



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PAULO IURY GOMES NUNES**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE**  
***Sideroxylon obtusifolium* E SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, A N-METIL-(2S,**  
**4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA, NA DERMATITE DE CONTATO**  
**IRRITATIVA EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA - CE**

**2019**

PAULO IURY GOMES NUNES

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Sideroxylon obtusifolium* E SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, A N-METIL-(2S, 4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA, NA DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Almeida Santos.

FORTALEZA - CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

N927a Nunes, Paulo Iury Gomes.  
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Sideroxylon obtusifolium* E SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, A N-METIL-(2S, 4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA, NA DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA EM CAMUNDONGOS / Paulo Iury Gomes Nunes. – 2019.  
112 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.

1. Camundongos. 2. Dermatite. 3. Inflamação. 4. *Sideroxylon obtusifolium*. I. Título.

CDD 610

---

PAULO IURY GOMES NUNES

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *Sideroxylon obtusifolium* E SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, A N-METIL-(2S, 4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA, NA DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Almeida Santos.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Almeida Santos (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alana de Freitas Pires  
Centro Universitário Estácio do Ceará

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE  
*Sideroxylon obtusifolium* E SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, A N-METIL-(2S,  
4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA, NA DERMATITE DE CONTATO  
IRRITATIVA EM CAMUNDONGOS**

**RESUMO**

A pele constitui uma barreira biologicamente ativa que pode ser considerada como a primeira linha de defesa do corpo humano contra agentes lesivos, servindo como barreira física, órgão tátil, regulador térmico ou limitador da perda de água e da entrada de microrganismos e substâncias potencialmente nocivas. As dermatites são um conjunto de doenças cutâneas que possuem caráter inflamatório proeminente. Dentre as diferentes formas de ocorrência das dermatites, aquela que apresenta maior destaque, por sua alta taxa de ocorrência na população, vem a ser a dermatite de contato (DC). A DC é, por tanto, uma dermatose de origem irritativa (DCI) ou alérgica (DCA) que vem a afetar diferentes faixas etárias. A DCI ainda pode ser dividida em duas formas distintas, sendo estas a forma aguda (DCIA) e a crônica (DCIC). As opções terapêuticas atuais empregadas no tratamento de afecções inflamatórias da pele trazem consigo uma série de problemas, como a possibilidade de tolerância aos medicamentos, ocorrência de efeitos colaterais, de toxicidade e de inconvenientes vinculados à administração do medicamento, sendo o conjunto destas uma forte desvantagem nos tratamentos atuais. É nesse contexto que, ao longo da história, inúmeros estudos têm sido implementados acerca da utilização de produtos de origem natural no combate dos processos inflamatórios da pele. A *Sideroxylon obtusifolium* é conhecida popularmente por várias denominações, tais como quixaba, quixabeira, sacutiaba, rompe-gibão e maçaranduba da praia. A casca e folhas da *S. obtusifolium* são utilizadas popularmente para o tratamento de uma variada quantidade de afecções inflamatórias. Sendo assim, com base no conhecimento etnofarmacológico da *Sideroxylon obtusifolium* e em estudos prévios com N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (um constituinte das folhas dessa espécie), o presente estudo teve por propósito investigar o efeito anti-inflamatório tópico da fração metanólica das folhas de *S. obtusifolium* (FMSO), assim como de seu principal constituinte, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP), em modelos experimentais de DCI em camundongos, assim como em modelos *in vitro* complementares, com o intuito de verificar possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito. Foi possível avaliar o efeito anti-inflamatório de FMSO e MTHP, em modelos de DCIA induzida por 13-acetato-12-o-tetradecanoil-forbol (TPA) e DCIC induzida por Óleo de *Croton* em camundongos, assim como sua atividade anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*. Verificou-se que ambos os tratamentos surtiram uma ação efetiva na redução do edema estabelecido junto aos modelos animais. No modelo de DCIA empregado, FMSO e MTHP demonstraram atividade sobre a redução da migração de neutrófilos (atividade da mieloperoxidase em tecido; MPO), na redução da expressão gênica para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  e na redução dos níveis teciduais de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  e MCP-1) dosadas por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), mas não aumentando os níveis IL-10. Junto às investigações histológicas dos tecidos submetidos aos modelos de DCIA e DCIC, ambos os tratamentos demonstraram uma ação anti-inflamatória, reduzindo o edema, os níveis de infiltrado inflamatório e tendendo a preservar o tecido frente aos respectivos estímulos inflamatórios realizados. Nos testes realizados em células RAW 264.7, ambos os

tratamentos foram capazes de reverter os parâmetros inflamatórios avaliados quanto ao estímulo gerado pela indução pelo lipopolissacarídeo (LPS), reduzindo os níveis de nitrato/nitrito, TNF- $\alpha$ , IL-6 e o estresse oxidativo nas células (redução do ânion superóxido intracelular). FMSO e MTHP também demonstraram ação antioxidante quando submetidas ao teste de eliminação do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), além de citoprotoger as células RAW 264.7 da peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De uma forma geral, a conjuntura dos dados aqui expostos aponta para o potencial da atividade anti-inflamatória tópica de FMSO e MTHP frente a modelos de DCIA induzida por TPA e DCIC induzida por Óleo de *Croton*, em associação a modulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e controle do estresse oxidativo. Espera-se que os dados aqui obtidos venham a estimular futuros estudos translacionais com foco na investigação e resolução de maiores atividades biológicas no emprego de FMSO e MTHP, assim com da própria *S. obtusifolium*.

**Palavras-chave:** Camundongos. Dermatite. Inflamação. *Sideroxylon obtusifolium*.

**ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE METHANOLIC FRACTION OF  
*Sideroxylon obtusifolium* AND ITS MAIN CONSTITUENT N-METHYL-(2S, 4R)-**

## TRANS-4-HYDROXY-L-PROLINE IN IRRITANT CONTACT DERMATITIS IN MICE

### ABSTRACT

The skin is a biologically active barrier that can be considered the first line of defense of the human body against harmful agents, serving as a physical barrier, tactile organ and thermal regulator, limiting water evaporation and preventing the entrance of exogenous microorganisms and substances. Dermatitis is a set of skin diseases that have a prominent inflammatory character. Among its different types, the one that stands out, due to its high prevalence in the population, is contact dermatitis (CD). CD is an irritant (ICD) or allergic (ADC) dermatosis that affects different age groups. ICD can be further divided into two distinct forms: acute (AICD) and chronic (CICD). The current therapeutic options employed in the treatment of inflammatory skin conditions come with major disadvantages, such as the possibility of drug tolerance, side effects, toxicity and the inconvenience related to drug administration. In this context, throughout history, numerous studies have been implemented on the use of natural products to combat the inflammatory processes of the skin. *Sideroxylon obtusifolium* is popularly known by various names, such as quixaba, quixabeira, sacutiaba, rompe-gibão and maçaranduba da praia. *S. obtusifolium* bark and leaves are popularly used in the treatment of a variety of inflammatory conditions. Thus, based on the ethnopharmacological knowledge of *S. obtusifolium* and previous researches with N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-L-proline (MTHP) – the main constituent of *S. obtusifolium* leaves, this study aimed to investigate the topical anti-inflammatory effect of the methanolic fraction of *S. obtusifolium* leaves (FMSO) and MTHP, in experimental models of ICD both in mice and *in vitro*, in order to verify possible mechanisms of action involved in this effect. It was possible to evaluate the anti-inflammatory effect of FMSO and MTHP on 13-acetate-12-o-tetradecanoyl-phorbol (TPA)-induced AICD, and Croton-oil-induced CICD models in mice, as well as their anti-inflammatory and antioxidant activities *in vitro*. Both treatments were found to be effective in reducing edema established with animal models. In the AICD model used, FMSO and MTHP reduced neutrophil migration (tissue myeloperoxidase activity; MPO), TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  gene expressions and tissue levels of proinflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  and MCP-1) assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), but not increasing IL-10 levels. Along with the histological investigations of the tissues submitted to the AICD and CICD models, both treatments demonstrated an anti-inflammatory action, reducing edema, inflammatory infiltrate levels and tending to preserve the tissue against the respective inflammatory stimuli performed. In the tests performed on RAW 264.7 cells, both treatments were able to reverse the inflammatory parameters evaluated regarding the stimulation generated by lipopolysaccharide induction (LPS), reducing nitra/nitrite, TNF- $\alpha$ , IL-6 levels and oxidative stress in cells, by decreasing intracellular superoxide anion. FMSO and MTHP also demonstrated antioxidant action when subjected to the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) stable free radical scavenging test, in addition to cytoprotecting RAW 264.7 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation. In general, the conjuncture of the data presented here points to the potential of topical anti-inflammatory activity of FMSO and MTHP against models of TPA-induced AICD and Croton Oil-induced CICD, in association with negative modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress control. It is expected that the data obtained here will stimulate future translational studies

focusing on the investigation and resolution of major biological activities in the use of FMSO and MTHP, as well as *S. obtusifolium* itself.

**Keywords:** Mice. Dermatitis. Inflammation. *Sideroxylon obtusifolium*.

**AGRADECIMENTOS**



Agradeço a Deus, meu melhor amigo e alicerce. Sinto que em ti sempre estive apoiado e jamais fui abandonado, mesmo em meus momentos de rebeldia e ingratidão, quando não tinha mais forças para andar, quando cai e só podia me arrastar, foi sua presença que me fez levantar mais uma vez. Obrigado, especialmente, pelos desafios ofertados, lições aprendidas e conquistas estabelecidas. Sempre lhe serei fiel, pois nunca desististes de mim.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Almeida Santos, pela oportunidade de aprendizado, desenvolvimento pessoal e profissional junto ao Laboratório de Produtos Naturais (LPN) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento de minha bolsa de mestrado, sem a qual este trabalho se tornaria inviável.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pelo fornecimento do material vegetal aqui testado e pela caracterização química das amostras por nós utilizadas.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e a todo o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da UFC pela cortesia em ceder seu laboratório para a execução dos testes *in vitro*.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Negreiros Nunes Alves do Departamento de Clínica Odontológica da UFC, pela colaboração na execução das análises histológicas.

Aos Professores membros da banca avaliadora do processo de qualificação e defesa desta dissertação. Obrigado pela disponibilidade em participar e por se proporem em ajudar com alegações mais que relevantes para a melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, especialmente ao Coordenador Prof. Dr. Pedro Felipe Carvalhedeo de Bruin e as secretárias Rita e Ivone, por sua sempre tão grandiosa disponibilidade em ajudar os alunos.

À minha avó paterna, Maria Socorro Lima Nunes (*in memoriam*), minha guerreira, a quem devo minha eterna gratidão e toda a minha formação acadêmica. Sem a senhora ao meu lado eu jamais teria chegado tão longe. Obrigado de coração por sempre ter apoiado todas as minhas escolhas e investido tudo que podia em meus sonhos.

À minha namorada, Rafaela de Sousa Brito, pela paciência e compreensão. Por muitas vezes sacrifiquei nossos momentos juntos para poder viabilizar esse sonho. Mesmo no silêncio você me apoiou. A você, meu amor e minha eterna gratidão.

Ao meu avô paterno, Cândido de Melo Nunes (*in memoriam*), a quem sou eternamente grato, não só pelos ensinamentos, mas, principalmente, pelos exemplos, pois “a palavra empolga, mas o exemplo ensina”.

À minha avó Áurea (*in memoriam*) e às minhas tias avós “Zilda” (*in memoriam*) e “Teté” – avós de coração –, obrigado por se esforçarem ao máximo para contribuir com minha formação como ser humano. A vocês devo não só o pão e a água, mas também a formação moral e cultural que me fizeram chegar até aqui.

À minha mãe, Luciene Gomes da Silva, obrigado por todo o apoio ofertado e a lição de que sempre é possível mudar uma realidade incômoda.

Ao Sr. Gilson de Lima Medeiros, à Sr.<sup>a</sup> Rita de Cassia de Sousa Lima e à Liandra de Sousa Lima pela acolhida mais que calorosa no seio de sua família.

Aos colegas Thales Campelo, Bruno Alves, Florêncio Júnior, Diego Alejandro e Sabrina Matias, obrigado pelas contribuições, seja por meio de palavras confortantes de apoio em momentos de desespero, pela ajuda experimental, mesmo que vez por outra “lamuriosa”, pela cessão de material ou pela ajuda metodológica indispensável. Sempre poderão contar comigo.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Flávia Seraine e à doutoranda Greyce Luri Sasahara, obrigado por munirem a minha pessoa com os ensinamentos e as ferramentas necessárias para que eu desenvolvesse este trabalho de forma independente, lógica e com consciência crítica que me servirão para a vida toda.

A todos que fazem ou fizeram parte do LPN, pelos ensinamentos, companheirismo, paciência, momentos de lazer, compreensão, brigas, suporte e carinho que recebi durante minha estadia no mesmo. Em especial gostaria de agradecer profundamente a Agueina Rocha por demonstrar sua amizade incondicional quando assim precisei e a Gabrielle de Paula por sua cordialidade sempre constante. Aos colegas Renan Pereira de Lima, Tuelly Bandeira, Rose Anny Costa, Ana Virginia Lima, Milena Braga e Karina Moura por dividirem comigo as angústias e as alegrias deste processo. Muito obrigado.

A todos os professores e funcionários da UFC, meu muito obrigado por sua participação em minha história. Com um especial destaque ao Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca pela pronta disponibilidade em ajudar os mais necessitados, sempre com uma mais que imediata resolução dos problemas, e ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá pelos ensinamentos, paciência e constante boa vontade em auxiliar. A todos a minha gratidão.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pelas oportunidades adquiridas durante os processos de graduação e de Pós-Graduação, pois mesmo as lições mais duras aprendidas aqui me serão de grande utilidade para a jornada que se segue.

Enfim, para não correr o risco de ser ingrato ou negligente, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta etapa da minha vida. Aos meus amigos, colegas, conhecidos e tantos outros que tornaram a caminhada sobre as pedras um pouco mais agradável, meu muito obrigado.

“É loucura odiar todas as rosas porque uma te espetou. Entregar todos os teus sonhos porque um deles não se realizou; perder a fé em todas as orações porque em uma não foi atendido, desistir de todos os esforços porque um deles fracassou. É loucura condenar todas as amizades porque uma te traiu, descrer de todo amor porque um deles te foi infiel. É loucura jogar fora todas as chances de ser feliz porque uma tentativa não deu certo. Espero que na tua caminhada não cometas estas loucuras. Lembrando que sempre há outra chance, outra amizade, outro amor, uma nova força. Para todo fim um recomeço!”.

– Antoine de Saint-Exupéry.

“Não chores, meu filho;  
Não chores, que a vida  
É luta renhida:  
Viver é lutar.  
A vida é combate,  
Que os fracos abate,  
Que os fortes, os bravos  
Só pode exaltar...”.

– Antônio Gonçalves Dias.

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. A pele e seus anexos.....	23
-------------------------------------	----

Figura 2.	Tipificações das dermatites de contato: Dermatite de contato alérgica (A). Dermatite de contato irritativa aguda (B). Dermatite de contato irritativa crônica (C).....	25
Figura 3.	<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Árvore, Folhas, Flores e Frutos).....	31
Figura 4.	Estrutura Química da Molécula N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina.....	33
Figura 5.	Esquema pontual do modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de <i>Croton</i> .....	45
Figura 6.	Avaliação da atividade de FMSO e MTHP frente ao edema de orelha no modelo de DCIA induzida por TPA em camundongos.....	54
Figura 7.	Avaliação da ação de FMSO e de MTHP frente à atividade de MPO em modelo de DCIA induzida por TPA em camundongos.....	55
Figura 8.	Efeito de FMSO e de MTHP nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ e MCP-1.....	57
Figura 9.	Fotomicrografias do tecido da orelha de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.....	59
Figura 10.	Edema relativo obtido pela análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.....	60
Figura 11.	Efeito da FMSO (0,06 mg/orelha) e da MTHP (0,06 mg/orelha) na expressão relativa do RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 em tecido proveniente do protocolo de DCIA induzido por TPA.....	61
Figura 12.	Avaliação da atividade de FMSO e MTHP frente ao edema de orelha (mm) gerado pelo modelo de DCIC induzido por Óleo de <i>Croton</i> em camundongos.....	62
Figura 13.	Avaliação da ação de FMSO ou MTHP, ambos na dose de 0,06 mg/orelha, frente à atividade de MPO em tecido proveniente do protocolo de DCIC por Óleo de <i>Croton</i> na orelha de camundongos.....	63

Figura 14.	Fotomicrografias do tecido da orelha de camundongos sensibilizados com a aplicação tópica repetida de óleo de <i>Croton</i> no modelo de DCIC.....	65
Figura 15.	Edema relativo obtido pela análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIC induzida por Óleo de <i>Croton</i> .....	66
Figura 16.	Efeito de FMSO e de MTHP na viabilidade de células RAW 264.7 em ensaio com MTT.....	67
Figura 17.	Efeito do FMSO e do MTHP na integridade de membrana de células RAW 264.7 pela dosagem da enzima Lactato Desidrogenase.....	68
Figura 18.	Exposição aguda às drogas testes – Avaliação da capacidade citoprotetora frente à peroxidação lipídica induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	69
Figura 19.	Exposição Crônica às Drogas Testes – Avaliação da Capacidade Citoprotetora Frente à Peroxidação Lipídica Induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ....	70
Figura 20.	Avaliação indireta dos níveis de Ânion Superóxido Intracelular (ASO) pela verificação do Índice de Estimulação (SI) de células RAW 264.7 estimuladas por LPS e tratadas com FMSO e MTHP.	71
Figura 21.	Efeito do FMSO e do MTHP nos níveis de Nitrato/Nitrito no meio de cultivo de células RAW 264.7 na ausência e após o estímulo por LPS.....	72
Figura 22.	Efeito do FMSO e de MTHP nos níveis de TNF- $\alpha$ e IL-6 no meio de cultivo de células RAW 264.7 frente ao estímulo por LPS.....	73
Figura 23.	Avaliação da Redução do Radical DPPH• por atividade de FMSO e MTHP em Meio Reacional.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gravidade da reação cutânea em resposta à irritação dérmica local avaliada em relação às variáveis eritema e edema.....	40
Tabela 2.	Escores Empregados Para a Análise Histológica.....	42
Tabela 3.	Sequência gênica e temperatura de anelamento (°C) dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR.....	44



<b>%</b>	Percentual ou Porcentagem
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>°C</b>	Graus celsius
<b>μ</b>	Micro
<b>μm</b>	Micrometro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>AA</b>	Ácido Ascórbico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ASO</b>	Ânion superóxido intracelular
<b>BCRJ</b>	Banco de células do Rio de Janeiro
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar ou DNA complementar
<b>CE50</b>	50% da concentração efetiva
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CFMV</b>	Conselho Federal de Medicina Veterinária
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COX-2</b>	Cicloxigenase
<b>CSIF</b>	Fator inibidor da síntese de citocinas
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> (Limiar do ciclo)
<b>CTNBio</b>	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
<b>DC</b>	Dermatite de contato
<b>DCA</b>	Dermatite de contato alérgica
<b>DCI</b>	Dermatite de contato irritativa
<b>DCIA</b>	Dermatite de contato irritativa aguda.
<b>DCIC</b>	Dermatite de contato irritativa crônica.
<b>Dexa</b>	Dexametasona
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Eagle modificado de Dulbecco)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DPPH (ou DPPH•)</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELAM-1</b>	Moléculas de adesão de leucócitos
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>EPM (ou E.P.M)</b>	Erro padrão da média
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FFOE</b>	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
<b>FMSO</b>	Fração metanólica de <i>S. obtusifolium</i>
<b>g</b>	Gramas; Força g (gravidade)
<b>GSH</b>	Glutationa reduzida
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HTAB</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<b>ICAM-1</b>	Moléculas de adesão intercelulares
<b>IFN-γ</b>	Inferferon-gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8 ( ou CXCL8)</b>	Interleucina 8

<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>kg</b>	Quilograma
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
<b>MCP-1 (ou CCL2)</b>	Proteína quimiotática de monócitos
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MTHP</b>	N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina
<b>MTT</b>	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<b>n</b>	Nano
<b>NB2</b>	Nível de segurança nº 2
<b>NBT</b>	Nitroazul de Tetrazólio
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NK</b>	Células exterminadoras ou <i>Natural Killer Cell</i>
<b>nm</b>	Nanometro
<b>NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato/Nitrito
<b>OECD</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PMN</b>	Células polimorfo nucleadas
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13-CPD
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-qPCR</b>	Reação de transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase
<b>SI</b>	Índice de estimulação
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Toc</b>	α-tocoferol
<b>TPA</b>	13-acetato-12-o-tetradecanoil-forbol
<b>U</b>	Unidade
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>URCA</b>	Universidade Regional do Cariri
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular

**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1</b>	<b>A Pele e a Dermatite.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Dermatite de Contato Irritativa.....</b>	<b>26</b>
1.2.1	Fisiopatologia.....	26
1.2.2	Tratamento.....	28
<b>1.3</b>	<b>Produtos Naturais e seu uso no Tratamento da Dermatite.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4</b>	<b><i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Roem. &amp; Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae).....</b>	<b>30</b>
1.4.1	N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina.....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Material vegetal.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção e caracterização química da fração metanólica das folhas de <i>S. obtusifolium</i> (FMSO) e de seu principal constituinte, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP).....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Protocolos experimentais <i>in vivo</i>.....</b>	<b>37</b>
4.3.1	Animais.....	37
4.3.2	Avaliação da Toxicidade.....	38
4.3.2.1	Avaliação da Toxicidade Aguda por Via Oral.....	38
4.4.2.2	Teste de Toxicidade Cutânea por Múltiplas Aplicações.....	38
4.4.3	Dermatite de Contato Irritativa Aguda (DCIA) Induzida por 13-acetato-12- <i>o</i> -tetradecanoil-forbol (TPA).....	40
4.4.3.1	Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO).....	41
4.4.3.2	Determinação dos Níveis Teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ e MCP-1 em Tecido Proveniente do Modelo de Dermatite Aguda Induzida por TPA.....	41
4.4.3.3	Análise Histológica.....	42
4.4.3.4	Expressão relativa do RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 em Tecido Proveniente do Protocolo de Dermatite Aguda por TPA.....	43
4.4.3.4.1	Extração do RNA tecidual.....	43
4.4.3.4.2	Transcrição reversa e PCR em tempo real (RT-qPCR).....	43
4.4.4	Dermatite de Contato Irritativa Crônica por Óleo de <i>Croton</i> .....	44
<b>4.5</b>	<b>Protocolos experimentais <i>in vitro</i>.....</b>	<b>45</b>
4.5.1	Cultura de Células.....	45
4.5.2	Diluição das Amostras e Número Amostral.....	45
4.5.3	Definição de Concentrações de Trabalho e Avaliação de Segurança.....	46
4.5.3.1	Avaliação da Viabilidade Celular Pelo Método do MTT.....	46

4.5.3.2	Avaliação da Integridade de Membrana Pela Quantificação de Lactato Desidrogenase (LDH).....	46
4.5.4	Avaliação da Capacidade Citoprotetora Frente à Peroxidação Lipídica Induzida por Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	47
4.5.5	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo em Células RAW 264.7 pela Avaliação dos Níveis do Ânion Superóxido Intracelular (ASO).....	48
4.5.6	Estimulação de Macrófagos RAW 264.7 por Lipopolissacarídeo (LPS).....	48
4.5.6.1	Dosagem de Nitrito/Nitrito em Sobrenadante das Células RAW 264.7.....	49
4.5.6.2	Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-6 em Sobrenadante de Células RAW 264.7.....	49
4.5.7	Avaliação da Atividade Antioxidante Não Específica – Avaliação da Redução do Radical DPPH• em Meio Reacional.....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados <i>in vivo</i>.....</b>	<b>52</b>
5.1.1	Avaliação da Toxicidade Aguda por Via Oral.....	52
5.1.2	Teste de Toxicidade Cutânea por Múltiplas Aplicações.....	52
5.1.3	Dermatite de Contato Irritativa Aguda (DCIA) Induzida por 13-acetato-12- <i>o</i> -tetradecanoil-forbol (TPA).....	53
5.1.3.1	Avaliação do Edema.....	53
5.1.3.2	Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO).....	54
5.1.3.3	Determinação dos Níveis Teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ e MCP-1 em Tecido Proveniente do Modelo de Dermatite de Contato Irritativa Aguda Induzida por TPA.....	56
5.1.3.4	Análise Histológica do Tecido das Orelhas.....	58
5.1.3.5	Expressão Relativa do RNAm para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 em Tecido de Orelha Proveniente do Protocolo de DCIA Induzido por TPA.....	60
5.1.4	Dermatite de Contato Irritativa Crônica (DCIC) por Óleo de <i>Croton</i> .....	61
5.1.4.1	Avaliação do Edema.....	61
5.1.4.2	Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO).....	62
5.1.4.3	Análise Histológica do Tecido das Orelhas.....	63
<b>5.2</b>	<b>Resultados <i>in vitro</i>.....</b>	<b>66</b>
5.2.1	Definição de Concentrações de Trabalho e Avaliação de Segurança.....	66
5.2.1.2	Avaliação da Viabilidade Celular pelo Método do MTT.....	66
5.2.1.3	Avaliação da Integridade de Membrana pela Quantificação de Lactato Desidrogenase (LDH).....	67
5.2.2	Avaliação da Capacidade Citoprotetora Frente à Peroxidação Lipídica Induzida por Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	68
5.2.2.1	Avaliação da Citoproteção – Exposição Aguda às Drogas Testes (1 h).....	68

5.2.2.2	Avaliação da Citoproteção – Exposição Crônica às Drogas Testes (24 h).....	69
5.2.3	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo em Células RAW 264.7 pela Avaliação dos Níveis do Ânion Superóxido Intracelular (ASO).....	70
5.2.4	Dosagem de Nitrato/Nitrito em Sobrenadante das Células RAW 264.7.....	70
5.2.5	Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-6, em Sobrenadante das Células RAW 264.7.....	72
5.2.6	Avaliação da Atividade Antioxidante Não Específica – Avaliação da Redução do Radical DPPH• em Meio Reacional.....	74
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>I</b>	<b>ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C DA FMSO COM IDENTIFICAÇÃO DE MTHP.....</b>	<b>101</b>
<b>II</b>	<b>CERTIFICADOS DE AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>III</b>	<b>TABELAS DOS PARÂMETROS ANALISADOS NO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA POR VIA ORAL.....</b>	<b>106</b>
<b>IV</b>	<b>TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>V</b>	<b>TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESCORES DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS PARA O TESTE DE EDEMA NA DCIA POR APLICAÇÃO DE TPA...</b>	<b>111</b>
<b>VI</b>	<b>TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESCORES DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS PARA O TESTE DE EDEMA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE ÓLEO DE <i>Croton</i> NO MODELO DE DCIC.....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Pele e a Dermatite

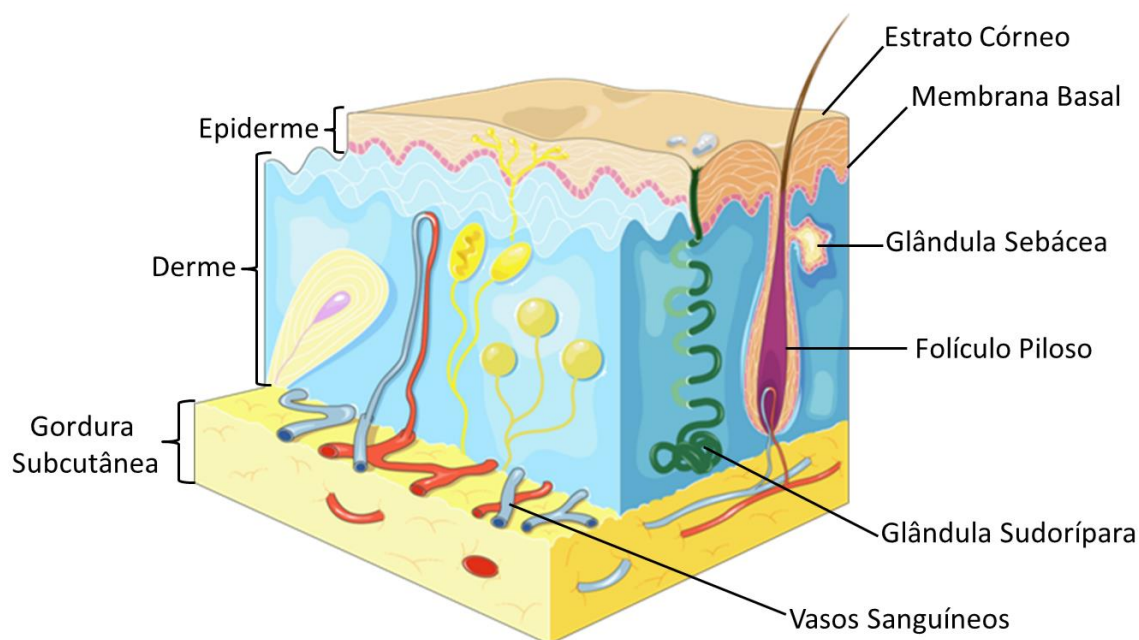
Sendo considerada como o maior órgão do corpo humano, a pele é responsável por recobrir aproximadamente 2 m<sup>2</sup> da superfície corporal, vindo a agir como uma interface primária entre o organismo humano e o ambiente que o circunda, desenvolvendo um importante papel na homeostase corporal e servindo como a primeira linha de defesa contra agentes microbianos patogênicos, substâncias químicas nocivas e injúrias físicas (ENGBRETSSEN; THYSSEN, 2016; LARSSON; LUCAS, 2016).

