B. Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. **Journal of Dermatological Science**, 1 jul. 2016. v. 83, n. 1, p. 60–69.

ESQUIVEL-ALVARADO, D. *et al.* Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical Vaccinium Species from Costa Rica. **Journal of agricultural and food chemistry**, 11 mar. 2020. v. 68, n. 10, p. 2872–2879.

FAERGEMANN, J. *et al.* Seborrhoeic dermatitis and Pityrosporum (Malassezia) folliculitis: characterization of inflammatory cells and mediators in the skin by immunohistochemistry. **British Journal of Dermatology**, 2001.

GAD, Heba A *et al.* Jojoba Oil: An Updated Comprehensive Review on Chemistry, Pharmaceutical Uses, and Toxicity. **Polymers**. 2021.

GODLEWSKA, K. *et al.* Investigation of Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Biologically Active Plant-Derived Natural Products. **Molecules**, 1 jul. 2023. v. 28, n. 14.

GROOT, A. C. DE; SCHMIDT, E. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. **Dermatitis**. Lippincott Williams and Wilkins. 2016.

GROVER, C.; KHURANA, A. Telogen effluvium. **Indian Journal of Dermatology**. 2013. V. 79, p. 591–603.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Mechanism of action of herbs and their active constituents used in hair loss treatment. **Fitoterapia**. Elsevier B.V. 2016

HIIPAKKA, R. A. *et al.* Structure activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. **Biochemical Pharmacology**. 2001.

HO, T.-T.; MURTHY, H. N.; PARK, So-Young. Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, 22 jan. 2020. v. 21, n. 3, p. 716.

HUSSAIN, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016. Hindawi Limited.

HWANG, E. *et al.* Antiaging effects of the mixture of Panax ginseng and Crataegus pinnatifida in human dermal fibroblasts and healthy human skin. **Journal of Ginseng Research**, jan. 2017. v. 41, n. 1, p. 69–77.

INUI, S. *et al.* Identification of Androgen-Inducible TGF- β 1 Derived from Dermal Papilla Cells as a Key Mediator in Androgenetic Alopecia. **The Society for Investigative Dermatology**. 2003.

KRUEGER, J. G. *et al.* IL-17A inhibition by secukinumab induces early clinical, histopathologic, and molecular resolution of psoriasis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 1 set. 2019. v. 144, n. 3, p. 750–763.

KWON, O. S. *et al.* Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). **Phytomedicine**, 6 ago. 2007. v. 14, n. 7–8, p. 551–555.

LIMA CHERUBIM, D. J. DE *et al.* Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 7 jan. 2020. v. 19, n. 1, p. 33–37.

LIN, Q. *et al.* Malassezia and Staphylococcus dominate scalp microbiome for seborrheic dermatitis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 1 maio. 2021. v. 44, n. 5, p. 965–975.

LIN, T. K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J. L. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021. MDPI AG.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2009.

LORENÇONI, M.F., Silva, R.S., Azevedo Júnior, R., Fronza, M., 2021. **Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk**. Rev. Paul. Pediatr. 39. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2021/39/2019165>

LUTZ, M. *et al.* Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. **Molecules**, 21 jan. 2019. v. 24, n. 2, p. 366.

MAJEED, M. *et al.* Clinical Study to Evaluate the Efficacy and Safety of a Hair Serum Product in Healthy Adult Male and Female Volunteers with Hair Fall. **Dovepress**. 2020.

MAN, M.-Q. *et al.* Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation**, 30 jun. 2022. v. 45, n. 3, p. 949–964.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983. v. 65, p. 55–63.

MUKARRAM, M. *et al.* Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities antioxidants. **Antioxidants**. 1 jan. 2022. v. 11, n.1

NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of Malassezia species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/38/5/337/1014533>>.

Identical cation of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/38/5/337/1014533>>.

NAKAI, K.; TSURUTA, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? **International Journal of Molecular Sciences**, 6 out. 2021. v. 22, n. 19, p. 10799.

PAPACCIO, F. *et al.* Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. **Antioxidants**, 6 jun. 2022. v. 11, n. 6, p. 1121.

PLIKUS, M. V *et al.* Analyses of regenerative wave patterns in adult hair follicle populations reveal macro-environmental regulation of stem cell activity. 2009. **The international journal of developmental biology**. Disponível em: <www.intjdevbiol.com>.

RAHMAN, Md. M. *et al.* Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. **Molecules**, 30 dez. 2021. v. 27, n. 1, p. 233.

RAMSEY, J. T. *et al.* Essential Oils and Health. **Yale journal of biology and medicine**, 2020.

RE, R. *et al.* Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 1999. v. 26, n. 9, p. 1231–1237.

RUKSIRIWANICH, W. *et al.* Phytochemical Constitution, Anti-Inflammation, Anti-Androgen, and Hair Growth-Promoting Potential of Shallot (*Allium ascalonicum* L.) Extract. **Plants**, 1 jun. 2022. v. 11, n. 11.

SOBRAL, A. L. *et al.* Seborrhoeic dermatitis. **An Bras Dermatol**, 2011.

STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of Hair Follicle Cycling. **Physiology**, 2001. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org>>.

TIWARI, R. *et al.* Development and Evaluation of Herbal Hair Serum: A traditional way to Improve Hair Quality. **The Open Dermatology Journal**, 11 jan. 2022. v. 15, n. 1, p. 52–58.

TORRES, T.; FILIPE, P. Interleucina-17 como Alvo Terapêutico na Psoríase Interleukin-17 as a Therapeutic Target in Psoriasis, 2014. **Acta Med Port**. Disponível em: <www.actamedicaportuguesa.com>.

WATANABE, S. *et al.* The Effects of Malassezia Yeasts on Cytokine Production by Human Keratinocytes. 2001. **The journal of investigative dermatology**

WITTMANN, M. *et al.* The iL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: iL-17A and Beyond. 2018. **Frontiersin**. v. 9, p. 1682. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

WOLF, R. *et al.* Nitric oxide in the human hair follicle: Constitutive and dihydrotestosterone-induced nitric oxide synthase expression and NO production in dermal papilla cells. **Journal of Molecular Medicine**, 1 fev. 2003. v. 81, n. 2, p. 110–117.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, mar. 2007. v. 72, n. 2, p. S159–S166.