Composta, essencialmente, de três grandes camadas (epiderme, derme e hipoderme), a pele possui delimitações bem estabelecidas, com estruturas, propriedades e funções bem definidas (Figura 1). Dentre as camadas da pele, a derme é aquela que possui o maior nível de complexidade, sendo constituída de um emaranhado de fatores que se associam para garantir o seu melhor funcionamento (p.ex.: material fibrilar; células dérmicas, como os fibroblastos; receptores sensoriais; polissacarídeos; dentre outros), além de permitir a ocorrência de diferentes tipos de infiltrado celular migratório (p.ex.: macrófagos), importantes para o processo de resposta cicatricial e imune (FREINKEL; WOODLEY, 2011; EGAWA; KABASHIMA, 2016; LARSSON; LUCAS, 2016).

A funcionalidade de barreira da pele varia conforme alterações em características como a espessura, permeabilidade, localização anatômica, o meio ambiente em que o indivíduo se encontra inserido e a sua imunocompetência. Por possuir uma coletânea relativamente limitada de respostas a injúrias, a pele pode vir a se tornar um alvo vulnerável frente a infecções, fenômenos alérgicos e traumas mecânicos ou químicos. Quando há uma ruptura da integridade de função de barreira da pele, esta vem a montar uma resposta inflamatória e proliferativa, iniciada pelos queratinócitos, esforçando-se para restaurar a integridade de sua função de barreira (MOTTA *et al.*, 2011; DANILENKO, 2016).

Por tanto, a pele propicia uma interface que vai além de uma mera barreira física, órgão tátil e regulador térmico ou limitador da perda de água e da entrada de microrganismos e substâncias potencialmente nocivas, vindo a constituir uma barreira biologicamente ativa que pode ser considerada como a primeira linha de defesa do corpo humano contra agentes lesivos (FREINKEL; WOODLEY, 2011; EGAWA; KABASHIMA, 2016; LARSSON; LUCAS, 2016).

Figura 1. A pele e seus anexos.



Fonte: Modificado de Smart Servier Digital Art<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Disponível em: < [https://smart.servier.com/smart\\_image/skin/](https://smart.servier.com/smart_image/skin/)>. Acessado em: 04 nov. 2019.

Dermatites, ou eczemas, são as denominações dadas a um conjunto de doenças cutâneas que possuem caráter inflamatório proeminente. Nestas a área de pele afetada pode variar desde uma pequena porção até toda a superfície corporal (MOWAD, 2014; NIH, 2016; SBD, 2017).

Descritas por seu caráter sero-exsudativo e vermelhidão no local do acometimento, as várias classificações dermatológicas das dermatites possuem características distintas. Comumente em períodos de curta duração, podem ocorrer pequenas fissuras e bolhas, enquanto em casos mais crônicos a pele pode vir a se tornar ressecada e espessa (MOWAD, 2014; NIH, 2016; SBD, 2017).

Assim sendo, as dermatites integram um grupo de dermatoses inflamatórias de destaque por sua alta prevalência, cujo processo patológico funcional básico é um fenômeno pruriginoso que acomete a epiderme e a derme papilar (ALVES et al., 2013; MOWAD, 2014). Assim como qualquer outro processo inflamatório, as dermatites vêm a ocorrer como resultado da exposição do tecido alvo a estímulos lesivos, podendo estes provir de patógenos microbianos, agentes químicos irritantes ou componentes celulares tóxicos. Esse quadro inflamatório é tipicamente caracterizado por manifestações como vermelhidão, calor, dor e exsudação locais, além de edema (inchaço) e, após certo grau de acometimento, a modificação ou perda de função tecidual original da área afetada (MOWAD, 2014; NEDOSZYTKO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014).



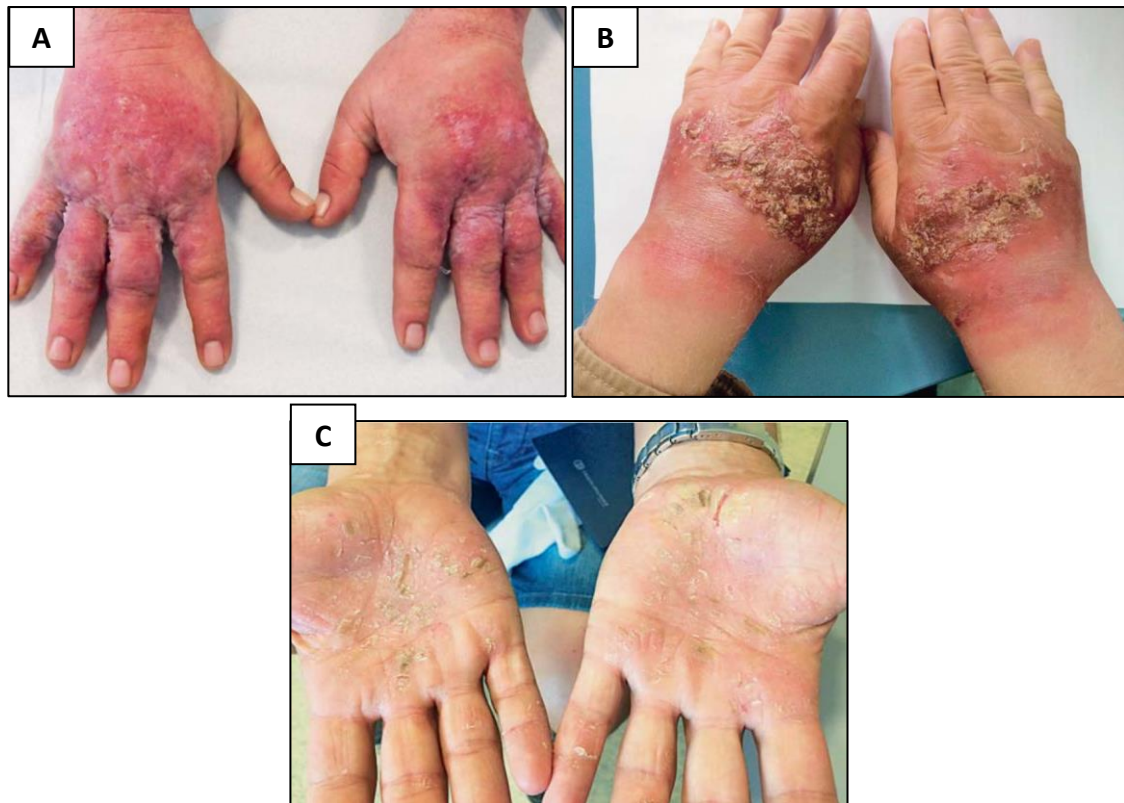
Neste grupo de doenças estão enquadradas tipificações distintas de dermatites, como, por exemplo, a dermatite atópica, dermatite de contato alérgica, dermatite de contato irritativa, dermatite herpetiforme, dermatite seborreica, dermatite numular e dermatite de estase (MOWAD, 2014; NIH, 2016; SBD, 2017). Suas causas muitas vezes são mal definidas, o que leva o diagnóstico a ser determinado com base em observações clínicas, consistindo na identificação dos sintomas e das lesões. No diagnóstico, prioritariamente, leva-se em conta o histórico médico familiar e do paciente, sua a idade, localização das manifestações e o carácter crônico ou agudo da manifestação, sendo o uso de biópsias cutâneas pouco utilizado, apesar de ser um identificador chave no diagnóstico diferencial (CLARO, 2011; MOWAD, 2014; SBD, 2017).

Vale salientar que as marcas na pele decorrentes do processo inflamatório também causam prejuízo social significativo, pois trazem consigo um carácter estigmatizante, onde os pacientes, por muitas vezes, são excluídos do convívio em sociedade (MOWAD, 2014; NIH, 2016; SBD, 2017).

Dentre as diferentes formas de ocorrência das dermatites, aquela que apresenta maior destaque, por sua alta taxa de ocorrência na população, vem a ser a dermatite de contato (DC). Também conhecida como dermatite venenata, a DC vem a ser um processo inflamatório cutâneo causado por um ou mais agentes exógenos que lesam direta ou indiretamente a pele, resultando geralmente em eritema e na formação de eczemas. Essa lesão pode ser causada por uma propriedade intrínseca do composto – dermatite de contato irritativa (DCI) –, ou por agentes que induzem uma resposta imune específica ao antígeno – dermatite de contato alérgica (DCA) (Figura 2) (KULBERG; SCHLIEMANN; ELSNER, 2014; MOSTOSI; SIMONART, 2016; ESSER; MARTIN, 2017; KOSTNER *et al.*, 2017).

De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na instauração da DC, suas duas formas tornam-se distinguíveis, por tanto, tendo a DCI sua ocorrência em virtude dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de agentes xenobióticos capazes de ativar o processo de imunidade inata da pele, enquanto isso a DCA requer a ativação da imunidade adquirida antígeno-específica levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras desse processo de inflamação cutânea (PRUDENTE, 2010).

Figura 2. Tipificações das dermatites de contato: Dermatite de contato alérgica (A). Dermatite de contato irritativa aguda (B). Dermatite de contato irritativa crônica (C).



Fonte: Novak-Bilić *et al.* (2018).

A dermatite de contato é, por tanto, uma dermatose de origem irritativa ou alérgica que vem a afetar diferentes faixas etárias, tendo uma maior incidência crianças na primeira infância (0 a 5 anos) e em adultos com idade entre 18 e 60 anos, representando nesses 90% de todas as doenças ocupacionais da pele, tendo reflexos sociais diretos (KULBERG; SCHLIEMANN; ELSNER, 2014; MOSTOSI; SIMONART, 2016; KOSTNER *et al.*, 2017; MCGUCKIN; GOVEDNIK, 2017).

Segundo estimativas do Hospital Israelita Albert Einstein (2017), as dermatites vêm a acometer a cada ano aproximadamente 2 milhões de pacientes no Brasil, o que em percentuais censitários para o ano de 2017 vem a ser menos de 1 % da população brasileira.

A DCI é uma doença com prevalência crescente nos países industrializados, sendo caracterizada por manifestações cutâneas pruriginosas, lesões eczematosas, acompanhada por infiltração excessiva de células inflamatórias, imunodisregulação local, e função de barreira epidérmica comprometida (YUN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015).

A DCI ainda pode ser dividida em duas formas distintas, sendo estas a forma aguda (DCIA) e a crônica (DCIC). Enquanto a forma aguda ocorre após uma única exposição ao agente lesivo, com uma severidade que pode ir desde um leve eritema e vesículação à necrose tecidual, na forma crônica, que ocorre após a exposição repetida e acumulativa ao

agente lesivo, observa-se alteração da função de barreira da pele, sendo manifestada clinicamente pela secura, hiperqueratose, descamação, fissuras e crostas em uma base levemente eritematosa (Figura 2) (KULBERG; SCHLIEMANN; ELSNER, 2014).

## 1.2 Dermatite de Contato Irritativa

### 1.2.1 Fisiopatologia

O sistema imune, assim como o inflamatório, exerce um importante papel nas patologias que acometem a pele como, por exemplo, a psoríase, a dermatite e o câncer (JOHNSON-HUANG *et al.*, 2009; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

O processo inflamatório da pele envolve a liberação de um vasto número de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, prostaglandinas e peptídeos vasoativos, resultando em alterações na permeabilidade vascular e na ocorrência de infiltrado celular. Este processo tem as citocinas como moduladores da inflamação, tendo um especial destaque para a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (LEVY, 1996; TURNER *et al.*, 2014; MOHLENHOFF *et al.*, 2017; PATTARINI; SOUMELIS, 2017).

O evento inicial da DCI é o rompimento da barreira epidérmica pelo agente lesivo, acabando por resultar em um aumento da permeabilidade da pele, o que leva a perda de água transepidérmica, a indução da liberação de citocinas, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8 (IL-8) e a liberação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) dos queratinócitos (FLUHR *et al.*, 2008; NEDOSZYTKO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014; MOSTOSI; SIMONART, 2016).

As citocinas secretadas pelos queratinócitos epidérmicos, particularmente, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  participam em várias desordens imunoinflamatórias na pele (GRÖNE, 2002; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004; NGUYEN; SOULIKA, 2019). O TNF- $\alpha$  liberado dos queratinócitos apresenta efeitos pleiotrópicos que levam ao aumento da expressão de moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade, aumentando a expressão de moléculas de adesão, como as moléculas de adesão de leucócitos (ELAM-1) e moléculas de adesão intercelulares (ICAM-1), o que facilita o subsequente influxo de células inflamatórias nas proximidades das células endoteliais (NICKOLOFF; TURKA, 1993; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

O TNF- $\alpha$  também promove reações imunoinflamatórias via ativação e indução de IL-6, IL-1 $\beta$  e NF- $\kappa$ B, esse último é considerado o elo chave entre o sistema imune inato e o adaptativo, pois ao translocar-se ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (MACHADO, 2010; MAZZA; ROSSI; WEINBERG, 2010).

Na pele, o NF- $\kappa$ B regula a expressão de genes envolvidos com a iniciação da resposta inflamatória, incluindo genes de citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, metaloproteinases de matriz e óxido nítrico sintase, tendo, também um importante papel na ativação, migração e polarização de células dendríticas. A ativação excessiva desta sinalização pode induzir inflamação crônica e doenças inflamatórias na pele (BELL *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2001; AN, *et al.*, 2016; ESSER; MARTIN, 2017; PATTARINI; SOUMELIS, 2017).

As citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8 (IL- 8) são produzidas pela ativação da IL-1 $\alpha$ . A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , que ativam células dendríticas e células T, com maior produção de citocinas, quimiocinas, VEGF e indução da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (proteína 1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais e fibroblastos os quais em conjunto levam a perpetuação da inflamação cutânea. No meio dessa cascata fisiopatológica surgem as citocinas contra regulatórias na tentativa de controlar a inflamação, como a IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1 (BONIFATI *et al.*, 1994, WEI *et al.*, 2011; ESSER; MARTIN, 2017; PATTARINI; SOUMELIS, 2017).

Apesar de ainda não se conhecer precisamente toda a cascata de sinalização envolvida na ativação de citocinas na DCI, já está bem estabelecido que as citocinas envolvidas no processo inicial de exposição a um irritante são IL-1 e TNF- $\alpha$  e que o efeito sinérgico destas duas citocinas resulta em ativação e liberação de citocinas secundárias, como IL-6, CXCL8 (IL-8) e MCP-1 (NEDOSZYTKO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014; PATTARINI; SOUMELIS, 2017).

Assim, a patogênese da DCI pode ser definida como um processo complexo que envolve muitas variáveis individuais na produção de um “arcabouço” de sinalização de citocinas, que podem depender da natureza do agente lesivo e de sua intensidade de reação irritativa, o que também pode vir a definir o melhor tratamento de escolha para DCI (MOWAD, 2014; MARTIN; RUSTEMEYER; THYSSEN, 2018; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

### 1.2.2 Tratamento

No tratamento tópico da dermatite de contato o uso regular de emolientes melhora a função de barreira da pele, sendo que o uso de corticosteroides tópicos vem se mostrando mais eficiente, principalmente se o alérgeno ou agente irritante for evitado. Já o uso de corticosteroides sistêmicos, por sua ação imunossupressora e anti-inflamatória, pode ser necessário e efetivo para uso em curto prazo, durante uma fase aguda de contato extenso ou em casos mais graves de acometimento (LEE; SON; CHO, 2016; MOSTOSI; SIMONART, 2016).

Os glicocorticoides ao se ligarem aos receptores de glicocorticoides promovem a inibição da expressão de uma série de genes correlacionados com a inflamação, como, por exemplo, aqueles responsáveis pela geração de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão que estão intimamente envolvidas no processo inflamatório (SCHOEPE *et al.*, 2011; RABIT *et al.*, 2016; CHATZIDIONYSIOU *et al.*, 2017).

O seu uso contínuo pode ser responsável por ocasionar efeitos colaterais severos (p.ex.: síndrome de Cushing, atrofia cutânea, hipertricose e alterações no processo de cicatrização) (SCHOEPE *et al.*, 2011; RABIT *et al.*, 2016; CHATZIDIONYSIOU *et al.*, 2017).

O tratamento sistêmico com imunomoduladores (p. ex.: metotrexato, ciclosporina), faz-se necessário quando o paciente não responde as medidas de tratamento padrão, normalmente isso acontece em quadros onde a dermatite de contato evoluiu para uma fase crônica (GELMETTI; WOLLENBERG, 2014; WERFEL *et al.*, 2014; LEE; SON; CHO, 2016).

O uso de imunomoduladores macro-lactâmicos, como o tacrolimus e o pimecrolimus, está entre algumas das terapias que já demonstraram uma boa efetividade ao serem empregadas no tratamento de afecções inflamatórias cutâneas, isso por inibirem de forma seletiva a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ . Mais recentemente o emprego de produtos biológicos anti-citocinas, que vem a interferir diretamente na produção ou sinalização das citocinas pró-inflamatórias, veio fomentar o arsenal terapêutico dos tratamentos já disponíveis no mercado (WITTMANN; MCGONAGLE; WERFEL, 2014; LEE; SON; CHO, 2016). No entanto, uma das principais desvantagens destas terapias biológicas é o seu alto custo agregado e a possibilidade do desenvolvimento de resistência à utilização desses tratamentos, isso ocorre em decorrência da produção de anticorpos contra o emprego desses agentes biológicos. Além disso, a forma de administração dessa linha terapêutica, seja

subcutânea ou intravenosa, vem a ser incômoda para o paciente (LIU *et al.*, 2012; LEE; SON; CHO, 2016).

Atualmente a terapêutica de tratamento da DC traz consigo uma série de obstáculos, como a possibilidade de tolerância aos medicamentos, ocorrência de efeitos colaterais, de toxicidade e de inconvenientes vinculados à administração do medicamento, sendo o conjunto destas uma forte desvantagem nos tratamentos atuais (NEDOSZYTKO *et al.*, 2014; HORINOUCI *et al.*, 2017).

Sendo assim, pode-se inferir que tratamentos que tenham como alvo farmacológico um mediador específico da pele e que sejam prioritariamente de fácil aplicação tópica, podem ser uma ferramenta terapêutica eficaz na redução dos efeitos colaterais sistêmicos em relação aos fármacos amplamente utilizados na atualidade (WITTMANN; MCGONAGLE; WERFEL, 2014).

### **1.3 Produtos Naturais e seu uso no Tratamento da Dermatite**

Segundo Nedoszytko *et al.* (2014) e Horinouchi *et al.* (2017), é em decorrência da miscelânea de problemas envolvendo as atuais opções terapêuticas que há um crescente interesse no desenvolvimento de novas terapias e drogas para o tratamento de distúrbios inflamatórios da pele, de maneira segura e eficaz, sendo que, nesse contexto, os produtos naturais, em especial as plantas medicinais, vêm a se tornar uma fonte promissora para a descoberta de novas terapias.

Embora haja uma vasta variedade de tratamentos disponíveis para combater as mais diversificadas formas de afecções cutâneas da pele, reações adversas graves, custos e formas de tratamento impopulares geralmente vêm a limitar o seu uso. Em contrapartida, certos métodos de ocorrência natural tem um baixo custo associado, sendo eficazes no tratamento dessas afecções, demonstrando possuir menos efeitos colaterais associados ao seu uso. Além disso, a informação etnofarmacológica encurta o período até a obtenção dos recursos brutos para a descoberta de um composto bem-sucedido, seguro e efetivo (HORINOUCI *et al.*, 2017; MAN *et al.*, 2017).

Os efeitos benéficos desses compostos de ocorrência natural podem ser atribuídos a vários fatores, dentre eles a inibição da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, da produção de IgE, da ação sobre a infiltração de células inflamatórias (p. ex.: macrófagos), da liberação de histamina e/ou o reforçando a função de barreira de permeabilidade epidérmica. Uma vez que os medicamentos à base de plantas têm baixo

custo associado, estão amplamente disponíveis e geralmente tem um grau elevado de segurança, podem ser alternativas valiosas para o tratamento de doenças de pele, particularmente para aqueles pacientes que não se adequaram à utilização das terapias atuais (HORINOUCI *et al.*, 2017; MAN *et al.*, 2017).

É nesse contexto que, ao longo da história, inúmeros estudos têm sido implementados acerca da utilização de produtos de origem natural no combate dos processos inflamatórios da pele (MIRAKHMEDOV; BELOVA, 1983; LEVIN; MAIBACH, 2002; GIL *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2019), podendo-se encontrar na literatura trabalhos nos mais diversos âmbitos de abrangência, passando por estudos pré-clínicos (FINBERG; MUNTINGH; VAN RENSBURG, 2015; JEGAL *et al.*, 2019) que implementam os conhecimentos das chamadas ciências de base, progredindo até investigações clínicas mais simples (SCHLIEMANN-WILLERS *et al.*, 2002) ou mesmo mais complexas, como estudos clínicos randomizados controlados (KANG *et al.*, 2019) e densas revisões sistemáticas (TRESCH *et al.*, 2019).

#### **1.4 *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae)**

Conforme Gama, Barbosa e Oliveira (2011), a família Sapotaceae é composta por 11 gêneros e cerca de 450 espécies, encontrando-se prioritariamente presente em florestas úmidas, embora possam existir em áreas de savana e em zonas semiáridas, estando geograficamente disposta desde a Região Sul dos Estados Unidos até o Paraguai, Uruguai e Chile.

A *Sideroxylon obtusifolium* é conhecida popularmente por várias denominações, tais como quixaba, quixabeira, sacutiaba, rompe-gibão, coronilha, miri, maçaranduba da praia, guaraniná, ibirá-niná, possuindo ainda alguns sinônimos científicos como *Bumelia sartorum*, *Bumelia obtusifolia*, *Bumelia excelsa*, *Bumelia buxifolia*, *Bumelia dunantii*, *Bumelia cruegerii*, *Bumelia nicaraguensis* e *Lyciodes buxifolia* (DELFINO *et al.*, 2005, LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 3. *Sideroxylon obtusifolium* (Árvore, Folhas, Flores e Frutos).



Fonte: Acervo pessoal – Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, Universidade Federal do Ceará.

A casca e folhas da *S. obtusifolium* são utilizadas popularmente para o tratamento de úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação crônica, lesão genital, inflamação dos ovários, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos, afecções odontológicas, diabetes e como expectorante (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; BELTRÃO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; AGRA *et al.*, 2007; ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010).

Estudos farmacológicos comprovaram a ação anti-inflamatória sistêmica (ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010, AQUINO *et al.*, 2016), hipoglicemiante e antibacteriana (LEANDRO *et al.*, 2013; AQUINO *et al.*, 2016), fazendo com que *S. obtusifolium* seja considerada uma espécie importante no uso da terapia tradicional (AGRA *et al.*, 2007, BELTRÃO *et al.*, 2008, PEDROSA *et al.*, 2012).



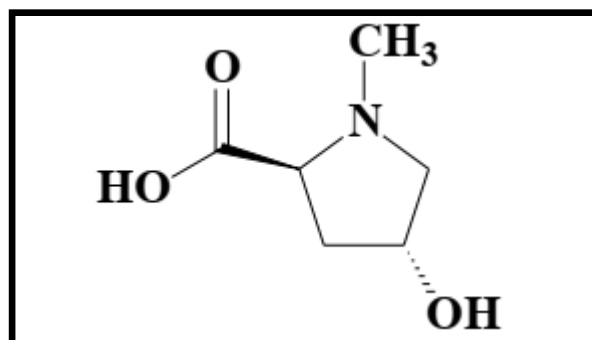
Pereira *et al.* (2016) e Sampaio *et al.* (2017) demonstraram o potencial antifúngico de extratos e frações hidroalcoólicas provenientes da *S. obtusifolium* contra biofilmes de *Candida albicans*, tendo Desmarchelier *et al.* (1999) demonstrado uma ação antioxidante associada a esta espécie, o que faz com que esta planta apresente uma importante relevância frente a atividade antiinflamatória relatada popularmente. Passos *et al.* (2012) analisaram os metabólitos presentes nas folhas de *S. obtusifolium* e identificaram a presença de flavonoides, saponinas e triterpenos, sendo os dois primeiros os seus principais constituintes. A análise química da fração metanólica do extrato aquoso das folhas *S. obtusifolium*, realizada pelo Departamento de Química Orgânica da UFC, evidenciou a presença de um derivado do aminoácido L-prolina, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina, como sendo o seu componente majoritário (AQUINO *et al.*, 2017).

#### 1.4.1 N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina

A N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (Figura 4) é derivada do aminoácido L-prolina, essa última é comumente empregada como um suplemento dietético com o intuito de se estimular a síntese de colágeno no organismo (VITAGLIANO *et al.*, 2001, BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2006). Já a N-metil-(2s, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina é uma molécula de comum ocorrência em outras espécimes vegetais, como por exemplo, *Dalbergia symphathetica* (WINKLER, 2006), *Psittacanthus calyculatus* (MOUSTAPHA *et al.*, 2011), *Ipomoea carnea* (HARAGUCHI *et al.*, 2003) e *Aglaia andamanica* (PURIPATTANAVONG, *et al.*, 2000), dentre outras.

Puripattanavong *et al.* (2016) evidenciaram uma atividade anti-HIV-1 para a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina. Recentemente Aquino *et al.* (2017) demonstraram pela primeira vez, o potencial anti-nociceptivo e anti-inflamatório deste composto. Enquanto Aquino *et al.* (2019) demonstraram o potencial cicatrizante deste composto, relacionando-o com suas atividades anti-inflamatória e antioxidante.

Figura 4. Estrutura Química da Molécula N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina.



Fonte: Aquino *et al.* (2017).

## 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito anti-inflamatório da fração metanólica de *S. obtusifolium* (FMSO), assim como de seu principal constituinte, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP), em modelos de dermatite de contato irritativa aguda (DCIA) e crônica (DCIC) em camundongos e em modelos experimentais *in vitro*, investigando assim os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antiedematogênica de FMSO e de MTHP em modelo de dermatite de contato irritativa aguda induzida por 13-acetato-12-o-tetradecanoil-forbol (TPA), assim como no modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de *Croton*;

- Avaliar a atividade de FMSO e de MTHP sobre a migração de neutrófilos (atividade da mieloperoxidase em tecido), quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1 (ELISA), além de avaliar a expressão gênica para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , realizando, também, a análise histológica em modelo de dermatite de contato irritativa por TPA em camundongos, assim como no modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de *Croton*;

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos FMSO e MTHP em macrófagos murinos (células RAW 264.7).

- Avaliar o efeito de FMSO e MTHP sobre a produção de mediadores inflamatórios (nitrato/nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-6) e no estresse oxidativo em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.

## 3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Com base no conhecimento etnofarmacológico da *S. obtusifolium* e da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina em modelo de edema de pata e de peritonite, o presente estudo teve por propósito investigar o efeito anti-inflamatório tópico da fração metanólica das folhas de *S. obtusifolium*, assim como de seu principal constituinte, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina, em modelos experimentais de dermatite de contato irritativa em camundongos e em modelos *in vitro* complementares, verificando assim os seus possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

#### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 Material vegetal

Este estudo foi registrado junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) sob o N° A5305D6, sendo as folhas de *Sideroxylon obtusifolium* coletadas na região de Mauriti/Ceará e identificadas pela botânica Dr.<sup>a</sup> Maria Arlene Pessoa da Silva, sendo depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, pertencente à Universidade Regional do Cariri (URCA), com exsicata de N° 10.648, em setembro de 2014.

A fração metanólica das folhas de *S. obtusifolium* (FMSO), assim como seu constituinte majoritário, a N-metil-(2S,4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP), foram fornecidas pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha da Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sendo este também o responsável pela análise química das amostras.

#### 4.2 Obtenção e caracterização química da fração metanólica das folhas de *S. obtusifolium* (FMSO) e de seu principal constituinte, a N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP)

Todo o processo de obtenção e caracterização das amostras foi realizado no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira. Assim como citado por Aquino *et al.* (2017), e aqui detalhado como o processo, onde as folhas de *S. obtusifolium* foram previamente secas à sombra, sendo posteriormente moídas e acondicionadas em sacos de algodão. Os sacos contendo o material vegetal foram submetidos ao processo de fervura em água destilada (100g de folhas secas/500 mL de água destilada) por 15 min. Esta etapa foi repetida por duas vezes com as amostras. O decocto obtido deste processo foi liofilizado resultando em 34,86 g de um material sólido de cor castanho claro, sendo denominado como DFSO.

Um total de 10 g de DFSO foi acondicionado em um cartucho de celulose e submetido ao processo de extração com metanol em aparelho de *Soxhlet*. A solução de metanol obtida por *Soxhlet* foi rotaevaporada sob baixa pressão, o que produziu 6,76 g de um pó amorfo de cor castanho amarelado, designado de FMSO. FMSO foi caracterizado por meio de seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN <sup>1</sup>H) e

Carbono-13-CPD (RMN  $^{13}\text{C}$ ), obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DPX-300 (300 MHz), pertencente ao Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará.

Ao todo seis alíquotas de FMSO, contendo um grama cada, foram solubilizadas em 3,5 mL de água destilada, sendo cromatografadas sobre uma coluna Phenomenex em fase sólida extrativa de fase reversa, Strata<sup>®</sup>, 20 g, 60 mL e com tubos giga, previamente condicionados com metanol e equilibrado com água destilada. As frações deste material cromatografado (20 mL) foram coletadas inicialmente com o uso de água destilada como eluente, seguida de eluição por uma mistura gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH (variando de 10 a 50 %, e em seguida até MeOH absoluto), sendo a última eluição realizada com o uso de uma solução de THF/MeOH 1:1.

As frações aquosas foram reunidas e liofilizadas, após análises por cromatografia de camada delgada (CCD), fornecendo 1,7 g do composto N° 01. Em decorrência dos dados de Ressonância (RMN) (ANEXO I), o composto N° 01 apresentou compatibilidade com a estrutura de um derivado de 4-hidroxi-L-prolina, sendo a estrutura sugerida confirmada por novas análises de RMN e a estereoquímica relativa por análise de espectro NOESY.

A estrutura final, incluindo a estereoquímica absoluta, foi definida a partir da rotação específica negativa do composto N° 01, e por comparação aos dados disponíveis na literatura. Assim, o composto N° 01 foi caracterizado como o N-metil-(2S, 4R)-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP) (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>; 145,16 g/mol; nome alternativo: ácido (2S,4R)-hidroxi-1-metilpirrolidina-2-carboxílico ou ácido hidroxil-hidrínico) (Figura 4) com rendimento aproximado, ao final de todo o processo extrativo e de purificação, de 1,7% em relação às 100 g iniciais de folhas secas empregadas no início do processo. MTHP foi então caracterizado como sendo o principal constituinte de FMSO.

### 4.3 Protocolos experimentais *in vivo*

#### 4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) da variedade *Swiss*, machos, adultos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, à temperatura média de  $24 \pm 2$  °C em ciclos claro-escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow<sup>®</sup>) e água potável à vontade. Após os procedimentos experimentais,

os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.) e lidocaína (10 mg/mL, i.p.), de acordo com o protocolo estabelecido pela Resolução nº. 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC e aprovado sob o protocolo CEUA nº 9255280218 (ID 000223) (ANEXO II).

#### 4.3.2 Avaliação da Toxicidade

Em decorrência da reduzida quantidade de MTHP disponível para a realização dos experimentos e frente à necessidade de se avaliar uma possível toxicidade dos compostos em teste em modelos experimentais apropriados, empregou-se do uso de FMSO como único elemento para compor este perfil de análise.

##### 4.3.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda por Via Oral

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada seguindo as diretrizes da OCDE 425 (OECD GUIDELINE, 2001). Para tanto, os camundongos foram divididos em dois grupos de 3 animais cada. O grupo veículo recebeu, por via oral, Tween 80 (2% em salina), e o grupo teste recebeu, por via oral, 2000 mg/kg de FMSO. Imediatamente após a administração da FMSO os animais foram observados por 1, 2, 4, 6 e 8 horas e a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, para verificar a ocorrência e número de mortes. Além disso, o peso dos animais e do consumo de água e ração, também foi avaliado diariamente.

##### 4.4.2.2 Teste de Toxicidade Cutânea por Múltiplas Aplicações

A avaliação da toxicidade cutânea foi realizada com base no modelo descrito por Yimei *et al.* (2008), onde os camundongos foram anestesiados e tricotomizados em seu dorso, com o auxílio de lâmina de barbear, deixando-se aproximadamente 20% de seu dorso desnudo. Os camundongos (n = 18) foram deixados sob observação durante 24 h, a fim de verificar se não havia respostas cutâneas anormais incluindo irritação, edema, vermelhidão, prurido e inflamação ou quaisquer outros sintomas presentes na área tricotomizada.

Após este tempo os camundongos foram novamente anestesiados e divididos igualmente em dois grupos (n = 9/grupo). Um foi submetido à escarificação leve da pele do dorso dos animais, onde a porção da pele tricotomizada foi escarificada com auxílio de papel abrasivo até o fluido tecidual tornar-se perceptível, mas não o sangue; tendo o outro grupo permanecido com a pele tricotomizada intacta, vindo a servir como grupo controle.

Ambos os grupos foram igualmente divididos em três subgrupos (n = 3/grupo), sendo um grupo *Sham*, onde os animais não tiveram nenhuma administração realizada; o grupo Veículo, onde os animais foram administrados diariamente por via tópica, durante sete dias, com o veículo de diluição da FMSO (2% de Tween 80 em água destilada); e o grupo Tratamento, no qual, durante os sete dias de acompanhamento dos animais, veio a ser administrado por via tópica a FMSO no volume de 0,5 mL (1 mg/mL), por administração tópica, em cada área tricotomizada.

A administração de FMSO ou veículo foi descontinuada no oitavo dia. Duas variáveis (eritema e edema) foram monitoradas durante 10 dias a partir do primeiro tratamento, com base no sistema de pontuação da diretriz do “*Chinese Drug Pharmacotoxicological Study and the Technical Requirements*” resumida por Yimei *et al.* (2008) e descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Gravidade da reação cutânea em resposta à irritação dérmica local avaliada em relação às variáveis eritema e edema.



<b>Característica em Observação</b>	<b>Sintoma</b>	<b>Pontuações</b>
Eritema	Nenhum	0
	De pouca visibilidade	1
	Visível	2
	Moderado a grave	3
	Eritema vermelho escuro com sarna	4
Edema	Nenhum	0
	De pouca visibilidade	1
	Elevação bem delimitada	2
	Elevação com até cerca de 1 cm	3
	Elevação maior que 1 cm	4

As aferições de edema aqui realizadas foram efetivadas com o auxílio de um paquímetro digital (100.174B/Digimess®).

Fonte: Adaptado de Yimei *et al.* (2008).

#### 4.4.3 Dermatite de Contato Irritativa Aguda (DCIA) Induzida por 13-acetato-12-*o*-tetradecanoil-forbol (TPA)

A dermatite de contato irritativa aguda por TPA foi induzida pelo método descrito por Recio *et al.* (2000). Os camundongos foram divididos em grupos ( $n = 8/\text{grupo}$ ), que receberam uma aplicação tópica de uma solução de TPA diluído em acetona ( $2,5 \mu\text{g}/\text{orelha}$ ;  $20 \mu\text{L}$ ) na orelha direita. Os animais tratados com FMSO ou MTHP receberam topicamente as doses de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, em um volume de  $20 \mu\text{L}/\text{orelha}$ , imediatamente após a administração do TPA. O grupo controle positivo recebeu dexametasona (Dexa; 0,1 mg/orelha;  $20 \mu\text{L}$ ). No grupo controle Veículo os animais foram tratados com o veículo (2% Tween 80 em água destilada;  $20 \mu\text{L}/\text{orelha}$ ).

A mensuração do edema foi realizada por aferição da espessura da orelha, 0 h (antes da administração do TPA), 4 h, 6 h e 24 h após a administração do TPA, utilizando-se para isso de um paquímetro digital (100.174B/Digimess®). Imediatamente após a última aferição do edema (24 h após a aplicação do TPA) os animais foram eutanasiados e as amostras de tecidos das orelhas (6 mm) foram coletadas para a determinação da atividade

da enzima mieloperoxidase (MPO), dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1, análise histológica e análises de expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .

#### 4.4.3.1 Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO)

As amostras de orelhas (6 mm) coletadas foram imediatamente pesadas e homogeneizadas em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6. O homogenato foi então submetido a três ciclos, de 5 min, alternando de congelamento (nitrogênio líquido) ao descongelamento (sonicador).

As amostras foram centrifugadas a 2.000 g, 4 °C, por 15 min. Os níveis da atividade de MPO contidos no sobrenadante foram analisados após a adição de tampão fosfato (50 mM, pH 6) contendo 0,167 mg/mL de hidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorbância, a 470 nm, foram medidas nos tempos 0 e 5 min, assim como descrito por Bradley, Christensen e Rothstein (1982).

#### 4.4.3.2 Determinação dos Níveis Teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ e MCP-1 em Tecido Proveniente do Modelo de Dermatite Aguda Induzida por TPA

Para fins de processamento e efetivação das análises, empregou-se das melhores doses de FMSO e MTHP obtidas nos testes anteriores. Sendo assim, a dose de 0,06 mg/orelha foi a escolha ideal para o devido prosseguimento com os testes empregando FMSO e MTHP e para comparativo entre as amostras. As amostras de orelhas (6 mm) coletadas foram imediatamente homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) com 1 mM de EDTA e do coquetel inibidor de protease Halt™ 10x (1:10, Thermo Scientific®, USA), o homogenato foi então incubado no gelo por 15 min. Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1 foram determinados utilizando kits de ELISA específicos (Merck®, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e os resultados expressos em pg/mL (MURAKAWA *et al.*, 2006).

#### 4.4.3.3 Análise Histológica

Para fins de processamento e efetivação das análises, empregou-se das melhores doses de FMSO e MTHP obtidas nos testes anteriores. Sendo assim, a dose de 0,06 mg/orelha foi a escolha ideal para o devido prosseguimento com os teste empregando FMSO e MTHP e para comparativo entre as amostras. As amostras de tecidos das orelhas foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada por um período de 24 h, até o início do processo de montagem das lâminas.

O processo de montagem das lâminas teve prosseguimento com a desidratação dos tecidos, blocagem em parafina, secção dos blocos em cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  em micrótomo, sobreposição em lâminas para histologia e coloração com hematoxilina e eosina (H&E). A análise qualiquantitativa foi realizada por patologista especializado, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Negreiros Nunes Alves do Departamento de Clínica Odontológica – FFOE/UFC e sem conhecimento dos grupos experimentais.

Os tecidos das orelhas ( $n = 4$ ) foram analisados segundo a Tabela de Escores (Tabela 2) e a espessura relativa do edema foi medida a partir das pontas das cristas epiteliais integras de cada orelha, sendo os valores médios de 6 cristas epiteliais contabilizados para compor a média, utilizando-se um aumento de 200x (PINTO *et al.*, 2015).

Tabela 2. Escores Empregados Para a Análise Histológica.

Variável	Escore	Descrição	
Edema	0	Ausente	
	1	Presente	
Infiltração de Células Inflamatórias	0	Ausente	
	1	Leve	
	2	Moderado	
	3	Intenso	
Vasos Ectásicos	0	Ausente	
	1	Raros	
	2	Numerosos	
Neoformação Vascular	0	Presente	
	1	Ausente	
Hemorragia	0	Presente	
	1	Ausente	
Mastócitos	0	Presente	
	1	Ausente	
Cartilagem	0	Presente	Normal
	1	Presente	Hipertrofiada
	2	Ausente	-

4.4.3.4 Expressão relativa do RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em Tecido Proveniente do Protocolo de Dermatite Aguda por TPA

Para fins de processamento e efetivação das análises, empregou-se das melhores doses de FMSO e MTHP obtidas nos testes anteriores. Sendo assim, a dose de 0,06 mg/orelha foi a escolha ideal para o devido prosseguimento com os testes empregando FMSO e MTHP e para comparativo entre as amostras.

#### 4.4.3.4.1 Extração do RNA tecidual

O RNA total das amostras de tecido dos camundongos submetidos ao protocolo de dermatite aguda induzida por TPA, item 4.4.3, foi extraído utilizando-se do reagente de lise Qiazol (100 mg de tecido para cada 1 mL de reagente de lise). As amostras foram homogeneizadas, durante 3 minutos, em um TissueLyser LT (Qiagen). Em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio, em cada homogenato, de acordo com as indicações do kit RNeasy Lipid Tissue Mini, Qiagen. As concentrações de RNA foram estimadas em Nanodrop na absorvância de 260 nm. A qualidade do RNA extraído foi determinada pela razão entre os valores obtidos nas absorvâncias de 260/280 nm, onde os valores entre 1,8 - 2,0 indicam alto grau de pureza do RNA extraído (PAN et al., 2002).

#### 4.4.3.4.2 Transcrição reversa e PCR em tempo real (RT-qPCR)

As amostras de RNA (1  $\mu$ g) foram reversamente transcritas para cDNA, de acordo com as indicações do fabricante do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher). As condições do ciclo termal para a reação de transcrição reversa (RT-qPCR) foram 25°C-10 min, 37°C-120 min e 85 °C- 5 minutos.

Para a reação do PCR em tempo real foi utilizado o kit master mix GoTaq® contendo a sonda SYBER green® (PROMEGA). Esta reação foi realizada em 40 ciclos no aparelho Mx3005p PCR System, com desnaturação em 95°C, por 2 minutos, e anelamento/extensão em 59/60 °C, por 1 minuto, para os *primers* TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e  $\beta$ -actina. Para o primer da IL-1 $\beta$  o anelamento/extensão foi de 60/60°C também por 1 minuto.

A sequência gênica dos *primers* e a temperatura de anelamento são mostradas na Tabela 3. A curva de melting foi utilizada para avaliar a especificidade dos *primers* na amplificação dos genes de interesse. Os dados foram analisados pela comparação do *Cycle threshold* (Ct) de cada amostra com as médias relativas à quantificação com o gene de referência ( $\beta$ -actina) para obtenção do delta-delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN,

2001). Os produtos gerados pela RT-qPCR foram corridos em gel de agarose com a finalidade de se verificar a ocorrência de mais de um produto, como possível contaminante da inespecificidade dos *primers*.

Tabela 3. Sequência gênica e temperatura de anelamento (°C) dos *primers* utilizados na RT-qPCR.

Gene	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Forward: 5' CCC ACT CTG ACC CCT TTA CT 3' Reverse: 5' TTT GAG TCC TTG ATG GTG GT 3'	59
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Forward: 5' GCC ACC TTT TGA CAG TGA TG 3' Reverse: 5' AAG GTC CAC GGG AAA GAC AC 3'	60
<b>IL-6</b>	Forward: 5' CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG 3' Reverse: 5' AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG 3'	59
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Forward: 5' GGG AAT GGG TCA GAA GGA CTC 3' Reverse: 5' GGT GTG GTG CCA GAT CTT CTC 3'	59

Fonte: Syed et al. (2015); Chrobok et al. (2018) e Cheng et al. (2019).

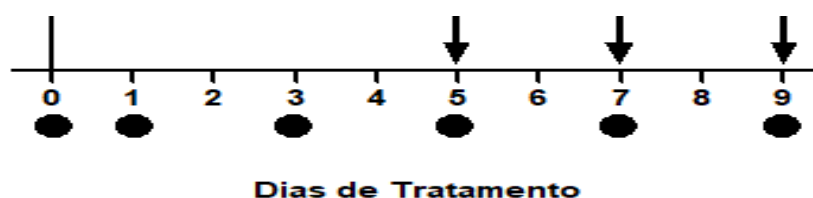
#### 4.4.4 Dermatite de Contato Irritativa Crônica por Óleo de *Croton*

A dermatite de contato irritativa crônica por óleo de *Croton* foi induzida segundo o procedimento descrito por Schiantarelli *et al.* (1982). Os camundongos foram divididos em grupos (n = 8/grupo), receberam na orelha direita aplicação tópica de 20  $\mu$ L de uma solução de óleo de *Croton* a 2,5% diluído em acetona (2,5  $\mu$ g/orelha) durante 10 dias. A partir dos resultados com FMSO e MTHP, nos experimentos descritos anteriormente, foram escolhidas as melhores doses (0,06 mg/orelha para FMSO e 0,06 mg/orelha para MHTP) para administração no modelo crônico. A dexametasona, controle positivo do experimento, foi utilizada na dose de 0,1 mg/orelha.

No dia 0 foram mensuradas as espessuras das orelhas, com auxílio de um paquímetro digital (100.174B/Digimess®). Nos dias 1 e 3, foi induzida a inflamação com aplicação tópica de óleo de *Croton* e após 6 h foi mensurado o edema. Nos dias 5, 7 e 9 foi induzida a inflamação em todos os grupos e, logo em seguida, os animais dos grupos testes foram tratados com FMSO, MTHP ou Dexa, sendo que após 6 h, o edema foi mensurado em todos os grupos. Nos dias 2, 4, 6 e 8 não foi feita nenhuma aplicação e nem aferição de edema. No dia 10 os animais foram eutanasiados e as amostras de tecidos das orelhas foram

coletadas para a análise histológica e da atividade de mieloperoxidase (MPO).

Figura 5. Esquema pontual do modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de *Croton*.



## 4.5 Protocolos experimentais *in vitro*

### 4.5.1 Cultura de Células

Todos os experimentos realizados em cultivo celular foram devidamente executados junto ao laboratório NB2 do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da UFC, coordenado pelo Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim e pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Para o cultivo celular, foi utilizada a linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico, contendo 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.5.2 Diluição das Amostras e Número Amostral

Para os testes *in vitro* as amostras foram previamente solubilizadas em DMEM suplementado contendo 1% de DMSO (veículo empregado), seguindo as diluições necessárias para a obtenção das concentrações preconizadas em cada um dos testes realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n = 6).

### 4.5.3 Definição de Concentrações de Trabalho e Avaliação de Segurança

#### 4.5.3.1 Avaliação da Viabilidade Celular Pelo Método do MTT

A viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 frente às substâncias em teste foi determinada utilizando do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Este método foi descrito inicialmente por Mosmann (1983) e adaptado por outros autores (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987; REILLY *et al.*, 1998), tendo por base a avaliação da atividade metabólica de células viáveis por desidrogenases mitocondriais, a partir da redução do MTT ao sal de formazan, que possui uma coloração violeta característica.

Após plaqueamento (200 µL/poço; placa de 96 poços; 1x10<sup>5</sup> células/mL) e incubação por 24 h, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos FMSO (3,12 – 10000 µg/mL) ou MTHP (3,12 – 10000 µg/mL) e novamente incubadas por mais 24 h. Utilizou-se como grupo controle positivo células incubadas com o mesmo veículo empregado na diluição das amostras, o dimetilsulfóxido (DMSO 1% no volume total de meio no poço), e como controle negativo o grupo denominado como Tx, onde as células foram incubadas com DMSO 50%, sendo este um estímulo lesivo as células.

Após o período de incubação, 100 µL do sobrenadante foi removido, sendo adicionados a cada poço 100 µL do MTT dissolvido em PBS, pH 7,4, em uma concentração final 500 µg/mL. Após incubação por 4 h, a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 150 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom® Asys UVM340), sob comprimento de onda de 570 nm, sendo os dados expressos como percentual de viabilidade celular através da fórmula:

$$\text{Viabilidade(\%)} = (\text{Abs amostra} \times 100) \div (\text{Abs média do grupo controle DMEM})$$

#### 4.5.3.2 Avaliação da Integridade de Membrana Pela Quantificação de Lactato Desidrogenase (LDH)

Células expostas a um estímulo lesivo apresentam elevação dos níveis de LDH extracelular por danos na membrana celular (DAI *et al.*, 2018; TAOFIQ *et al.*, 2019). Para avaliar a integridade de membrana das células RAW 264.7, os níveis de LDH no meio celular foram aferidos utilizando-se do Kit específico (Liquiform/Labtest®). Para tanto o protocolo foi realizado assim como descrito por Requardt *et al.* (2019), sendo as células cultivadas em placas de 24 poços e expostas por 24 h a FMSO (25; 50; 100 e 500 µg/mL) ou MTHP (3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL). O DMSO 50% foi utilizado como estímulo lesivo

(controle positivo) para se atingir a máxima liberação de LDH. Após o período de exposição, o meio de cultura foi coletado e a leitura das amostras foi executada, como descrito pelo fabricante, com o emprego de um espectrofotômetro semiautomático (BIO-2000 LABQUEST®).

#### 4.5.4 Avaliação da Capacidade Citoprotetora Frente à Peroxidação Lipídica Induzida por Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é um agente propulsor da peroxidação lipídica que, dependendo de sua concentração e seu tempo de contato, causa um estresse celular induzindo danos às moléculas biológicas, como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, degradando o colágeno da matriz extracelular e mimetizando, assim, um modelo interessante para o estudo de patologias com caráter celular degenerativo (WEN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2018; LOU *et al.*, 2018). Nesse contexto, substâncias capazes de conter a peroxidação lipídica e o ciclo de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) provenientes desse fenômeno podem reduzir tais danos celulares e auxiliar no tratamento de algumas patologias (GALICKA *et al.*, 2014).

As células RAW 264.7 foram plaqueadas em placa de 96 poços (5 x 10<sup>4</sup> células/poço) e incubadas por 24 h, após esse período o meio dos poços foi trocado e os tratamentos com FMSO (25; 50; 100 e 500 µg/mL) e MHTP (3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL) foram realizados, após 1 h (exposição aguda) ou 24 h (exposição crônica) de incubação das drogas, o estímulo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentração correspondente a 350 µM (CI<sub>50</sub> para células RAW 264.7 na densidade de 5x10<sup>4</sup> células/poço) foi adicionado e encubado durante 2 h. A viabilidade celular pelo método do MTT, anteriormente descrito, foi então avaliada.

#### 4.5.5 Avaliação do *Burst* Oxidativo em Células RAW 264.7 pela Avaliação dos Níveis do Ânion Superóxido Intracelular (ASO)

Um importante evento durante o processo fagocitário é a produção de ânion superóxido intracelular (ASO) para criar um estresse oxidativo (*burst* oxidativo) frente ao antígeno fagocitado (DINAUER *et al.*, 1998; NAUSEEF *et al.*, 2004).



Para verificar a influência do FMSO e MTHP nessa habilidade dos macrófagos RAW 264.7, realizou-se o ensaio de Nitroazul de Tetrazólio (NBT) descrito inicialmente segundo Rainard *et al.* (1986) e adaptado por Chauhan *et al.* (2014) com algumas pequenas modificações, onde a capacidade do NBT para absorver superóxidos e produzir uma cor azul púrpura a partir de uma cor originalmente amarelada auxilia na detecção de ASO. Para tanto as células RAW 264.7 foram cultivadas em microplacas de 96 poços (170  $\mu\text{L}$ /poço), sendo incubadas por 24 h. Então se adicionou 10  $\mu\text{L}$  de FMSO ou MTHP ou  $\alpha$ -tocoferol (Toc) de forma a obter as concentrações finais em cada poço de 25; 50; 100 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para FMSO; 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para MTHP e 2  $\mu\text{M}/\text{mL}$  para  $\alpha$ -tocoferol, as mesmas foram incubadas por 24 h. Após esse período adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de lipopolissacarídeo (LPS; concentração final no poço de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 10  $\mu\text{L}$  de NBT (concentração final no poço de 1,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) e incubou-se as placas por 1 h. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, lavou-se a placa com 200  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7,4) e em seguida 4x com 200  $\mu\text{L}$  de metanol.

A placa permaneceu a temperatura ambiente até sua secagem, quando então se adicionou 120  $\mu\text{L}$  de KOH 2M e 140  $\mu\text{L}$  de DMSO, sendo a leitura da absorbância realizada a 620 nm em leitora de microplacas (Asys UVM 340). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (SI), sendo este calculado com base na normalização das absorbâncias em relação ao grupo Veículo estimulado por LPS, onde a média das absorbâncias desse grupo correspondeu a 1,0. SI veio a servir como uma medida indireta dos níveis de ASO intracelular.

#### 4.5.6 Estimulação de Macrófagos RAW 264.7 por Lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma macromolécula constituinte da membrana exterior de bactérias gram-negativas que provoca forte resposta ao sistema imune, exercendo potente atividade em macrófagos, promovendo sua ativação por mecanismos dependentes da via de sinalização do NF- $\kappa$ B (MORAN, 1996). Sendo assim, as células RAW 264.7 foram plaqueadas, na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços e incubadas por 24 h em ambiente com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. As células foram pré tratadas com FMSO (25 – 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou MTHP (3,12 - 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), passada 1h de incubação, metade dos poços de cada grupo foram estimulados com LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*Escherichia coli* O26:B6) (YANG *et al.*, 2017). Após 24h de incubação com o LPS, o sobrenadante de cada poço foi coletado para a determinação dos níveis de nitrito.

#### 4.5.6.1 Dosagem de Nitrito/Nitratato em Sobrenadante das Células RAW 264.7

O sobrenadante de cada poço do protocolo 4.5.6 foi adicionado em placa de 96 poços, acrescidos de 150  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (75  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico a 5%, em seguida adicionado 75  $\mu\text{L}$  N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,1% em água destilada) (GREEN *et al.*, 1982; GASPARRINI *et al.*, 2018), sendo que cada acréscimo dos reagentes aos poços obedeceu um intervalo de incubação de 10 min, a temperatura ambiente e sobre a proteção da luz. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom® Asys UVM340) sob comprimento de onda de 540 nm, sendo os dados expressos como concentração de Nitrito/Nitratato em  $\mu\text{M}/\text{mL}$  ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  mM/mL) plotados a uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ; 3,12 - 200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ).

#### 4.5.6.2 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-6 em Sobrenadante de Células RAW 264.7

Para avaliar o efeito do FMSO ou MTHP sobre a liberação de citocinas pelas células RAW 264.7, as células foram cultivadas em placa de 96 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por meio contendo diferentes concentrações do FMSO (25, 50, 100 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou MTHP (3,12, 6,25, 12,5 e 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) ou meio de cultivo contendo 0,1 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução das drogas testes, ou Dexametasona (Dexa; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 40 $\mu\text{M}/\text{poço}$ ). Após 1 h, foi adicionado o LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para indução da atividade inflamatória nas células. 24 h após a indução foi coletado o meio de cultivo para detecção dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, utilizando de kits de ELISA (Merck®, USA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo estes descritos em pg/mL (MORAN, 1996; LEE *et al.*, 2019).

#### 4.5.7 Avaliação da Atividade Antioxidante Não Específica – Avaliação da Redução do Radical DPPH• em Meio Reacional

O método DPPH foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a atividade antioxidante de soluções e misturas utilizando um radical livre estável, o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). A atividade antioxidante de um dado composto pode ser monitorada na presença do DPPH. A molécula oxidada do DPPH é reduzida após encontrar

a molécula antioxidante em teste e essa oxidação do DPPH pode ser monitorada espectrofotometricamente pela leitura da densidade óptica (DO, absorvância) do DPPH a 517 nm sob um leitor de placas.

A interpretação do resultado foi realizada pela verificação da concentração eficaz que inibi 50% da concentração inicial do radical DPPH• (CE50). Modificado por Cheng, Moore e Yu (2006), este método foi executado utilizando uma microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 250 µL da solução de DPPH (100 µg/mL) em cada poço e a esse volume foram acrescidos 50 µL de FMSO (1,56 – 1000 µg/mL) ou MTHP (1,56 – 1000 µM/mL) ou Ácido Ascórbico (AA; 1,56 – 1000 µM/mL), a fim de formar uma curva concentração resposta (Concentração da Droga Teste : % de Eliminação do Radical DPPH) e assim verificar a CE50 para FMSO, MTHP e AA (controle positivo utilizado como padrão de comparação para a atividade antioxidante) (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; LU *et al.*, 2016; CHOUDHARY *et al.*, 2018).

Para cada leitura realizada calculou-se o % de Redução do DPPH (%RD) de acordo com a fórmula:

$$\%RD = [(Absorbância do Controle DPPH - Absorbância do Teste)/Absorbância do Branco]x100\%$$

#### 4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) para variáveis com distribuição normal, ou pela mediana (mínimo-máximo) no caso de variáveis sem distribuição normal. Para comparações múltiplas dos parâmetros foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), sendo o nível de significância entre os grupos em análise de uma via determinado pelo pós-teste de *Tukey* ou, no caso de análises de grupos de dados em duas vias, por *Bonferroni*.

Os resultados obtidos da quantificação da PCR em tempo real foram avaliados sob a sua distribuição normal, analisada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, sendo a diferença entre as médias da distribuição normal (dados paramétricos) analisada pelo teste *t de Student*. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico *GraphPad Prism*® 5.03 (San Diego, Califórnia, EUA).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Resultados *in vivo***

#### **5.1.1 Avaliação da Toxicidade Aguda por Via Oral**

A administração oral aguda de FMSO na dose de 2000 mg/kg não produziu quaisquer sinais de toxicidade aguda nos animais. Durante os 14 dias seguintes após a

administração de FMSO, não se observou modificações significativas no peso, consumo alimentar, consumo de água, características das fezes, ou o óbito de qualquer um dos animais (ANEXO III). Após a eutanásia, não foram observadas alterações ou lesões macroscópicas significativas nos órgãos internos.

### 5.1.2 Teste de Toxicidade Cutânea por Múltiplas Aplicações

A administração tópica de FMSO no teste de toxicidade cutânea não demonstrou alterações significativas nos parâmetros avaliados frente aos grupos em análise. Os escores de avaliação da resposta de irritação a múltiplas aplicações de FMSO (ANEXO IV) não demonstraram a ocorrência de eritema ou edema fora dos parâmetros normais estabelecidos pelo comparativo com o grupo *Sham*. Não foi possível observar quaisquer sintomas de irritação desenvolvidos na pele íntegra ou escarificada durante os 10 dias do experimento. Todos os animais, independente de seu grupo de origem não demonstraram quaisquer alterações comportamentais relevantes, retornando rapidamente às suas atividades logo após as administrações. Ao fim do experimento, observou-se a ocorrência de pelos em crescimento na área tricotomizada de todos os grupos, não tendo nenhum dos animais demonstrado qualquer alteração comportamental perceptível quanto ao consumo de ração e água.

### 5.1.3 Dermatite de Contato Irritativa Aguda (DCIA) Induzida por 13-acetato-12-*o*-tetradecanoil-forbol (TPA)

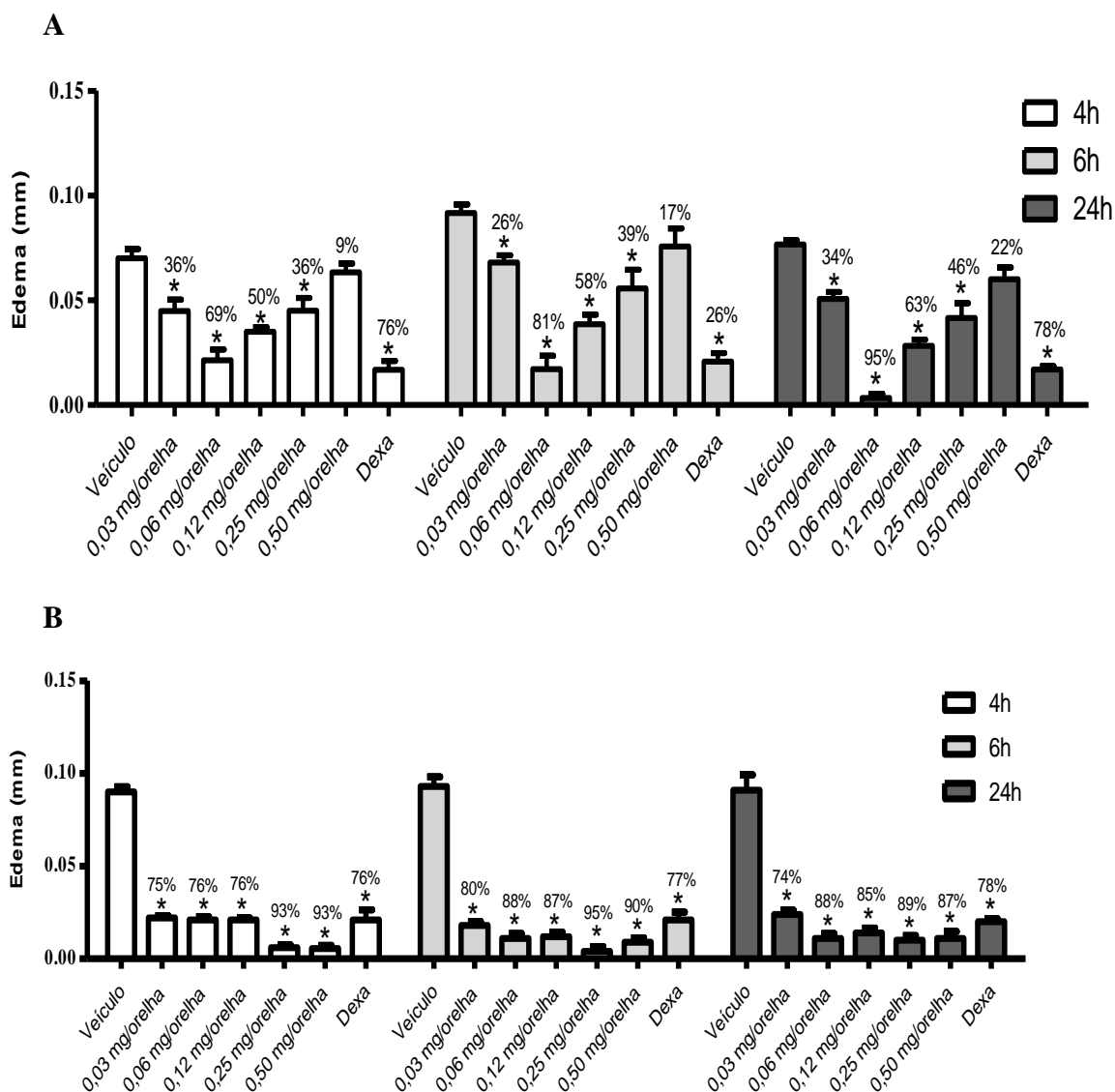
#### 5.1.3.1 Avaliação do Edema

Excetuando-se a dose mais alta de FMSO empregada (0,5 mg/orelha), as demais doses (0,03; 0,06; 0,12 e 0,25 mg/orelha) foram capazes de reduzir estatisticamente a intensidade do edema gerado após 4, 6 e 24 h da administração do TPA, assim como Dexametasona (Dexa). No tempo de 24 h se verificou que o tratamento com FMSO na dose

de 0,06 mg/orelha reduziu o edema gerado por TPA a níveis inferiores aos obtidos pelo tratamento com Dexametasona (Figura 6A).

Já na avaliação com MTHP, todas as doses empregadas (0,03; 0,06; 0,12; 0,25 e 0,50 mg/orelha) foram capazes de reduzir o edema a níveis semelhantes ou inferiores aos obtidos pelo grupo Dexametasona (Figura 6B).

Figura 6. Avaliação da atividade de FMSO e MTHP frente ao edema de orelha no modelo de DCIA induzida por TPA em camundongos.



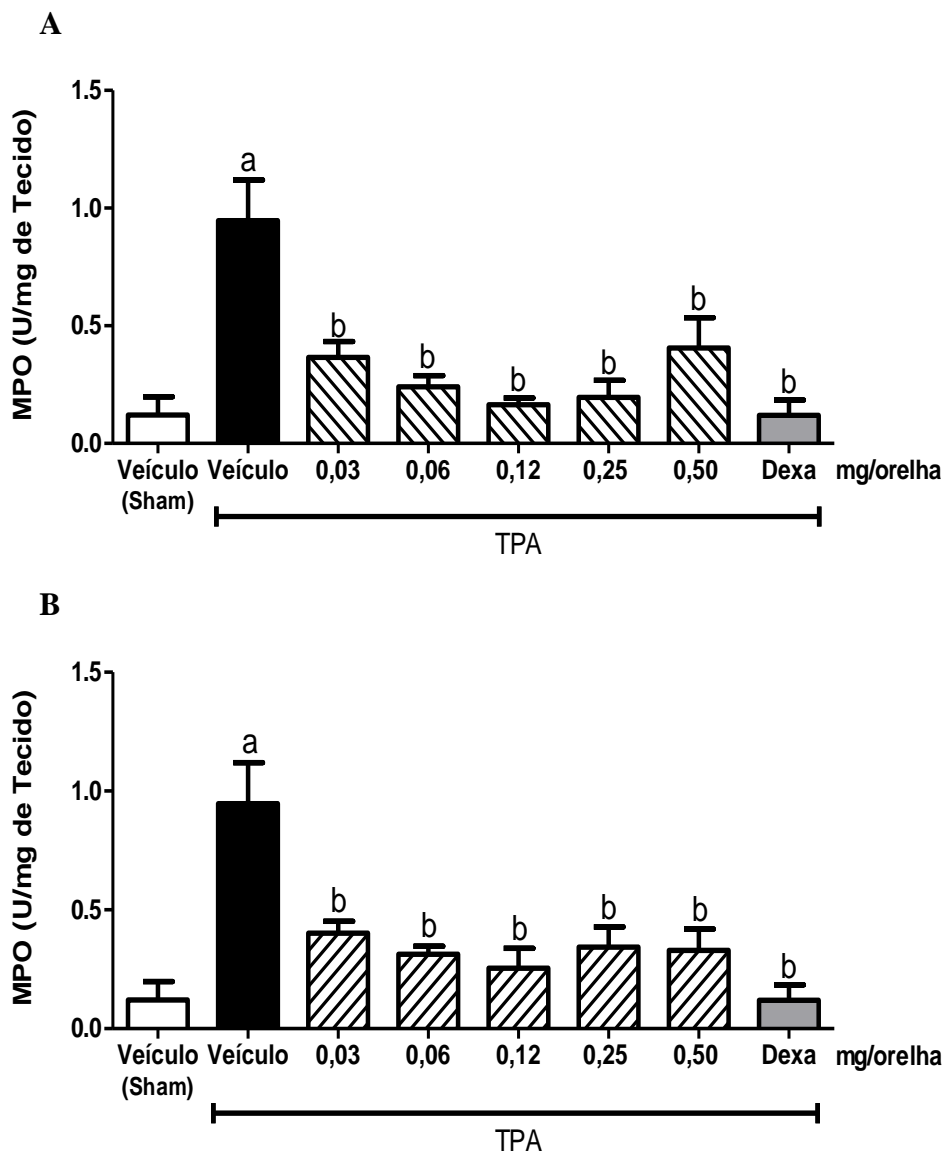
Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida do edema (mm) de orelha dos animais nos tempos de 4, 6 e 24 h após a administração do TPA e dos respectivos tratamentos com FMSO (A) e MTHP (B). Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = Dexametasona 0,1 mg/orelha). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (n=8 animais/grupo), (ANOVA, pós-teste de Tukey).

### 5.1.3.2 Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO frente aos tratamentos com FMSO ( $0,36 \pm 0,07$ ;  $0,24 \pm 0,05$ ;  $0,16 \pm 0,03$ ;  $0,19 \pm 0,07$  e  $0,40 \pm 0,13$  U/mg de tecido) ou MTHP ( $0,40 \pm 0,05$ ;  $0,31 \pm 0,03$ ;  $0,25 \pm 0,08$ ;  $0,34 \pm 0,08$  e  $0,33 \pm 0,09$  U/mg de tecido) no protocolo de dermatite aguda induzida por TPA, em todas as doses empregadas (0,03; 0,06; 0,12; 0,25 e 0,5 mg/orelha), foi capaz de reduzir os níveis de atividade de MPO a valores próximos aos do grupo Dexametasona (Dexa) ( $0,12 \pm 0,06$  U/mg de tecido) e ao grupo Veículo (Sham) ( $0,12 \pm$

0,08 U/mg de tecido), demonstrando uma pronunciada redução quando comparados ao grupo TPA (0,94 ± 0,17 U/mg de tecido) (Figura 7).

Figura 7. Avaliação da ação de FMSO e de MTHP frente à atividade de MPO em modelo de DCIA induzida por TPA em camundongos.



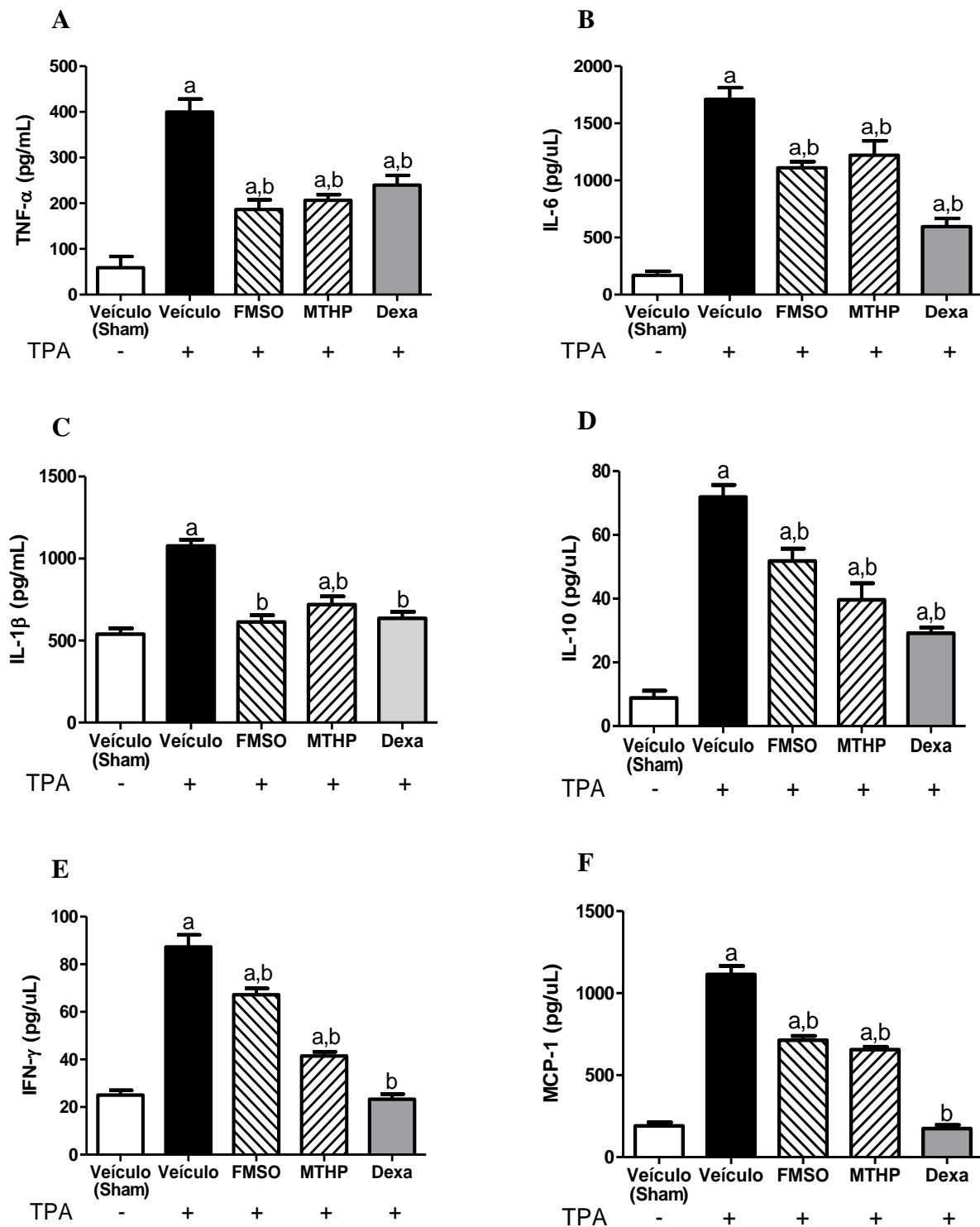
Os dados foram expressos como média ± E.P.M. e representam a medida da atividade de MPO nos animais tratados com FMSO (A) ou MTHP (A), sendo expressa como unidade de MPO por mg de tecido (U/mg de tecido) das orelha dos animais no tempo 24 h após a administração do TPA. Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = Dexametasona 0,1 mg/orelha. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (Sham); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (n=8 animais/grupo), (ANOVA, pós-teste de Tukey).



### 5.1.3.3 Determinação dos Níveis Teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$ e MCP-1 em Tecido Proveniente do Modelo de Dermatite de Contato Irritativa Aguda Induzida por TPA

A indução do modelo de DCIA por TPA foi capaz de elevar os níveis de todas as citocinas em estudo (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1), sendo que os respectivos tratamentos com dexametasona (0,1 mg/orelha) e o emprego de FMSO e de MTHP, ambos na dose de 0,06 mg/orelha, foram capazes de reduzir os níveis dessas citocinas frente a indução por TPA (Figura 8).

Figura 8. Efeito de FMSO e de MTHP nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida da concentração de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, INF- $\gamma$  e MCP-1), sendo expressa como pg/mL, proveniente do tecido das orelhas dos animais tratados com FMSO ou MTHP, 24 h após a administração do TPA. Veículo (Sham) = 2% de Tween 80 em água destilada; Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = Dexametasona 0,1 mg/orelha). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (n=8 animais/grupo), (ANOVA, pós-teste de Tukey).

#### 5.1.3.4 Análise Histológica do Tecido das Orelhas

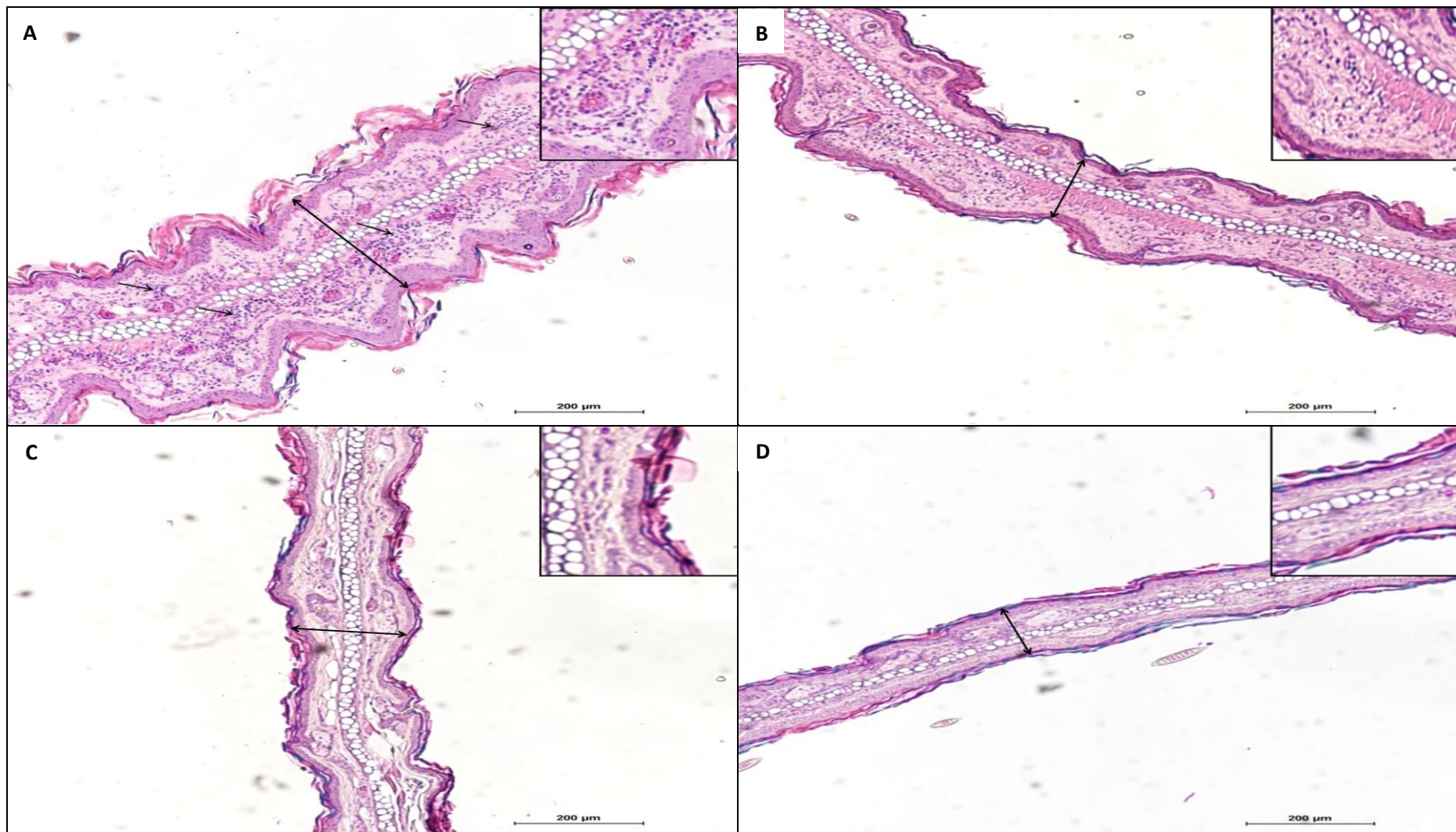
As fotomicrografias dos tecidos das orelhas dos camundongos sensibilizados com a aplicação tópica de TPA foram coradas por H&E. Os grupos tratados com FMSO e MTHP, nas doses de 0,06 mg/orelha, assim como o grupo Dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha), apresentaram, segundo análise de patologista especializado, uma visível redução do infiltrado de células inflamatórias, da quantidade de vasos sanguíneos ectásicos e do edema tecidual (Tabela 4, ANEXO V), quando comparados ao grupo Veículo (Figura 10).

Tabela 4. Resultados dos escores da análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.

<b>Grupo</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
<b>Veículo</b>	1 (1-1)	3 (3-3)	2 (2-2)	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>FMSO</b>	1 (0-1)	2 (1-2)	1 (1-2)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>MTHP</b>	0 (0-1)	1 (1-2)	1 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Dexa</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Os dados foram expressos como Mediana (Mínimo-Máximo) dos valores dos escores da análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.

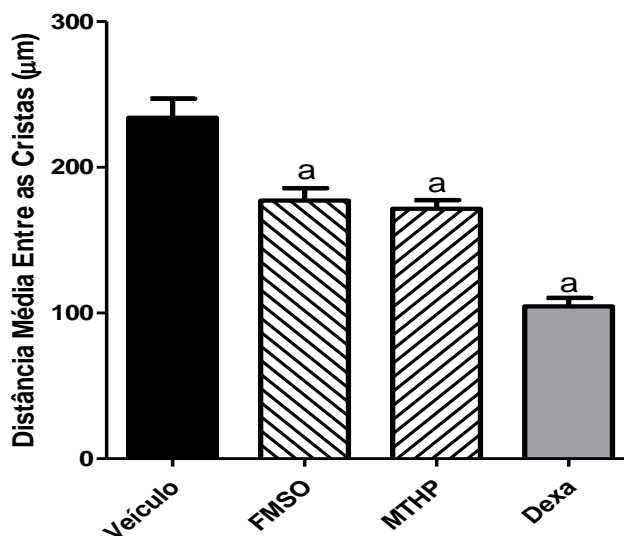
Figura 9. Fotomicrografias dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.



Grupo Veículo (TPA; 2,5 µg/orelha) (A), Grupo FMSO 0,06 mg/orelha (B), Grupo MTHP 0,06 mg/orelha (C) e Grupo Dexa (Dexametasona 0,1 mg/orelha) (D). Os tecidos foram corados com H&E. As setas em “A” demonstram o acúmulo de células inflamatórias infiltradas e a barra de dupla seta ( $\leftrightarrow$ ) representa a distância média entre as cristas epiteliais (Aumento: 4x; Escala: 200 µm).

Os tratamentos com FMSO ( $177,30 \pm 8,50 \mu\text{m}$ ) ou MTHP ( $171,60 \pm 5,98 \mu\text{m}$ ), nas doses de 0,06 mg/orelha, assim como o tratamento com Dexametasona (Dexa) ( $104,5 \pm 5,87 \mu\text{m}$ ) foram capazes de reduzir o edema relativo quantificado pela análise histológica, quando comparados ao grupo Veículo ( $234,10 \pm 13,05 \mu\text{m}$ ) (Figura 10).

Figura 10. Edema relativo obtido pela análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIA induzida por TPA.

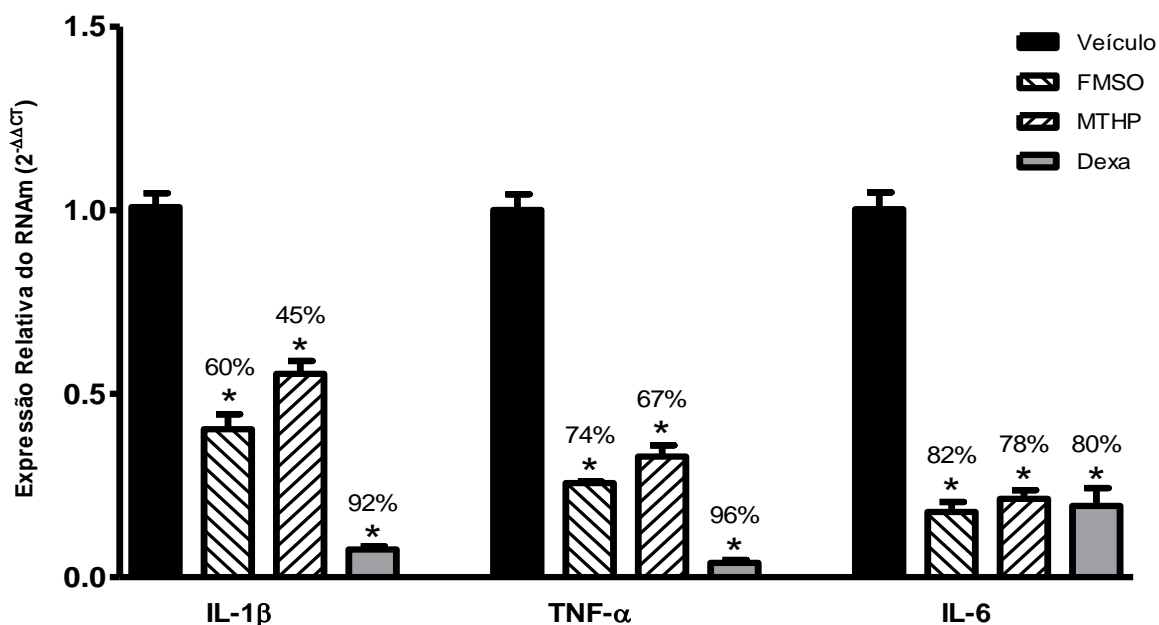


Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida de 6 distâncias ( $\mu\text{m}$ ) entre as cristas epiteliais íntegras das fotomicrografias da histologia de orelhas de camundongos ( $n = 4$  animais/grupo) submetidos ao protocolo de DCIA por TPA e tratados com FMSO ou MTHP. Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = Dexametasona 0,1 mg/orelha. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (ANOVA, pós-teste de Tukey).

#### 5.1.3.5 Expressão Relativa do RNAm para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 em Tecido de Orelha Proveniente do Protocolo de DCIA Induzido por TPA

Os resultados obtidos pela análise dos dados da expressão relativa de RNAm para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no tecido das orelhas demonstraram uma efetiva redução na expressão gênica para os grupos tratados com FMSO, MTHP e Dexametasona em comparação ao grupo Veículo, onde o TPA foi capaz de aumentar a expressão relativa de RNAm para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Figura 11).

Figura 11. Efeito da FMSO e da MTHP na expressão relativa do RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em tecido proveniente do protocolo de DCIA induzido por TPA em camundongos.



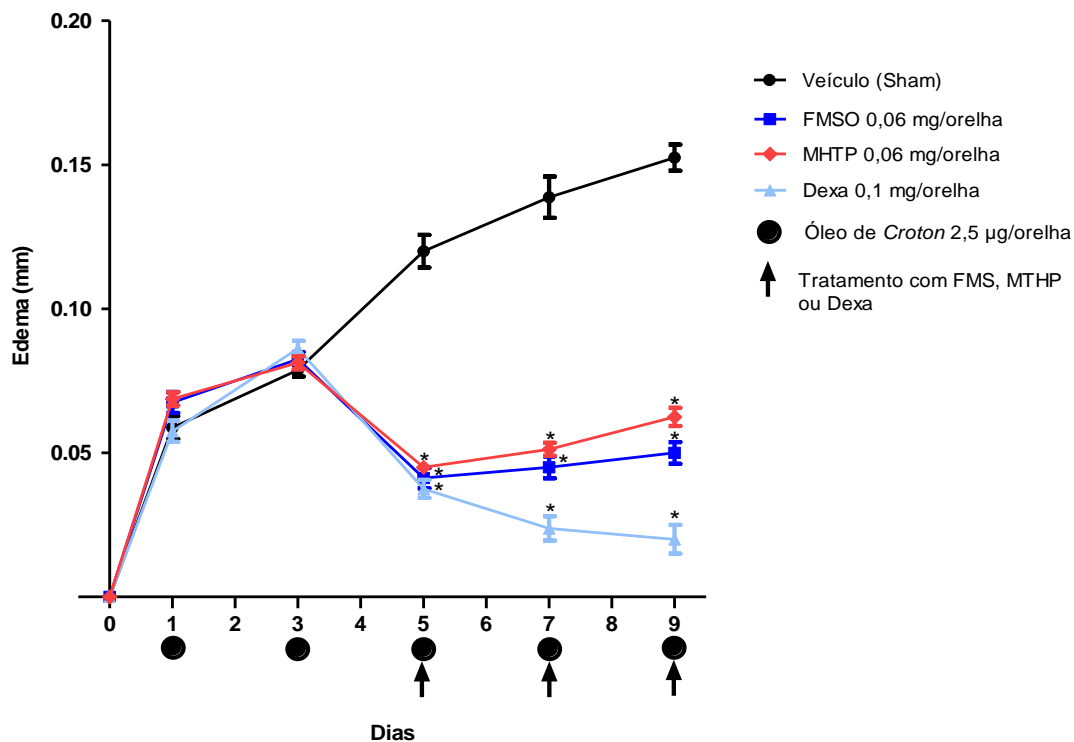
Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. da expressão relativa do RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em tecido proveniente do protocolo de dermatite aguda por TPA. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), FMSO (0,06 mg/orelha), MTHP (0,06 mg/orelha) e Dexametasona (Dexa; 0,1 mg/orelha), \* $p < 0,05$  comparado com o Veículo (n=8 animais/grupo), (Teste t de Student).

#### 5.1.4 Dermatite de Contato Irritativa Crônica (DCIC) por Óleo de *Croton*

##### 5.1.4.1 Avaliação do Edema

No modelo crônico de dermatite induzida por óleo de *Croton* (Figura 12), a administração de Óleo de *Croton* produziu edema na orelha dos animais que foram estimulados nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 do experimento ( $0,058 \pm 0,003$ ;  $0,078 \pm 0,002$ ;  $0,120 \pm 0,005$ ;  $0,138 \pm 0,007$  e  $0,152 \pm 0,004$  mm). Os tratamentos, administrados nos dias 5, 7 e 9, com FMSO ( $0,041 \pm 0,003$ ;  $0,045 \pm 0,003$  e  $0,050 \pm 0,003$  mm) e MTHP ( $0,045 \pm 0,001$ ;  $0,052 \pm 0,002$  e  $0,062 \pm 0,003$  mm), ambos na dose de 0,06 mg/orelha, foram capazes de reduzir o edema gerado pelo óleo de *Croton*, assim como o controle Dexametasona ( $0,037 \pm 0,003$ ;  $0,023 \pm 0,004$  e  $0,020 \pm 0,005$  mm).

Figura 12. Avaliação da atividade de FMSO e MTHP frente ao edema de orelha no modelo de DCIC induzido por Óleo de *Croton* em camundongos



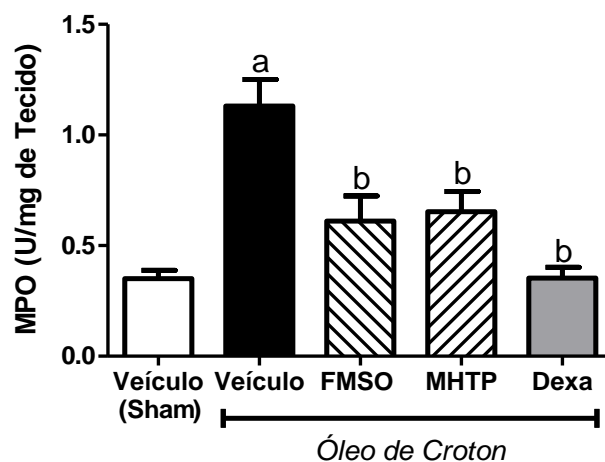
Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida do edema (mm) de orelha dos animais submetidos ao modelo de DCIC por Óleo de *Croton*. Veículo (Sham) = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = 2% de Tween 80 em água destilada. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (Sham) (n=8 animais/grupo), (ANOVA, pós-teste de *Bonferroni*).

#### 5.1.4.2 Determinação da Atividade Enzimática de Mieloperoxidase (MPO)

O Óleo de *Croton* aumentou significativamente a atividade de MPO ( $1,13 \pm 0,12$  U/mg de tecido) após 10 dias do início do protocolo de DCIC quando comparado ao grupo que não recebeu o agente indutor da inflamação, Veículo (Sham) ( $0,35 \pm 0,03$  U/mg de tecido).

O tratamento com FMSO ( $0,61 \pm 0,11$  U/mg de tecido), MTHP ( $0,65 \pm 0,09$  U/mg de tecido) ou Dexametasona ( $0,35 \pm 0,05$  U/mg de tecido), reduziu significativamente a atividade de MPO quando comparado ao grupo Veículo que recebeu o óleo de *Croton* ( $0,35 \pm 0,03$  U/mg de tecido) (Figura 13).

Figura 13. Efeito de FMSO ou MTHP frente à atividade de MPO em tecido proveniente do protocolo de DCIC por Óleo de *Croton* em camundongos.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida da atividade de MPO em cada grupo (n=8 animais/grupo), sendo expressa como unidade de MPO por mg de tecido (U/mg de tecido) das orelha dos animais após 10 dias de experimento. Veículo (Sham) = 2% de Tween 80 em água destilada; Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexta = Dexametasona 0,1 mg/orelha. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (Sham); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo, (ANOVA, pós-teste de Tukey).

#### 5.1.4.3 Análise Histológica do Tecido das Orelhas

As fotomicrografias do tecido da orelha dos camundongos sensibilizados com a aplicação tópica repetida de óleo de *Croton* foram coradas por H&E (Figura 14). Os grupos tratados com FMSO e MTHP, nas doses de 0,06 mg/orelha, assim como o grupo Dexametasona (Dexta; 0,1 mg/orelha), apresentaram, segundo análise de patologista especializado, uma visível redução do infiltrado de células inflamatórias, da quantidade de vasos sanguíneos ectásicos e do edema tecidual, assim como de trechos contendo hipertrofia da cartilagem, quando comparados ao grupo Veículo (Tabela 5, ANEXO VI).

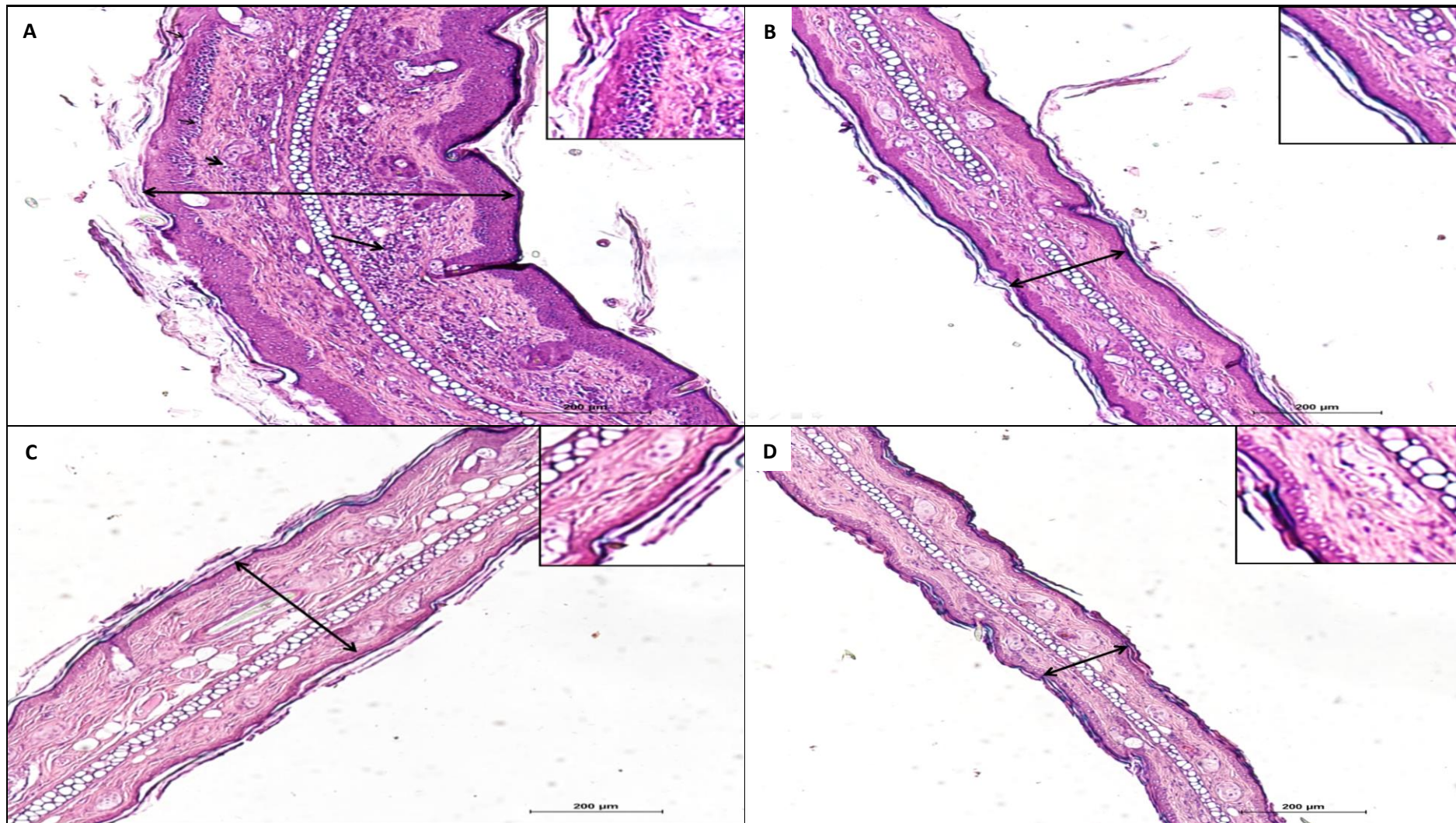
Tabela 5. Resultados dos escores da análise histológica do tecido da orelha de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIC induzida por Óleo de *Croton*.



<b>Grupo</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
<b>Veículo</b>	1 (0-1)	3 (2-3)	2 (1-2)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,5 (0-1)	1 (0-2)
<b>FMSO</b>	0 (0-1)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)
<b>MTHP</b>	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-2)
<b>Dexa</b>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)

Os dados foram expressos como Mediana (Mínimo-Máximo) dos valores dos escores da análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIC induzida por Óleo de *Croton*.

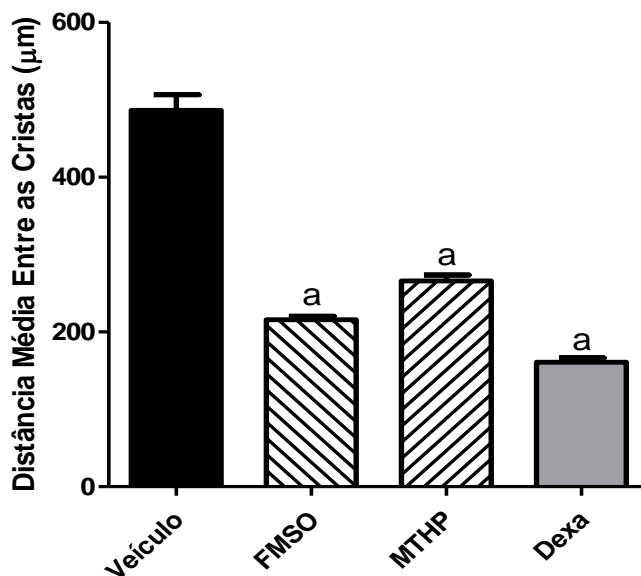
Figura 14. Fotomicrografias dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIC induzida por Óleo de *Croton*.



Grupo Veículo (Óleo de *Croton*; 2,5 µg/orelha) (A), Grupo FMSO 0,06 mg/orelha (B), Grupo MTHP 0,06 mg/orelha (C) e Grupo Dexa (Dexametasona 0,1 mg/orelha) (D). Os tecidos foram corados com H&E. A seta em “A” demonstra o acúmulo de células inflamatórias infiltradas e a barra de dupla seta ( $\leftrightarrow$ ) representa a distância média entre as cristas epiteliais (Aumento: 4x; Escala: 200 µm).

Os tratamentos com FMSO ( $215,90 \pm 4,35 \mu\text{m}$ ) ou MTHP ( $265,90 \pm 7,76 \mu\text{m}$ ), nas doses de 0,06 mg/orelha, assim como o controle Dexametasona ( $160,90 \pm 5,61 \mu\text{m}$ ) foram capazes de reduzir o edema relativo quantificado pela análise histológica, quando comparados ao grupo Veículo ( $486,4 \pm 20,16 \mu\text{m}$ ) (Figura 15).

Figura 15. Edema relativo obtido pela análise histológica dos tecidos das orelhas de animais tratados com FMSO ou MTHP no modelo de DCIC induzida por Óleo de *Croton*.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida de 6 distâncias ( $\mu\text{m}$ ) entre as cristas epiteliais íntegras das fotomicrografias da histologia de orelhas de camundongos ( $n = 4$  animais/grupo) submetidos ao protocolo de DCIC por Óleo de *Croton*, e tratados com FMSO ou MTHP. Veículo = 2% de Tween 80 em água destilada; Dexa = Dexametasona 0,1 mg/orelha. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (ANOVA, pós-teste de Tukey).

## 5.2 Resultados *in vitro*

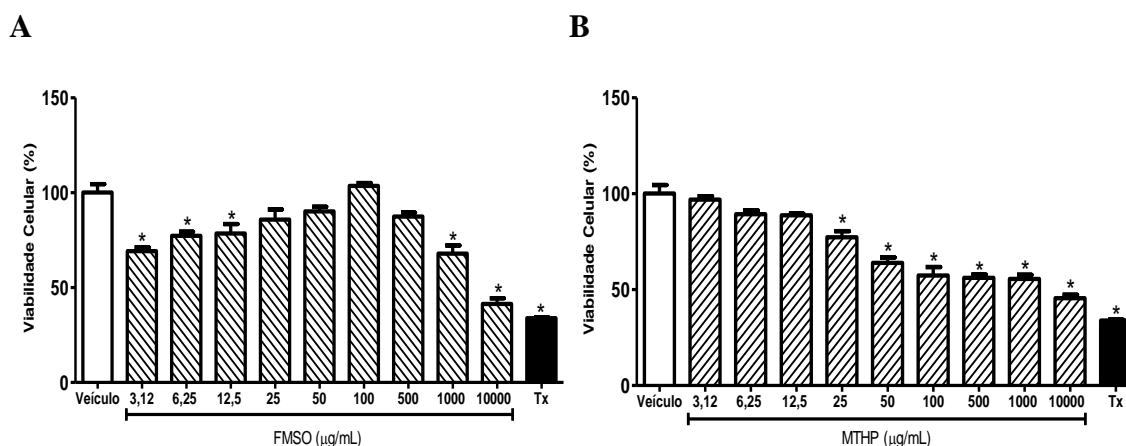
### 5.2.1 Definição de Concentrações de Trabalho e Avaliação de Segurança

#### 5.2.1.2 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Método do MTT

Os resultados descritos na Figura 16 evidenciaram que a FMSO nas concentrações de 25; 50; 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $90,16 \pm 2,46$ ;  $103,6 \pm 1,57$  e  $87,47 \pm 2,07\%$ ), e MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $96,93 \pm 1,78$ ;  $89,33 \pm 1,96$  e  $88,74 \pm 0,89\%$ ), após 24 horas de incubação, não promoveram redução estatisticamente significativas na viabilidade de células RAW 264.7, em ensaio com MTT, quando comparados com o

grupo controle Veículo ( $100,20 \pm 4,40\%$ ). Contudo, FMSO nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 500; 1000 e 10000  $\mu\text{g/mL}$  ( $69,24 \pm 1,92$ ;  $77,29 \pm 2,14$ ;  $78,53 \pm 4,92$ ;  $87,47 \pm 2,08$ ;  $67,87 \pm 4,40$  e  $41,43 \pm 2,97\%$ ) e MTHP nas concentrações de 25; 50; 100; 1000 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $77,30 \pm 3,22$ ;  $64,00 \pm 2,79$ ;  $57,39 \pm 4,37$ ;  $56,18 \pm 1,71$ ;  $55,62 \pm 2,11$  e  $45,50 \pm 1,86\%$ ) demonstraram uma redução da viabilidade celular, algo que também foi observado junto ao controle Tx (DMSO 50%,  $33,88 \pm 0,47\%$ ).

Figura 16. Efeito de FMSO e de MTHP na viabilidade de células RAW 264.7

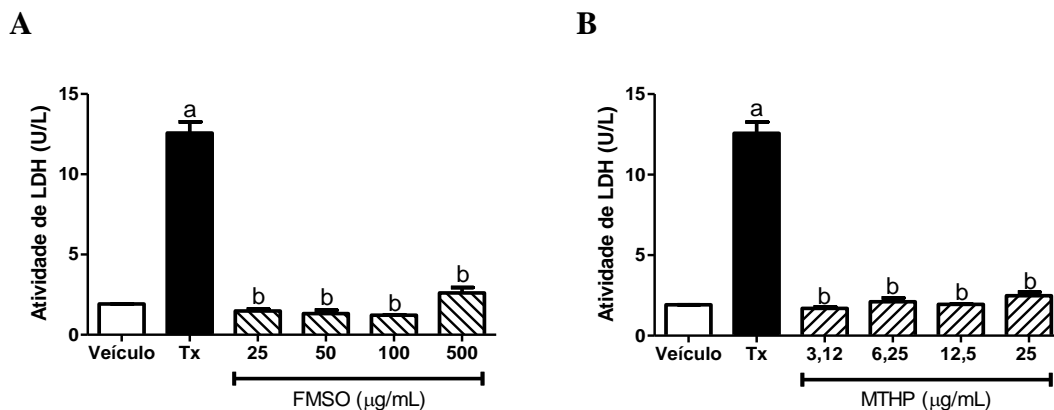


Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a porcentagem de viabilidade celular frente ao grupo veículo. Veículo = 1 % de DMSO em Meio DMEM; Tx = DMSO 50%. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo (ANOVA, pós-teste de Tukey).

### 5.2.1.3 Avaliação da Integridade de Membrana pela Quantificação de Lactato Desidrogenase (LDH)

Após 24 horas de incubação, os resultados (Figura 17) demonstraram que a FMSO nas concentrações de 25; 50; 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $1,48 \pm 0,10$ ;  $1,31 \pm 0,21$ ;  $1,21 \pm 0,03$ ;  $2,61 \pm 0,33$  U/L), assim como MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $1,69 \pm 0,08$ ;  $2,10 \pm 0,23$ ;  $1,94 \pm 0,02$ ;  $2,47 \pm 0,23$  U/L), não promoveram alterações estatisticamente significativas nos níveis de atividade de LDH no meio de cultivo das células RAW 264.7, isso quando comparados com o grupo controle negativo (veículo;  $1,91 \pm 0,01$  U/L). Em contra partida, todos os grupos avaliados demonstraram uma redução na atividade de LDH quando comparados ao grupo controle positivo (Tx;  $12,57 \pm 0,69$  U/L).

Figura 17. Efeito do FMSO e do MTHP na integridade de membrana de células RAW 264.7 pela dosagem da enzima Lactato Desidrogenase



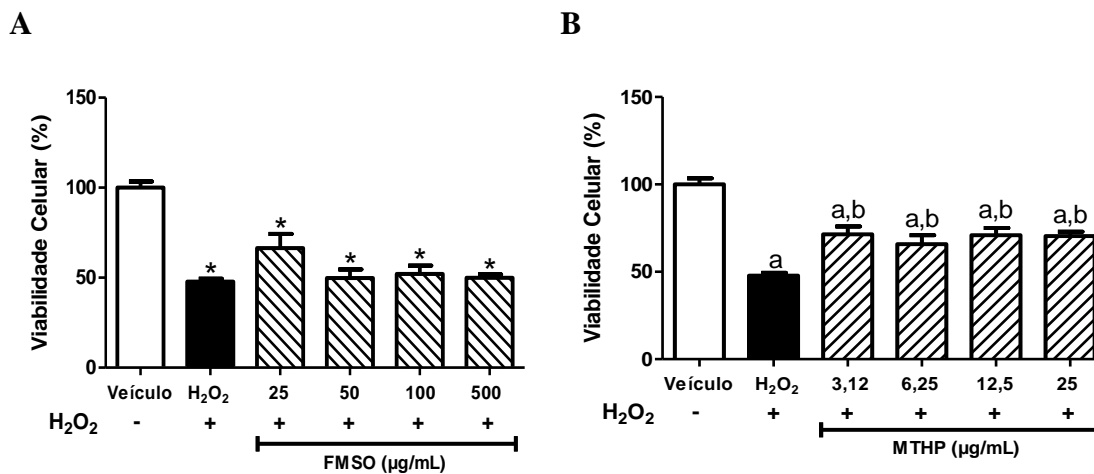
Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a atividade de LDH em cada grupo. Veículo = controle negativo do dano em membrana celular (sem tratamento); Tx = controle positivo do dano em membrana celular (DMSO 50%). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Tx (ANOVA, pós-teste de Tukey).

## 5.2.2 Avaliação da Capacidade Citoprotetora Frente à Peroxidação Lipídica Induzida por Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

### 5.2.2.1 Avaliação da Citoproteção – Exposição Aguda às Drogas Testes (1 h)

O grupo Veículo ( $100 \pm 3,38\%$ ) foi escolhido como padrão de viabilidade celular para o teste. Os resultados demonstraram que a FMSO nas concentrações de 25, 50, 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $58,97 \pm 3,59$ ;  $49,87 \pm 4,75$ ;  $52,07 \pm 4,60$  e  $49,94 \pm 1,91\%$ ) na forma de pré-tratamento agudo não foi capaz de impedir uma redução significativa da viabilidade de células RAW 264.7 frente ao estímulo lesivo por  $H_2O_2$  ( $47,85 \pm 1,59\%$ ). Contudo, MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  ( $71,44 \pm 4,50$ ;  $65,85 \pm 5,08$ ;  $70,94 \pm 4,17$  e  $70,38 \pm 2,58\%$ ), frente ao mesmo tempo de pré-tratamento, veio a impedir uma redução estatisticamente significativa da viabilidade destas células frente à  $H_2O_2$  (Figura 18).

Figura 18. Avaliação da capacidade citoprotetora frente à exposição aguda (1 h) à peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

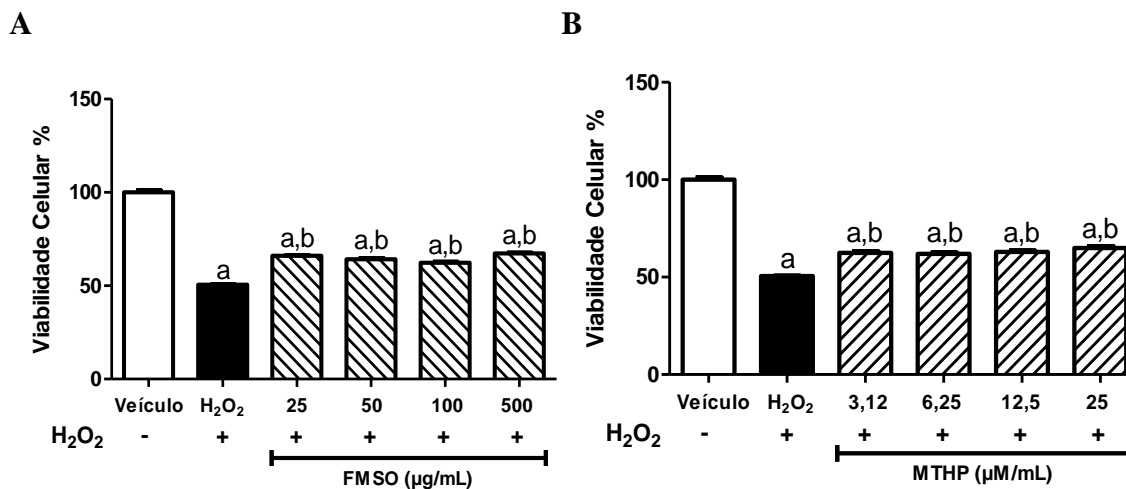


Os dados foram expressos como média ± E.P.M. e representam a porcentagem de viabilidade celular frente ao grupo veículo. Veículo = 1% de DMSO em meio DMEM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 350 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*<sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANOVA, pós-teste de Tukey).

#### 5.2.2.2 Avaliação da Citoproteção – Exposição Crônica às Drogas Testes (24 h)

Os resultados demonstraram que a FMSO nas concentrações de 25, 50, 100 e 500 µg/mL ( $66,04 \pm 0,30$ ;  $64,24 \pm 0,53$ ;  $62,31 \pm 0,47$  e  $67,31 \pm 0,43\%$ ), assim como o MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL ( $62,42 \pm 0,77$ ;  $61,96 \pm 0,54$ ;  $62,91 \pm 0,59$  e  $64,95 \pm 0,83\%$ ), foram capazes de impedir uma abrupta redução da viabilidade de células RAW 264.7 frente ao estímulo lesivo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $50,52 \pm 0,19\%$ ), tendo sido o grupo Veículo ( $100 \pm 1,11\%$ ) escolhido como padrão de viabilidade celular máxima adequada para o teste (Figura 19).

Figura 19. Avaliação da capacidade citoprotetora frente à exposição crônica (24 h) à peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

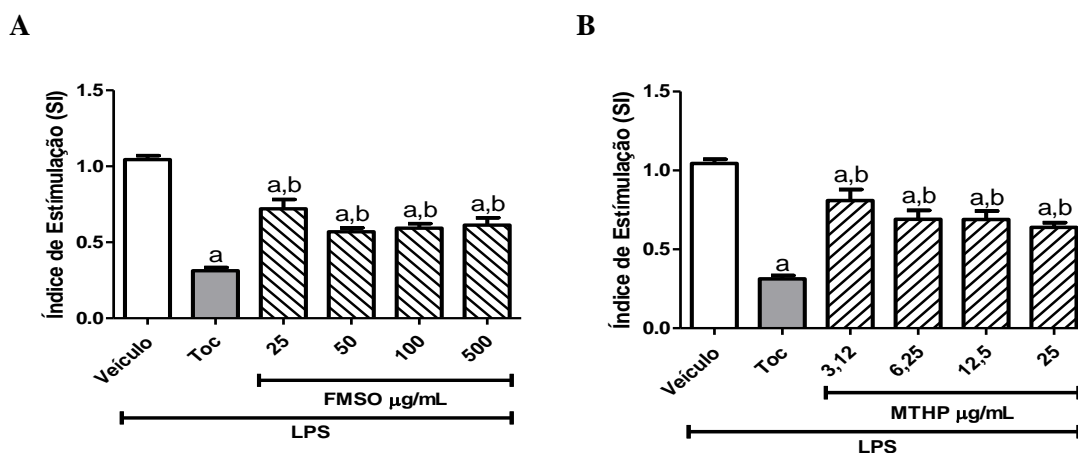


Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a porcentagem de viabilidade celular frente ao grupo Veículo. Veículo = 1% de DMSO em meio DMEM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 350  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ANOVA, pós-teste de Tukey).

### 5.2.3 Avaliação do *Burst* Oxidativo em Células RAW 264.7 pela Avaliação dos Níveis do Ânion Superóxido Intracelular (ASO)

Os resultados demonstraram que a FMSO nas concentrações de 25, 50, 100 e 500  $\mu$ g/mL ( $0,72 \pm 0,06$ ;  $0,57 \pm 0,02$ ;  $0,59 \pm 0,03$  e  $0,61 \pm 0,05$ ), assim como o MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu$ M/mL ( $0,81 \pm 0,07$ ;  $0,69 \pm 0,05$ ;  $0,68 \pm 0,05$ ;  $0,64 \pm 0,03$ ), reduziram significativamente o Índice de Estimulação (SI) de células RAW 264.7 frente à estimulação gerada por LPS ( $1,04 \pm 0,02$ ), tendo sido o grupo Tocoferol (Toc) ( $0,31 \pm 0,02$ ) escolhido como padrão de inibição do *burst* oxidativo para o teste (Figura 20).

Figura 20. Avaliação indireta dos níveis de Ânion Superóxido Intracelular (ASO) pela verificação do Índice de Estimulação (SI) de células RAW 264.7 estimuladas por LPS e tratadas com FMSO e MTHP.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam os Índices de Estimulação (SI; medida indireta dos níveis de ASO) frente ao grupo Veículo. Veículo = 1% de DMSO em meio DMEM; Toc = 2  $\mu$ M/mL de  $\alpha$ -tocoferol. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Toc (ANOVA, pós-teste de Tukey).

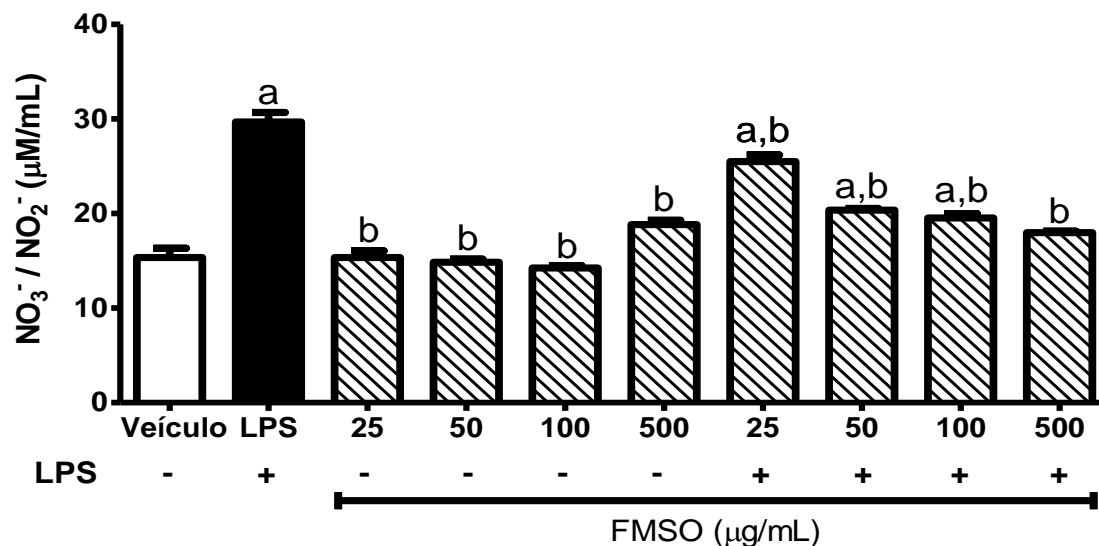
#### 5.2.4 Dosagem de Nitrato/Nitrito em Sobrenadante das Células RAW 264.7

A administração isolada de FMSO (Figura 21A) nas concentrações de 25; 50; 100 e 500  $\mu$ g/mL (15,34  $\pm$  0,71; 14,86  $\pm$  0,30; 14,26  $\pm$  0,25 e 18,85  $\pm$  0,43  $\mu$ M/mL), assim como de MTHP (Figura 21B) nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25  $\mu$ M/mL (16,68  $\pm$  0,47; 16,24  $\pm$  0,42; 16,23  $\pm$  0,39 e 16,36  $\pm$  0,37 mM/mL), não foram capazes de aumentar significativamente os níveis de Nitrato/Nitrito frente ao grupo Veículo (15,34  $\pm$  0,98 mM/mL) no sobrenadante de células RAW 264.7 após 24 h de exposição. Contudo, as mesmas concentrações empregadas para FMSO (25,49  $\pm$  0,71; 20,36  $\pm$  0,18; 19,53  $\pm$  0,45 e 17,98  $\pm$  0,14 mM/mL) e MTHP (22,16  $\pm$  0,51; 22,69  $\pm$  0,36; 21,92  $\pm$  0,28 e 21,90  $\pm$  0,15 mM/mL) foram capazes de reduzir a produção de Nitrato/Nitrito evidenciada pelo estímulo por LPS (29,69  $\pm$  1,00 mM/mL) (Figura 21).

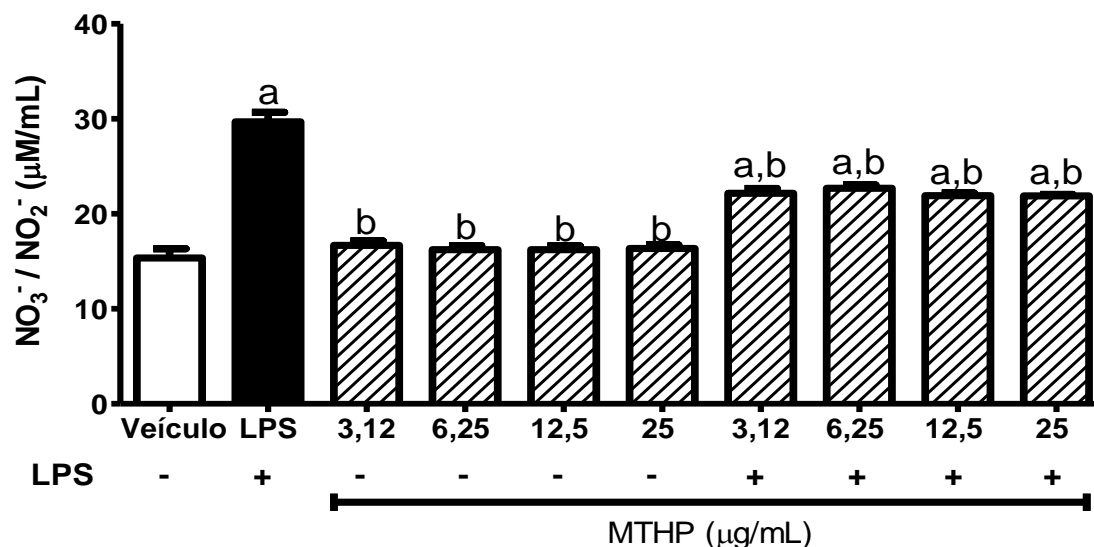


Figura 21. Efeito do FMSO e do MTHP nos níveis de Nitrato/Nitrito no meio de cultivo de células RAW 264.7 na ausência e após o estímulo por LPS

A



B



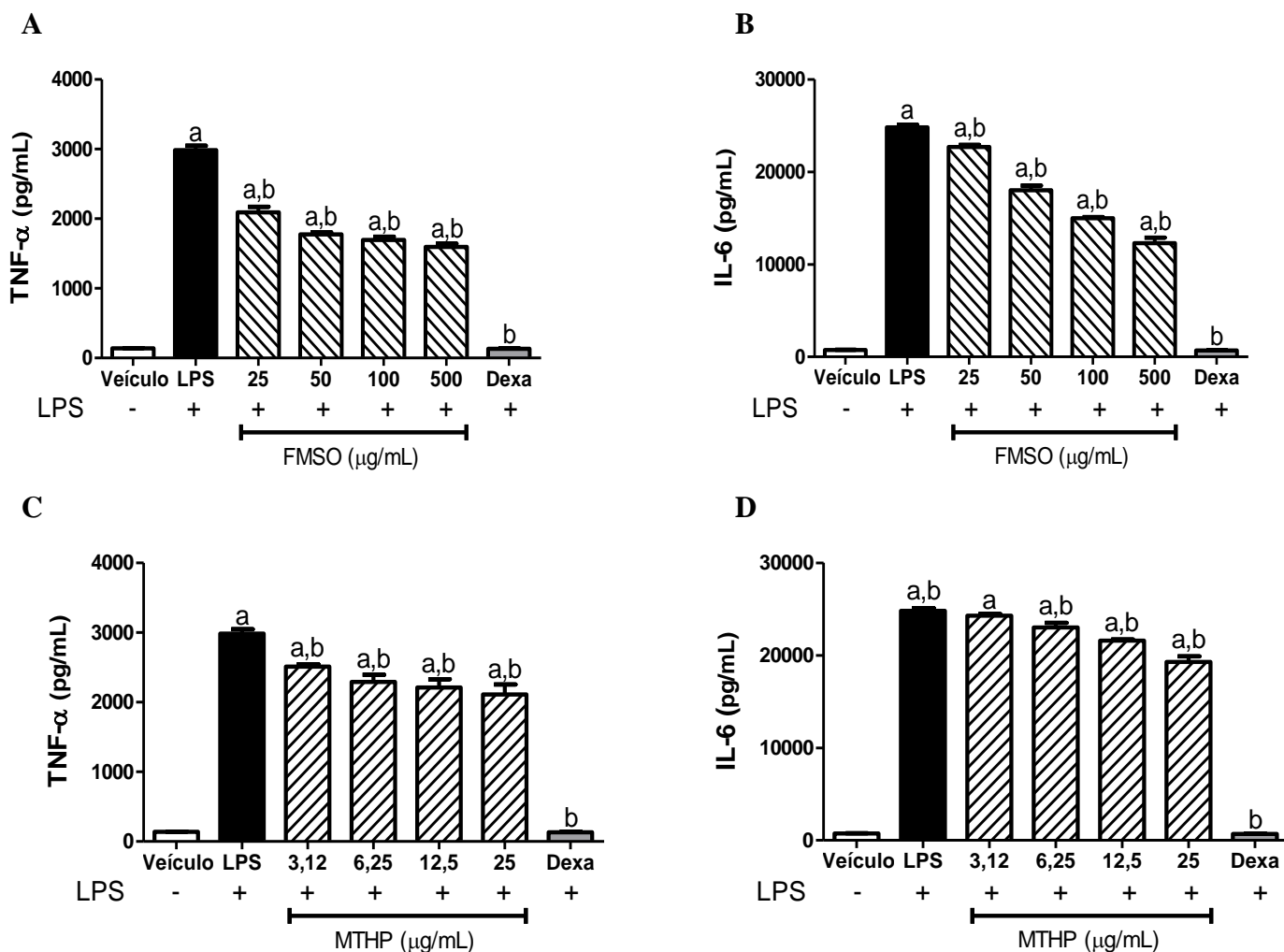
Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam os níveis de Nitrato/Nitrito no meio de cultivo de células RAW 264.7 em cada grupo. Veículo = 1% de DMSO em meio DMEM; LPS = 1 µg/mL de lipopolissacarídeo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey).

### 5.2.5 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-6, em Sobrenadante das Células RAW 264.7

No modelo empregado o LPS foi capaz de aumentar os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 ( $2984 \pm 63,31$  e  $24803 \pm 273,30$  pg/mL). Os resultados demonstraram que a FMSO nas concentrações de 25, 50, 100 e 500 µg/mL ( $2092 \pm 79,30$ ;  $1775 \pm 29,44$ ;  $1695 \pm 45,05$  e  $1595 \pm 45,59$  pg/mL), assim como o MTHP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25

$\mu\text{M}/\text{mL}$  ( $2513 \pm 31,88$ ;  $2291 \pm 103,4$ ;  $2211 \pm 121,00$  e  $2110 \pm 143,10$   $\text{pg}/\text{mL}$ ), reduziram significativamente os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  frente ao estímulo por LPS. FMSO reduziu significativamente os níveis de IL-6 em todas as concentrações empregadas ( $22693 \pm 215,6$ ;  $18013 \pm 511,5$ ;  $14986 \pm 138,1$  e  $12296 \pm 590,3$   $\text{pg}/\text{mL}$ ), já MTHP veio a reduzir os níveis de IL-6 apenas nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$  ( $23013 \pm 511,50$ ;  $21586 \pm 138,1$  e  $19296 \pm 590,30$   $\text{pg}/\text{mL}$ ), quando comparado ao grupo LPS. A dexametasona em todos os ensaios reduziram significativamente os níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-6 ( $131,50 \pm 5,29$  e  $682,2 \pm 20,59$   $\text{pg}/\text{mL}$ ), a valores semelhantes ao grupo controle Veículo ( $138,7 \pm 2,57$  e  $739,6 \pm 14,92$   $\text{pg}/\text{mL}$ ) (Figura 22).

Figura 22. Efeito do FMSO e de MTHP nos níveis de  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-6 no meio de cultivo de células RAW 264.7 frente ao estímulo por LPS

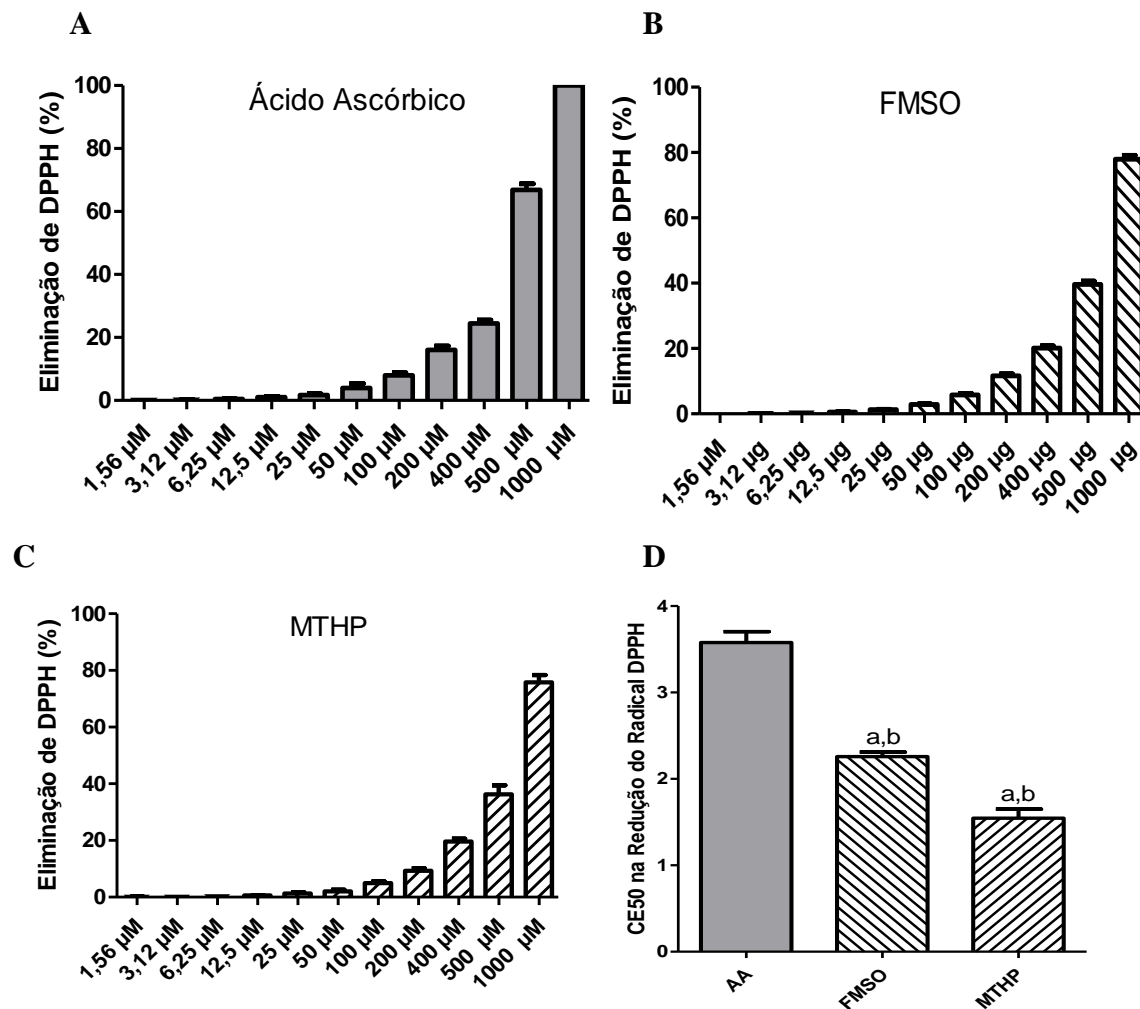


Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam os níveis  $\text{TNF-}\alpha$  (a, c) e IL-6 (b, d) no meio de cultivo de células RAW 264.7 estimuladas por LPS e tratados com FMSO e MTHP. Veículo = 1% de DMSO em meio DMEM; LPS = 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lipopolissacarídeo. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo Veículo; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey).

### 5.2.6 Avaliação da Atividade Antioxidante Não Específica – Avaliação da Redução do Radical DPPH• em Meio Reacional

Baseado na eliminação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), este método é considerado adequado para a determinação da capacidade antioxidante não específica de substâncias puras e misturas. Seu emprego demonstrou que FMSO e MTHP possuem atividade antioxidante pronunciada frente ao radical DPPH, demonstrando um comportamento de concentração dependente frente a sua capacidade de redução do DPPH (Figuras 24), assim como o controle de atividade antioxidante, o Ácido Ascórbico (AA) (Figura 23C). Ao verificarmos o gráfico relativo à CE50 (Figura 23D), pode-se observar diferença estatística entre os três grupos AA ( $3,58 \pm 0,13$ ), FMSO ( $2,26 \pm 0,05$ ) e MTHP ( $1,55 \pm 0,10$ ). Por este método foi possível averiguar a eficácia de eliminação de DPPH para FMSO (63,11%) e MTHP (43,21%), considerando-se o controle AA (100%) como nossa referência de padrão antioxidante.

Figura 23. Avaliação da Redução do Radical DPPH• por atividade de FMSO e MTHP em Meio Reacional



Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e representam a medida percentual da redução do radical DPPH (Figura 23A, 23B e 23C) ou a CE50 para o teste (Figura 23D). AA = controle positivo (ácido ascórbico; padrão de atividade antioxidante). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo AA; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo FMSO, (ANOVA “one way”, pós-teste de Tukey).

## 6. DISCUSSÃO

O uso de produtos de origem natural vem sendo amplamente empregado no tratamento de diversas enfermidades, seja como uma fonte alternativa de tratamento ou como único recurso utilizado por populações em diversos países ao longo da história (ATANASOV *et al.*, 2015.; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; DROBNIK; STEBEL, 2019).

No Brasil, a utilização de espécies vegetais com potencial atividade terapêutica veio a ser disseminada e fortemente arraigada em nossa sociedade principalmente pelas contribuições das culturas de matriz indígena e africana (HELMSTÄDTER; STAIGER, 2014). Tal conjuntura em consonância com o fato do Brasil possuir 20-22% de todas as plantas e microrganismos existentes no planeta fortalece a disseminação da utilização de produtos naturais como potenciais agentes terapêuticos (HELMSTÄDTER; STAIGER, 2014; BI; MAN; MAN, 2014).

Este quadro situacional relacionado à grande biodiversidade do país pode trazer mais que o ganho científico e terapêutico sobre a exploração racional da biodiversidade brasileira, levando o país à descoberta de novas fontes terapêuticas que reduziriam a importação de medicamentos, o que estimularia o desenvolvimento econômico com desdobramentos no mercado interno e nas exportações (NEWMAN; CRAGG, 2012; BI; MAN; MAN, 2014).

Com o crescente interesse em vista da necessidade da descoberta de novos fármacos, os produtos de origem natural, em especial aqueles de origem vegetal, têm-se tornado fonte atrativa para pesquisas que buscam o tratamento das mais diferentes afecções. É nesse contexto que extratos e metabólitos isolados de espécies vegetais são frequentemente empregados em pesquisas pré-clínicas como potenciais fontes terapêuticas no tratamento de fenômenos inflamatórios (NUNES *et al.*, 2019; HE, *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2019).

Até o momento, de acordo com levantamentos realizados junto ao PubMed (<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>) – um diretório de buscas on-line de livre acesso à citações e resumos de artigos de investigação na área biomédica; gerido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos e fundamentado na base de dados MEDLINE –, existem oito citações científicas referentes ao termo “*Sideroxylon obtusifolium*” e apenas três referentes ao termo “N-methyl-(2S,4R)-trans-4-hydroxy-l-proline”, o que demonstra uma incipiência de estudos referentes a linha temática aqui abordada.

Modelos de pesquisa *in vitro* e *in vivo* utilizando do emprego de células, p. ex. macrófagos RAW 264.7 (NUNES et al., 2019; SAIKI et al., 2019), ou camundongos das mais variadas linhagens (VILLAGÓMEZ-RODRÍGUEZ et al., 2019; LIM et al., 2019) vêm sendo amplamente empregados na investigação e na triagem de produtos de origem natural com potencial efeito farmacológico frente a fenômenos inflamatórios, como a dermatite (CHEN et al., 2017; CHOO et al., 2019).

A realização de testes toxicológicos antecedendo a investigação de possíveis efeitos farmacológicos é uma prática comum e necessária para aferir o início da segurança em avaliações clínicas e pré-clínicas. É nesse contexto que os resultados obtidos frente à Avaliação da Toxicidade Aguda por Via Oral (OECD GUIDELINE, 2001) e o Teste de Toxicidade Cutânea por Múltiplas Aplicações (YIMEI et al., 2008) foram fundamentais na garantia da segurança da utilização das drogas em teste, principalmente para proceder com o início dos testes e na avaliação das doses efetivas a serem empregadas nas análises do efeito anti-inflamatório tópico de FMSO e MTHP, assim como nas avaliações realizadas frente aos testes do MTT e LDH para o início dos experimentos *in vitro*.

Modelos animais de indução tópica do processo inflamatório empregando-se de agentes químicos como o TPA e o óleo de *Croton* a muito vem sendo utilizados (BOURIN et al., 1982; KWAK et al., 2002; MARYAM et al., 2019), sendo úteis para verificar o potencial anti-inflamatório de misturas e compostos isolados, servindo como importantes modelos para a elucidação de possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória em decorrência das aplicações e dos fenômenos observacionais ocorridos localmente (AQUINO et al., 2016; FUCINA et al., 2016; XIAN et al., 2018).

O agente irritativo óleo de *Croton*, extraído das sementes de *Croton tiglium*, possui como o seu maior constituinte o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), sendo este um ativador da cascata de inflamação do ácido araquidônico, por meio da ciclooxigenase e da lipoxigenase (COX-2 / LOX). Estes agentes induzem inflamação cutânea, aumentando à permeabilidade vascular, causando vasodilatação pela liberação de histamina, estimulando a migração de neutrófilos e macrófagos, além de promoverem a hiperproliferação celular (Tubaro et al., 1985; De Young et al., 1989). A ativação da via da MAPK, nestes modelos, promove a ativação de NF- $\kappa$ B e AP-1, fatores de transcrição nucleares que regulam diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS, além de moléculas de adesão (Pungeró et al., 1998; Chi et al., 2003; Murakawa et al., 2006; Badilla et al., 2007; Ferreira et al., 2010).

O edema vem a ser um dos parâmetros característicos do quadro inflamatório, sendo tipicamente associado a parâmetros como vermelhidão, calor, dor e alteração ou perda de função tecidual na área afetada (NEDOSZYTKO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014). A ação anti-edematogênica observada nos tratamentos com FMSO e MTHP vem a corroborar com as evidências de estudos farmacológicos que verificaram algum grau de ação anti-inflamatória sistêmica de derivados da entrecasca (ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010) e folhas de *S. obtusifolium* (AQUINO *et al.*, 2016, AQUINO *et al.*, 2017).

Vale observar que o padrão verificado para a curva dose resposta de FMSO frente a sua ação antiedematogênica e a posterior viabilidade celular testada frente às células RAW 264.7 pelo método do MTT demonstrou um comportamento parabólico típico de substâncias correlacionadas a um efeito hormético, o que não se observou nos tratamentos com MTHP.

O conceito de hormeses determina que este seja um processo de fase dual desencadeado por um estímulo potencialmente lesivo, onde, sob condições de estresse moderado, o organismo – sejam células, tecidos ou sistemas fisiológicos funcionais – é capaz de arquitetar uma resposta adaptativa e compensatória que o torna mais resistente a estresses de nível mais elevado ou que transforma estímulos potencialmente estressores, dependendo de sua intensidade, em ações mensuráveis benéficas ou prejudiciais às células ou ao organismo como um todo. Sendo assim, a dita zona hormética, como é conceitualmente conhecida na Farmacologia e Toxicologia, vem a ser um intervalo em que se observam efeitos benéficos em resposta a baixas doses do estímulo estressor, o que pode explicar os dados obtidos na aferição do edema e da viabilidade de células RAW 264.7 para a FMSO (CALABRESE; BALDWIN, 2001; RODRIGUES; BRANCO, 2019).

Muitas avaliações de possíveis atividades biológicas de produtos de origem natural fazem uso de modelos inflamatórios tópicos em murinos para a avaliação de eventuais efeitos anti-inflamatórios de extratos, frações ou moléculas isoladas. Estes estudos comumente correlacionam às atividades antioxidantes desses produtos naturais ao processo anti-inflamatório desempenhado por eles (CALOU *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2010; YOON, *et al.*, 2010; RAUH *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2018).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima abundante em granulócitos de neutrófilos. Esta enzima é uma peroxidase classificada como um marcador da inflamação. A MPO é considerada como um marcador de infiltração neutrofílica em tecido inflamado, sendo produzida e liberada por neutrófilos; estas enzimas catalisam a formação de

potentes agentes oxidantes como ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que por sua vez causa sérios danos celulares e, por conseguinte, algum dano tecidual (DERIN *et al.*, 2006; GORDON *et al.*, 2008).

Todos os tratamentos realizados com FMSO e MTHP foram capazes de reduzir significativamente a migração de neutrófilos para o tecido das orelhas sensibilizadas no protocolo de DCIA induzido por TPA, assim como no protocolo de DCIC induzido por Óleo de *Croton*, justamente pela avaliação da redução da atividade de MPO no tecido em teste. Tais resultados foram corroborados pela avaliação histológica das orelhas, onde os tratamentos por FMSO e MTHP foram capazes de reduzir as observações realizadas frente à quantidade de infiltrado inflamatório celulares no tecido em ambos os protocolos.

Estudos realizados por Aquino *et al.* (2017) e Aquino *et al.* (2019) foram capazes, respectivamente, de demonstrar a ação anti-inflamatória correlacionada ao tratamento sistêmico (AQUINO *et al.*, 2017) e a atividade cicatricial ligada ao tratamento tópico (Aquino *et al.*, 2019) pela MTHP. Um estudo, um tanto incipiente, foi realizado por Aquino *et al.* (2016) na observação de uma atividade anti-inflamatória tópica de um extrato metanólico proveniente das folhas de *S. obtusifolium*. Vale ressaltar que a metodologia de obtenção do extrato metanólico empregado por Aquino *et al.* (2016) diferiu abruptamente da metodologia utilizada neste estudo para a aquisição de FMSO.

Aquino *et al.* (2017) observaram que a utilização de MTHP no teste de formalina na pata traseira de murinos reduziu o tempo de lambadura, tanto na fase neurogênica, quanto na inflamatória, demonstrando um efeito de MTHP como agente antinociceptivo em ambas as fases, associado a isso observou-se a ação antiedematogênica deste composto frente ao modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Estes dados demonstraram alta consistência quando comparados aos resultados obtidos por nosso estudo, isso frente à ação edematogênica e anti-inflamatória tópica de FMSO e MTHP nos respectivos modelos de DCIA e DCIC por nós empregados.

Aquino *et al.* (2017) também evidenciaram que MTHP possuía efeito direto sobre a redução do infiltrado de células polimorfo nucleadas (PMN; prioritariamente neutrófilos) na observação da peritonite induzida por carragenina em camundongos; assim como na redução da liberação de MPO em neutrófilos humanos estimulados por um éster de forbol e na redução do número de células PMN em cortes histológicos de patas de camundongos edemaciadas pela indução por carragenina e corados com H&E. Aquino *et al.* (2019) demonstraram a ação de MTPH na redução da atividade de MPO frente aos tecidos submetido ao modelo de ferida cirúrgica em murinos. Tais achados



mais uma vez correlacionaram-se positivamente com os resultados por nós encontrados, quanto às análises histológicas realizadas e a quantificação da atividade de MPO no tecido de orelhas provenientes dos modelos de DCIA e DCIC por nós empregados neste estudo.

A cascata de sinalização inflamatória envolvendo citocinas em atividade no processo de instauração e perpetuação das dermatites é complexa e intrincada, podendo ser encarada de forma minimalista quando dividimos estas citocinas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Tal classificação apesar de útil não pode esquecer o caráter dual que algumas dessas citocinas vêm a exercer junto aos diferentes fenômenos biológicos de um sistema complexo como o corpo humano (OUYANG et al., 2011; MANNINO et al., 2015; MARTIN; RUSTEMEYER; THYSSEN, 2018; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína com capacidade de sinalização celular, estando intimamente envolvida no processo inflamatório e sendo uma das principais citocinas envolvidas em reações de fase aguda, sendo principalmente correlacionada a regulação das células imunes. Esta é produzida principalmente por macrófagos ativados, embora possa ser produzida por uma variedade considerável de diferentes tipos celulares. Por sua multifacetada interação na ativação de vias como a do NF- $\kappa$ B, apoptóticas e das MAPK, o TNF- $\alpha$  pode desempenhar diferentes funções no organismo, sendo responsáveis, por exemplo, pela geração de morte celular, caquexia, inibição da gênese tumoral e da replicação viral, desempenhando papel de pirogênio endógeno, agente pró-inflamatório, dentre outros (LIU et al., 2018; SACCO et al., 2019; LUBRANO; SCRIFIGNANO; PERROTTA, 2019; HIRAI et al., 2019; STOCK et al., 2019).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida e secretada por células T e macrófagos ativados frente a estimulação da resposta imune por fenômenos lesivos como, por exemplo, infecções e traumas teciduais. Assim como o TNF- $\alpha$ , IL-6 tem uma grande contribuição na indução da febre, atuando a nível hipotalâmico, assim como na resposta inflamatória aguda. IL-6 atua em receptores específicos da membrana de diferentes tipos celulares, estimulando a produção de citocinas, sendo também responsável pelo o amadurecimento dos linfócitos B (FERGUSON-SMITH et al., 1988; VAN DER POLL et al., 1997; SUZUKI et al., 2017; WENZEL, 2019).

A interleucina 1 (IL-1) é uma interleucina pró-inflamatória, cuja as suas duas subformas (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) possuem atividades biológicas muito semelhantes, IL-1 $\beta$  diferindo por ser sabidamente um pirogênio endógeno com ação direta sobre o centro regulador hipotalâmico. Com forte envolvimento em manifestações inflamatórias de fase

aguda, IL-1 é produzida intensamente por vários tipos celulares, dentre eles macrófagos, monócitos, fibroblastos, células dendríticas, células epiteliais, linfócitos B e células NK. Sua síntese pode ser induzida por TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , infecções bacterianas (LPS bacteriano), infecções vírais e certos antígenos (OPPENHEIM et al., 1986; DINARELLO, 1997; DINARELLO, 1988; CONTASSOT; BEER; FRENCH, 2012).

Originalmente denominados como fator de ativação de macrófagos, os interferons são citocinas induzidas em resposta a moléculas extracelulares. Estes são responsáveis por estimularem redes intra e intercelulares com intuito de regular a imunidade inata e adquirida, fazendo isso por meio de receptores de superfície celular de alta afinidade, os receptores Toll-likes. Ao se ligarem a estes receptores de membrana, os interferons estimulam a transcrição gênica de uma vasta rede de moléculas de sinalização, atuando em quase todos os tipos celulares (GRAY; GOEDDEL, 1982; NAYLOR et al., 1983; PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004).

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina pertencente à família dos interferons, sendo produzida por células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> ativadas e por células NK. Reconhecida como a principal mediadora da imunidade inata e adaptativa, o IFN- $\gamma$  regula positivamente vários parâmetros pró-inflamatórios, tais como algumas interleucinas, caspases e o TNF- $\alpha$ , sendo capaz de estimular macrófagos e células dendríticas na regulação de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), tornando assim mais eficaz a apresentação de antígenos para células T e aumentando a expressão de moléculas coestimulatórias (MÜHL; PFEILSCHIFTER, 2003; SCHOENBORN; WILSON, 2007; MILLER; MAHER; YOUNG, 2009).

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1, também denominada como CCL2) é uma citocina de baixo peso molecular, esta é responsável por atrair monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de inflamação produzidos em decorrência de lesões teciduais ou infecções, estando envolvida diretamente na patogenia de várias doenças que tem por característica maior a ocorrência infiltração por monócitos/macrófagos, como, por exemplo, a psoríase, a artrite reumatoide e a aterosclerose (CARR et al., 1994; XU et al., 1996; DESHMANE et al., 2009; XIA; SUI, 2009).

Aquino et al. (2017) observaram uma inibição das imunorreatividades aumentadas para iNOS, COX-2, TNF-alfa e NF-kB, observadas em patas edematosas de camundongos não tratados, isso em comparativo a ação de MTHP. Tais achados corroboram com a redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias por nós

evidenciada (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1) no modelo de DCIA induzida por TPA, assim como na redução da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  neste mesmo modelo. Isso se justifica, uma vez que as proteínas aqui correlacionadas têm participação direta na cascata de inflamação do ácido araquidônico (Tubaro *et al.*, 1985; De Young *et al.*, 1989), na ativação da via da MAPK e na promoção da ativação de NF- $\kappa$ B e AP-1, fatores de transcrição nucleares que regulam diversas proteínas pró-inflamatórias, além de moléculas de adesão e da promulgação de infiltrados celulares PMN no tecido comprometido do modelo de DCIA aqui adotado (Pungeró *et al.*, 1998; Chi *et al.*, 2003; Murakawa *et al.*, 2006; Badilla *et al.*, 2007; DESHMANE *et al.*, 2009; XIA; SUI, 2009; Ferreira *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos por Aquino *et al.* (2017) frente a redução das imunorreatividades relatadas, pode também correlacionar-se com a redução de TNF- $\alpha$  e IL-6 frente ao modelo de estimulação de macrófagos RAW 264.7 por LPS. Isso ocorre pelo fato do LPS ser um ativador e regulador da transcrição gênica via NF- $\kappa$ B em macrófagos (MACHADO, 2010; DU *et al.*, 2019; LIU, 2019; VITALI *et al.* 2019) e por possivelmente FMSO e MTHP atuarem inibindo esta via.

A interleucina 10 (IL-10), também denominada pela alcunha de fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF), é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por células T CD8<sup>+</sup> ativadas, esta interleucina regula diretamente a ação de monócitos/macrófagos e inibe a ativação de células T efetoras. Em menor grau a IL-10 pode ser produzida por linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por LPS. A regulação desta citocina ocorre através de sua inibição por IL-4 e pela sua própria autoregulação negativa, onde IL-10 induz uma pausa em sua própria liberação (WEI *et al.*, 2019; SARAIVA; VIEIRA; O’GARRA, 2019). Apesar de historicamente ser considerada uma citocina anti-inflamatória, IL-10 tem sido associada como uma interleucina pleiotrópica, sendo algumas vezes associada a uma função dual em processos inflamatórios (OUYANG *et al.* 2011, MANNINO, *et al.*, 2015).

Em nossos resultados tanto FMSO quanto MTHP promoveram a redução dos níveis de IL-10 no tecido das orelhas de murinos submetidos ao protocolo de DCIA induzida por TPA, onde o agente inflamatório por sua vez desempenhou um elevado aumento dos níveis desta citocina anti-inflamatória. Tal fato apesar de inicialmente ter nos causado surpresa, foi anteriormente relatado por Rakariyatham *et al.* (2019) no mesmo modelo de DCIA induzida por TPA. Rakariyatham *et al.* (2019) justificaram os baixos níveis de IL-10 resultantes do tratamento com suas drogas testes por meio da

evidência de um menor nível de inflamação nas orelhas dos camundongos, o que, portanto, geraria uma menor necessidade de nível elevados da citocina anti-inflamatória IL-10. Os altos níveis de IL-10 encontrados frente à indução por TPA podem ser igualmente justificados pela afirmação de Rakariyatham et al. (2019), pois é possível que estes índices elevados de IL-10 não estejam diretamente associados a sua relação pleiotrófica (OUYANG et al. 2011, MANNINO, et al., 2015), mas sim, sendo uma tentativa do organismo de depletar o processo inflamatório vigente.

Aquino et al. (2017) e Aquino et al. (2019) demonstraram uma propensão ou tendência de uma maior homeostase tecidual frente a tecidos induzidos aos modelos lesivos adotados em cada estudo e que foram tratados com MTHP. Tal fato, pode ser observado nas avaliações histológicas por nós realizadas nos modelos de DCIA e DCIA, onde o estímulo tecidual lesivo, por TPA ou Óleo de *Croton*, veio a ser parcialmente depletado ou mesmo revertido dentro destes modelos.

Assim como a atividade da MPO, os níveis teciduais de nitrato/nitrito vêm a ser um importante marcador do processo inflamatório já estabelecido, seja em tecidos ou no sobrenadante de células (GREEN *et al.*, 1982; GASPARRINI *et al.*, 2018). Os dados por nós obtidos demonstraram que FMSO e MTHP nas concentrações empregadas não estimularam por si só a produção de Nitrato/Nitrito no sobrenadante de células RAW 264.7 quando em comparação com células estimuladas por LPS. Este resultado corrobora com os dados Aquino et al. (2017) e por nós obtidos, uma vez que os níveis de nitrato/nitrito tenham sido reduzidos quando o estímulo por LPS veio a ser confrontado com os tratamentos, o que mais uma vez reafirma a ação anti-inflamatória dos compostos em análise.

A produção de ânion superóxido intracelular (ASO) por macrófagos é um importante evento durante o processo fagocitário, este vem a criar um estresse oxidativo (*burst* oxidativo) frente ao antígeno fagocitado que vem a ser fundamental para sua eliminação (DINAUER et al., 1998; NAUSEEF et al., 2004). Embora a importância de ASO no *burst* oxidativo seja inquestionável, a sua produção de forma desenfreada em um processo patológico vem a causar comprovadamente danos mitocondriais (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990; NAOI et al., 2005). Além disso, essa e outras espécies reativas de oxigênio quando acumuladas na região mitocondrial promovem diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e, caso este processo seja desenfreado, pode gerar a morte celular. É nesse contexto que os tratamentos com FMSO e MTHP reduziram satisfatoriamente os níveis de ASO a valores intermediários ao controle positivo (LPS) e

negativo (Tocoferol), o que aparentemente satisfaria as diretrizes necessárias à realização do *burst* oxidativo sem o comprometimento direto da célula (NAIK; DIXIT, 2011; DUARTE et al., 2018).

Aquino et al. (2019) demonstrou uma proeminente ação de MTHP frente a redução da peroxidação lipídica quando observados os níveis teciduais de malondialdeído (MDA). Os autores também observaram uma considerável elevação dos níveis de glutatona reduzida (GSH), assim como um moderado efeito antioxidante, verificado pelos autores no ensaio da atividade da superóxido dismutase (SOD). Tais achados vêm a confirmar o potencial antioxidante de FMSO e MTHP, uma vez que os testes da avaliação de atividade antioxidante não específica (eliminação do radical livre estável DPPH) corroboraram com os dados encontrados por Aquino (2019). Complementarmente a este fato, as avaliações da atividade antioxidante e seus mecanismos de proteção tecidual e de supressão da peroxidação lipídica observados pelos autores, vêm a explicar o potencial gerador de citoproteção de FMSO e MTHP frente a estímulos lesivos gerados pela peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em nossos estudos utilizando macrófagos RAW 264.7.

## 7 CONCLUSÃO

De uma forma geral, a conjuntura dos dados aqui expostos aponta para o potencial da atividade anti-inflamatória tópica de FMSO e MTHP frente a modelos de DCIA induzida por TPA e DCIC induzida por Óleo de *Croton*.

Assim, nossas investigações concluíram especificamente que:

- Frente aos parâmetros adotados, FMSO não demonstrou toxicidade em modelos de avaliação tópica e oral.

- A ação anti-inflamatória tópica de FMSO e MTHP está diretamente correlacionada à redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1, não estando correlacionada ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

- FMSO e MTHP provem a redução de infiltrado inflamatório, assim como do edema em tecidos inflamados.

- Ambos os compostos testados possuem atividade antioxidante bastante proeminente.

- MTHP possui potencial para compor um possível protótipo de medicamento que atue contra a DCI.

Espera-se que os dados aqui obtidos venham a estimular futuros estudos translacionais com foco na investigação e resolução de maiores atividades biológicas no emprego de FMSO e MTHP, assim como da própria *S. obtusifolium*.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; BASÍLIO, I. J.; NURIT, K.; BARBOSA, D. A. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. *Oecologia Brasiliensis*. Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 323-330, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brasil reduced by the high species richness of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 156-170, 2007.

AN, J.; LI, Z.; DONG, Y.; REN, J.; HUO, J. Amentoflavone protects against psoriasis-like skin lesion through suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and keratinocyte proliferation. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 413, n. 1-2, p. 87-95, 2016.

AQUINO, P.; FIGUEREDO, F. G.; PEREIRA, N.; NASCIMENTO, E.; MARTIN, A.; VERAS, H.; OLIVEIRA, C.; FERREIRA, S.; LEANDRO, L.; SILVA, M.; MENEZES, I. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico

das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. *Acta Biológica Colombiana*, v. 21, n. 1, p. 131-140, 2016.

AQUINO, P. E. A.; MAGALHÃES, T. R.; NICOLAU, L. A. D.; LEAL, L. K. A. M.; AQUINO, N. C.; SANTOS, S. M.; NEVES, K. R. T.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-L-proline from *Sideroxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. *Phytomedicine*, v. 24, p. 14-23, 2017.

AQUINO, P. E. A.; SOUZA, T. F. G.; SANTOS, F. A.; VIANA, A. F. S. C.; LOUCHARD, B. O.; LEAL, L. K. A. M.; ROCHA, T. M.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; AQUINO, N. C.; ALENCAR, N. M. N.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. The Wound Healing Property of N-Methyl-(2 S, 4 R)-trans-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is Related to its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. *Journal of evidence-based integrative medicine*, v. 24, p. 1-11, 2019.

ARAÚJO-NETO, V.; BOMFIM, R. R.; OLIVEIRA, V. O. B.; PASSOS, A. M. P. R.; OLIVEIRA, J. P. R.; LIMA, C. A.; MENDES, S. S.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Brasil, v. 20, n. 6. 2010.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCIO, J. F.; CORDERO, T.; MORA, G. Determination of topical antiinflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. *Pharmacogn Mag.*, v. 3, n. 11, p. 139-144, 2007.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. *Formulário Médico Farmacêutico*. Ed. 3, São Paulo: Pharmabooks, 2006.

BELL, S.; DEGITZ, K.; QUIRLING, M.; JILG, N.; PAGE, S.; BRAND, K. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell. Signal.* v. 15, p. 1-7, 2003.

BELTRÃO, A. E. S.; TOMAZ, A. C. A.; BELTRÃO, F. A. S.; MARINHO, P. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Brasil, v. 18, p. 696-698, 2008.

BI, W. P.; MAN, H. B.; MAN, M. Q. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 45, p. 17020-17028, 2014.

- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BONIFATI, C.; AMEGLIO, F.; CARDUCCI, M.; SACERDOTI, G.; PIETRAVALLE, M. Interleukin-1-beta, interleukin-6, and interferon-gamma in suction blister fluids of involved and uninvolved skin and in sera of psoriatic patients. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)*, v.186, p.23-24, 1994.
- BOURIN, M. C.; DELESCLUSE, C.; FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F.; SCHWEIZER, J.; KLEIN-SZANTO, A. J. P.; PRUNIERAS, M. Effect of phorbol esters on guinea pig skin *in vivo*. *Carcinogenesis*, v. 3, n. 6, p. 671-676, 1982.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.
- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. U-shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. *Annual review of public health*, v. 22, n. 1, p. 15-33, 2001.
- CALOU, I. B. F.; SOUSA, D. I. M.; CUNHA, G. M. A.; BRITO, G. A. C.; SILVEIRA, E. R. S.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate-and oxazolone. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 8, p. 1511-1516, 2008.
- CHATZIDIONYSIOU, K.; EMAMIKIA, S.; NAM, J.; RAMIRO, S.; SMOLEN, J.; HEIJDE, D.; DOUGADOS, M.; BIJLSMA, J.; BURMESTER, G.; SCHOLTE, M.; VOLLENHOVEN, R.; LANDEWE, R. Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 6, p. 1102-1107, 2017.
- CHAUHAN, A. K.; JAKHAR, R.; PAUL, S.; KANG, S. C. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis. *International immunopharmacology*, v. 18, n. 2, p. 340-346, 2014.
- CHEN, L. L.; ZHANG, H. J.; CHAO, J.; LIU, J. F. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation. *Journal of ethnopharmacology*, v. 204, p. 107-117, 2017.
- CHENG, C.; WU, H.; WANG, M.; WANG, L.; ZOU, H.; LI, S.; LIU, R. Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation of NLRP3 in mice. *Bioscience reports*, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2019.
- CHI, Y. S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem. Pharmacol.*, v. 66, n. 7, p. 1271-1278, 2003.



- CHOO, G. S.; LIM, D. P.; KIM, S. M.; YOO, E. S.; KIM, S. H.; KIM, C. H.; WOO, J. S.; KIM, H. J.; JUNG, J. Y. Anti-inflammatory effects of *Dendropanax morbifera* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages and in an animal model of atopic dermatitis. *Molecular medicine reports*, v. 19, n. 3, p. 2087-2096, 2019.
- CHOUDHARY, D.; ADHIKARY, S.; AHMAD, N.; KOTHARI, P.; VERMA, A.; TRIVEDI, P. K.; MISHRA, P. R.; TRIVEDI, R. Prevention of articular cartilage degeneration in a rat model of monosodium iodoacetate induced osteoarthritis by oral treatment with Withaferin A. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 99, p. 151-161, 2018.
- CHROBOK, N. L.; BOL, J. G. J. M.; JONGENELEN, C. A.; BREVÉ, J. J. P.; ALAOU, S. E.; LOPEZ, J. F.; FOURNET, G.; JOSEPH, B.; WILHELMUS, M. M. M.; DRUKARCH, B.; DAM, A. M. Characterization of Transglutaminase 2 activity inhibitors in monocytes in vitro and their effect in a mouse model for multiple sclerosis. *PloS one*, v. 13, n. 4, p. 1-12, 2018.
- CLARO, C. Eczema atópico na criança e no adulto. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, v. 27, n. 1, p. 78-82, 2011.
- CONTASSOT, E.; BEER, H. D.; FRENCH, L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss medical weekly*, v. 142, n. 2122, 2012.
- DAI, Bo et al. Coccomyxa Gloeobotrydiformis Polysaccharide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 51, n. 6, p. 2523-2535, 2018.
- DANILENKO, Dimitry M. An overview of the pathogenesis of immune-mediated skin injury. *Toxicologic pathology*, v. 44, n. 4, p. 536-544, 2016.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3-4):335-341.
- DELFINO, L.; MASCIADRI, S.; FIGUEREDO, E. Registro de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae) en bosques psamófilos de la costa atlántica de Rocha, Uruguay. *Iheringia: Série botânica*. v. 2, p.129-133. 2005.
- DERIN, N.; AGAC, A.; BAYRAM, Z.; ASAR M.; IZGUT-UYSAL, V. N. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochemistry and Function*, v. 24, p. 437-442, 2006.
- DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.*, v. 67, p. 69-77, 1999.
- DINARELLO, CHARLES A. Biology of interleukin 1. *The FASEB Journal*, v. 2, n. 2, p. 108-115, 1988.

- DINARELLO, Charles A. Interleukin-1. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 8, n. 4, p. 253-265, 1997.
- DINAUER, M. C. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. **Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood**, p. 889-967, 1998.
- DROBNIK, Jacek; STEBEL, Adam. Central European ethnomedical and officinal uses of peat, with special emphasis on the Tolpa peat preparation (TPP): An historical review. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 112248, 2019.
- DUARTE, Adriane Ribeiro et al. The inhibition of heme oxygenase-1 (HO-1) abolishes the mitochondrial protection induced by sesamol in LPS-treated RAW 264.7 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 296, p. 171-178, 2018.
- EGAWA, G.; KABASHIMA, K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: essential topics to prevent the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 138, n. 2, p. 350-358. Ed. 1, 2016.
- ENGBRETSEN, K. A.; THYSSEN, J. P. Skin Barrier Function and Allergens. **Curr Probl Dermatol**. v. 49. n. 1, p.90-102, 2016.
- ESSER, P. R.; MARTIN, S. F. Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Current allergy and asthma reports*, v. 17, n. 12, p. 83, 2017.
- FERGUSON-SMITH, Anne C. et al. Regional localization of the interferon- $\beta$ 2B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. **Genomics**, v. 2, n. 3, p. 203-208, 1988.
- Ferreira FS, Saraiva BRA, Araruna MKA, Menezes IRA, Costa JGM, Coutinho H DM, et al. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. *J Ethnopharmacol*. 2010;130(3):514–520. Doi: 10.1016/j.jep.2010.05.041
- FINBERG, Marike Johanna; MUNTINGH, George L.; VAN RENSBURG, C. E. J. A comparison of the leaf gel extracts of *Aloe ferox* and *Aloe vera* in the topical treatment of atopic dermatitis in Balb/c mice. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 6, p. 337-341, 2015.
- FLUHR, J. W.; DARLENSKI, R.; ANGELOVA-FISCHER, I.; *et al.* Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. **Skin Pharmacol Physiol**, v.21, p.124-135, 2008.
- FREINKEL, R.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. USA. Editora: Taylor & Francis, 2011.
- FUCINA, Giovana *et al.* Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 11, p. 2465-2474, 2016.

GALICKA, A. et al. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, v. 394, p. 217–224, 2014.

GAMA, L. U.; BARBOSA, A. A.; OLIVEIRA, P. E. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteriarami flora* e *P. torta* (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. Uberlândia, v.34, n. 3. 2011.

GASPARRINI, Massimiliano et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 578-587, 2018.

GELMETTI, C.; WOLLENBERG, A. Atopic dermatitis - all you can do from the outside. *Br J Dermatol.*, v.1, p.19-24, 2014.

GIL, Tae-Young et al. Anti-Atopic Dermatitis Effect of Seaweed Fulvescens Extract via Inhibiting the STAT1 Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.

GORDON, Joel S. et al. Topical N-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine inhibits mouse skin inflammation, and unlike dexamethasone, its effects are restricted to the application site. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 3, p. 643-654, 2008.

GRAY, Patrick W.; GOEDDEL, David V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 859, 1982.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p.131-138, 1982

GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*v.88, p.1–12, 2002.

HAN, S. C.; KOO, D. C.; KANG, N. J., et al. Docosahexaenoic acid alleviates atopic dermatitis by generating Tregs and IL-10/TGF- $\beta$ -modified macrophages via a TGF- $\beta$ -dependent mechanism. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 6, p. 1556-1564, 2015.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; *et al.* Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4995-5000, 2003.

HARVEY, Alan L.; EDRADA-EBEL, RuAngelie; QUINN, Ronald J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature reviews drug discovery*, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HE, Changliang et al. Kaempferol alleviates LPS-ATP mediated inflammatory injury in splenic lymphocytes via regulation of the pyroptosis pathway in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, p. 1-11, 2019.

HELMSTÄDTER, A.; STAIGER, C. Traditional use of medicinal agents: a valid source of evidence. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 1, p. 4-7, 2014.

HIRAI, Fumihito et al. Efficacy of enteral nutrition in patients with Crohn's disease on maintenance anti-TNF-alpha antibody therapy: a meta-analysis. **Journal of gastroenterology**, p. 1-9, 2019.

HORINOUCI, C. D. S.; MENDES, D. A. G. B.; NOLTE, S. *et al.* Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -Trihydroxylup-20(29)-ene on cutaneous inflammation. *Journal Of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 195, p.298-308, 2017.

Hospital Israelita Albert Einstein. **Dermatite e seus Tratamentos**, 11 de setembro de 2017. Disponível em: <<https://www.einstein.br/doencas-sintomas>>. Acessado em: 26 de outubro de 2019.

JEGAL, Jonghwan et al. Effect of Topically Applied Wikstroemia dolichantha Diels on the Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Symptoms in Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 914, 2019.

JOHNSON-HUANG, L. M.; MCNUTT, N.S.; KRUEGER, J.G.; *et al.* Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *Journal of Clinical Immunology*, v.29, p.247–256, 2009.

KANG, Su-Jin et al. Efficacy and safety of Soshiho-tang in patients with atopic dermatitis and gastrointestinal disorders: Study protocol for a double-blind, randomized, and placebo-controlled clinical trial. **Medicine**, v. 98, n. 18, 2019.

KOSTNER, L. ANZENGRUBER, F.; GUILLOD, C.; *et al.* Allergic contact dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics*, v. 37, n. 1, p. 141-152, 2017.

KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KULBERG, A.; SCHLIEMANN, S.; ELSNER, P. Contact dermatitis as a systemic disease. *Clinics in Dermatology*, v.32, n. 1, p.414–419, 2014.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE R.C. Immune surveillance in the skin: Mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* v.4, p.211–222, 2004.

KWAK, Wie-Jong *et al.* Effects of Ginkgetin from Ginkgo biloba leaves on cyclooxygenases and in vivo skin inflammation. **Planta medica**, v. 68, n. 04, p. 316-321, 2002.

- LARSSON, C. E.; LUCAS, R. Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária. *Interbook editorial LTDA*. São Caetano do Sul, SP, 2016.
- LEANDRO, L.M.G.; AQUINO, P.E.A.; MACEDO, R.O.; *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e modulatório de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. *E-ciência*. v. 1, n. 1, 2013.
- LEE, Ji Hyun; SON, Sag Wook; CHO, Sang Hyun. A comprehensive review of the treatment of atopic eczema. *Allergy, asthma & immunology research*, v. 8, n. 3, p. 181-190, 2016.
- LEE, Yeong-Geun *et al.* 6-Methoxyflavonols from the aerial parts of *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic Chemistry*, p. 102922, 2019.
- LEE; CHOO, Byung Kil *et al.* Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of ethnopharmacology*, v. 121, n. 1, p. 28-34, 2009.
- LEVIN, Cheryl; MAIBACH, Howard. Exploration of alternative and natural drugs in dermatology. *Archives of dermatology*, v. 138, n. 2, p. 207-211, 2002.
- LEVY, J.H. The human inflammatory response. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.27, p. S31–S37, 1996.
- LI, Shuai *et al.* Berberine Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage through Activation of AMPK. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 6, p. 1736, 2018.
- LIM, Ji-ye *et al.* Umbelliferone reduces the expression of inflammatory chemokines in HaCaT cells and DNCB/DFE-induced atopic dermatitis symptoms in mice. *International immunopharmacology*, v. 75, p. 105830, 2019.
- LIU, Chao *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Is Required for Mast Cell-Mediated Host Immunity Against Cutaneous *Staphylococcus aureus* Infection. *The Journal of infectious diseases*, v. 218, n. 1, p. 64-74, 2018.
- LIU, Xinhui *et al.* Dihydroartemisinin attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 117, p. 109070, 2019.
- LIU, Y.; WU, E. Q.; BENSIMON, A. G.; *et al.* Cost per responder associated with biologic therapies for Crohn's disease, psoriasis, and rheumatoid arthritis. *Adv Ther*, v. 29, p. 620-34, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DeltaDeltaCT method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOPES, Amanda DE ARAÚJO et al. Eugenol as a promising molecule for the treatment of dermatitis: antioxidant and anti-inflammatory activities and its nanoformulation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

LOU, Jing et al. Cytoprotective Effect of Taurine against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in UMR-106 Cells through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. **Biomolecules & therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 584, 2018.

LU, Yuanyuan et al. Antioxidant lignans and neolignans from *Acorus tatarinowii*. **Scientific reports**, v. 6, p. 22909, 2016.

LUBRANO, Ennio; SCRIFFIGNANO, Silvia; PERROTTA, Fabio Massimo. TNF-alpha inhibitors for the six treatment targets of psoriatic arthritis. **Expert review of clinical immunology**, n. just-accepted, 2019.

MACHADO, S. S. C. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF $\kappa$ B. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010.

MAN, George; HU, L.; ELIAS, P. M.; *et al.* Therapeutic benefits of natural ingredients for atopic dermatitis. **Chinese journal of integrative medicine**, p. 1-7, 2017.

MANNINO, Mark H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 103-107, 2015.

MARTIN, Stefan F.; RUSTEMEYER, Thomas; THYSSEN, Jacob P. Recent advances in understanding and managing contact dermatitis. **F1000Research**, v. 7, 2018.

MARYAM, Sonia *et al.* Evaluation of anti-inflammatory potential of the leaves of *Wendlandia heynei* (Schult.) Santapau & Merchant in Sprague Dawley rat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 238, p. 111849, 2019.

MAZZA, J.; ROSSI, A.; WEINBERG, J. M. Innovative uses of tumor necrosis factor alpha inhibitors. **Dermatol. Clin.**, p.28, v.559–575, 2010.

MCGUCKIN, Maryanne; GOVEDNIK, John. Irritant contact dermatitis on hands: literature review and clinical application. **American Journal of Medical Quality**, v. 32, n. 1, p. 93-99, 2017.

MILLER, Catriona HT; MAHER, Stephen G.; YOUNG, Howard A. Clinical use of interferon- $\gamma$ . **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1182, n. 1, p. 69-79, 2009.

MILLER, Dennis M.; BUETTNER, Garry R.; AUST, Steven D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.

- MIRAKHMEDOV, U. M.; BELOVA, L. V. Use of medicinal plants and preparations from them to treat various skin diseases. **Vestnik dermatologii i venerologii**, n. 7, p. 23, 1983.
- MOHLENHOFF, B. S.; O'DONOVAN, A.; WEINER, M. W.; *et al.* Inflammation, sleep, and dementia risk in posttraumatic stress disorder: a review. **Curr Psychiatry Rep**, 2017.
- MORAN, Anthony P.; PRENDERGAST, Martina M.; APPELMELK, Ben J. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 105-115, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSTOSI, C.; SIMONART, T. Effectiveness of Barrier Creams against Irritant Contact Dermatitis. **Dermatology**, v. 232, n. 3, p. 353-362, 2016.
- MOUSTAPHA, B.; MARINA, G. A.; RAÚL, F. O.; *et al.* Chemical constituents of the Mexican mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9397-9403, 2011.
- MOWAD, Christen. Generalized dermatitis in clinical practice. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 4, 2014.
- MÜHL, Heiko; PFEILSCHIFTER, Josef. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . **International immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1247-1255, 2003.
- MURAKAWA, Masao; YAMAOKA, Kumiko; TANAKA, Yoshitaka; *et al.* Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.
- NAIK, Edwina; DIXIT, Vishva M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 417-420, 2011.
- NAOI, Makoto *et al.* Oxidative stress in mitochondria. **Molecular neurobiology**, v. 31, n. 1-3, p. 81-93, 2005.
- NAUSEEF, William M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, n. 4, p. 277-291, 2004.
- NAYLOR, SUSAN L. *et al.* Human immune interferon gene is located on chromosome 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 157, n. 3, p. 1020-1027, 1983.
- NEDOSZYTKO, Bogusław; SOKOŁOWSKA-WOJDYŁO, M.; RUCKEMANN-DZIURDZIŃSKA, K.; *et al.* Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of

the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Advances in Dermatology and Allergology*, v. 31, n. 2, p. 84, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NGUYEN, Alan V.; SOULIKA, Athena M. The dynamics of the skin's immune system. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 8, p. 1811, 2019.

NICKOLOFF, B. J.; TURKA, L. A. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am. J. Pathol.*, v.143, p.325–331, 1993.

NIH, National Institutes of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. **Atopic Dermatitis**, 2016. Disponível em: <<https://www.niams.nih.gov/health-topics/atopic-dermatitis>>. Acessado em: 03 de novembro de 2019.

NOVAK-BILIĆ, Gaby *et al.* Irritant and Allergic Contact Dermatitis–Skin Lesion Characteristics. *Acta Clinica Croatica*, v. 57, n. 4, p. 713-719, 2018.

NUNES, Roberta *et al.* Effect of the metanolic extract from the leaves of *Garcinia humilis* Vahl (Clusiaceae) on acute inflammation. *Inflammopharmacology*, p. 1-16, 2019.

OECD, Guideline on acute oral toxicity (AOT). *Environmental health and safety monograph series on testing and adjustment number 425*. 2001. Disponível em: <[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd\\_gl425-508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl425-508.pdf)>. Acesso em: 4 de dezembro de 2017.

OPPENHEIM, Joost J. *et al.* There is more than one interleukin 1. *Immunology today*, v. 7, n. 2, p. 45-56, 1986.

OUYANG, Wenjun *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*, v. 29, p. 71-109, 2011.

PAN, J.; XIANG, Q.; RENWICK, A. B.; PRICE, R. J.; BALL, S. E.; KAO, J.; SCATINA, J. A.; LAKE, B. G. Use of a quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the induction of CYP1A, CYP2B and CYP4A forms in precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, v. 32, n. 97, p. 39-47, 2002.

PASSOS O. A.; RAITH, M.; KUSTER, R. M.; *et al.* Metabolite profiling of the leaves of the Brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. *Planta Med.*, v. 78, p. 703-10, DOI: 10.1055/s-0031-1298269, 2012.

PATTARINI, L.; SOUMELIS, V. Keeping skin inflammation local. *Nature Immunology*, v. 18, n. 3, p. 250-251, 2017.

PEDROSA, K. M.; GOMES, D. S.; LUCENA, C. M.; *et al.* Uso e disponibilidade local de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. PENN. (Quixabeira) em três regiões da depressão sertaneja da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Biofar*, v.12, p. 158-183, 2012.



PEREIRA, J. V.; FREIRES, I. A.; CASTILHO, A. R.; *et al.* Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharm Biol**, v. 17, p. 1-8, 2016.

PESTKA, Sidney; KRAUSE, Christopher D.; WALTER, Mark R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological reviews**, v. 202, n. 1, p. 8-32, 2004.

PINTO, N. B. *et al.* Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 740-743, 2010.

PINTO, Nicolás de Castro Campos *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337, 2015.

Pungeró V, Turull A, Queralt J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. *Inflammation*. 1998;22(3):307-314. Doi:10.1023/A:1022352200273.

PURIPATTANAVONG, J.; TUNGCHAROEN, P.; CHANIAD, P.; *et al.* Anti-HIV-1 integrase effect of compounds from *Aglaia andamanica* leaves and molecular docking study with acute toxicity test in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 4, p. 654-659, 2016.

PURIPATTANAVONG, J.; WEBER, S.; BRECHT, V.; *et al.* Phytochemical investigation of *Aglaia andamanica*. **Planta medica**, v. 66, n. 08, p. 740-745, 2000.

RAUH, Laryssa K. *et al.* Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 390-397, 2011.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; *et al.* In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H. 3RD; WOSTER, P. M.; *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, v. 55, p. 803-10, 1998.

REQUARDT, Hendrik *et al.* Surface defects reduce carbon nanotube toxicity in vitro. **Toxicology in Vitro**, 2019.

ROCHA, João *et al.* Reduction of inflammation and colon injury by a Pennyroyal phenolic extract in experimental inflammatory bowel disease in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109351, 2019.

RODRIGUES, Alice Cristina; BRANCO, Paola Cristina. Métodos em Farmacologia: Atualidades e Desafios. 2019.

SACCO, R. et al. Osteonecrosis and osteomyelitis of the jaw associated with tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) inhibitors: a systematic review. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2019.

SAIKI, Papawee et al. Novel and Stable Dual-Color IL-6 and IL-10 Reporters Derived from RAW 264.7 for Anti-Inflammation Screening of Natural Products. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 18, p. 4620, 2019.

SAMPAIO, T. P.; CARTAXO-FURTADO, N. A. O.; DE MEDEIROS, A. C. D.; *et al.* Antimicrobial Potential of Plant Extracts and Chemical Fractions of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) TD Penn on Oral Microorganisms. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 5, p. 392-398, 2017.

SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; *et al.* Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, n. 1B, p.321-324. 2009.

SBD, Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Dermatite de contato**. 2017. Disponível em: <<https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/dermatite-de-contato/2/>>. Acessado em: 03 de novembro de 2019.

SCHLIEMANN-WILLERS, S. et al. Natural vegetable fats in the prevention of irritant contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2002.

SCHOENBORN, Jamie R.; WILSON, Christopher B. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses. **Advances in immunology**, v. 96, p. 41-101, 2007.

SCHOEPE, S.; VONK, R.; SCHACKE, H.; *et al.* Shortened treatment duration of glucocorticoid-induced skin atrophy in rats. **Exp Dermatol**, v. 20, p. 853-5, 2011.

Schiantarelli, P., Cadel, S., Acerbi, D., Pavesi, L., 1982. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxican. *Drug. Res.* 32, 230–235.

STOCK, Angus T. et al. TNF and IL-1 Play Essential but Temporally Distinct Roles in Driving Cardiac Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 11, p. 3151-3160, 2019.

SUZUKI, Kotaro et al. Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis. **Allergology International**, v. 66, n. 3, p. 392-397, 2017.

SYED, Adnan K. et al. Staphylococcus aureus phenol-soluble modulins stimulate the release of proinflammatory cytokines from keratinocytes and are required for induction of skin inflammation. **Infection and immunity**, v. 83, n. 9, p. 3428-3437, 2015.

TAOFIQ, Oludemi et al. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. *Food and Chemical Toxicology*, 2019.

TRESCH, Milena et al. Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 174, 2019.

Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della-Loggia R. The croton oil test revisited. **Agents Actions**. 1985;17:347-349.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; *et al.* Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-285, 1987.

VAN DER POLL, Tom et al. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 439-444, 1997.

VILLAGÓMEZ-RODRÍGUEZ, Axel et al. Anti-inflammatory activity of *Jefea gnaphalioides* (a. gray), Astereaceae. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

VITAGLIANO, L.; BERISIO, R.; MAZZARELLA, L.; *et al.* Structural Bases of Collagen Stabilization Induced by Proline Hydroxylation. **Biopolymers**. v. 36. 2001.

WEI, W. C.; LIN, S.; CHEN, Y.; *et al.* Topical application of marine briarane-type diterpenes effectively inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and dermatitis in murine skin. **Journal of Biomedical Science**, v.18, p.94, 2011.

WEN, Zheng-Shun et al. Chitosan nanoparticles attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in mouse macrophage RAW264. 7 cells. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3582-3600, 2013.

WENZEL, Joerg. Cutaneous lupus erythematosus: new insights into pathogenesis and therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1-14, 2019.

WERFEL, T.; SCHWERK, N.; HANSEN, G.; *et al.* The diagnosis and graded therapy of atopic dermatitis. **Dtsch Arztebl Int.**, v.111, p.509-20, 2014.

WINKLER, T. Comments on 'Piperidone derivative from *Dalbergia sympathetica*'. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 571-572, 2006.

WITTMANN, M.; MCGONAGLE, D.; WERFEL, T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 25, n. 4, p. 443-51, 2014.

XIAN, Yan-Fang *et al.* Comparison of the anti-inflammatory effects of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* in mouse models of inflammation. **Phytomedicine**, v. 50, p. 196-204, 2018.

YANG, J.; LIN, Y.; GUO, Z.; *et al.* The essential role of MEKK3 in TNF-induced NFkappaB activation. **Nat. Immunol.** v.2, p.620–624, 2001.

YANG, X. *et al.* Hydroxytyrosol attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by regulating autophagy and sirtuin expression. **Current molecular medicine**, v. 17, n. 2, p. 149-159, 2017.

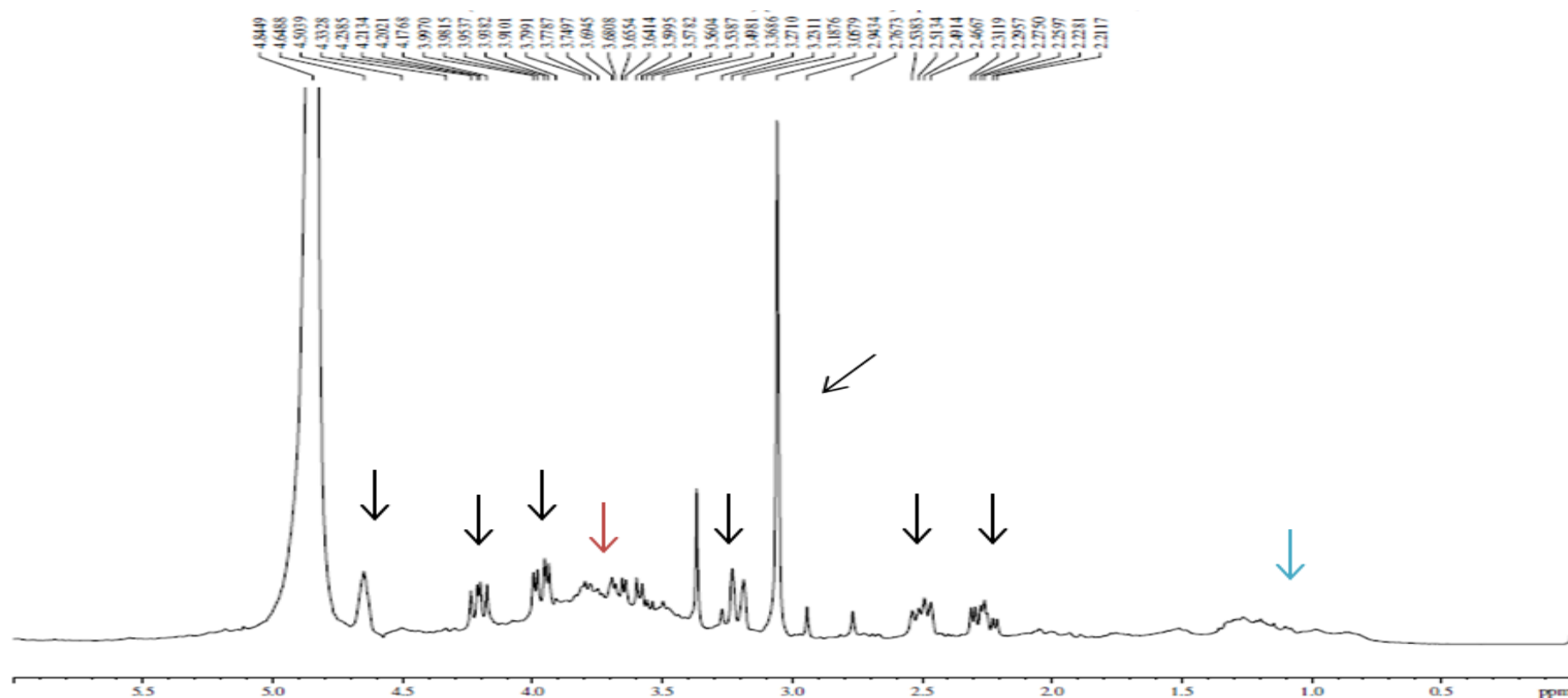
Yimei, J.; ZHAO, Guodong; JIA, Jicheng. Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 181-189, 2008.

YOON, Taesook *et al.* Anti-inflammatory effects of *Glehnia littoralis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 663-670, 2010.

YU, X. H. *et al.* Therapeutic window analysis of *Tripterygium wilfordii* processed by liquorice: an instantiation using allergic contact dermatitis. **China journal of Chinese materia medica**, v. 44, n. 16, p. 3454-3459, 2019.

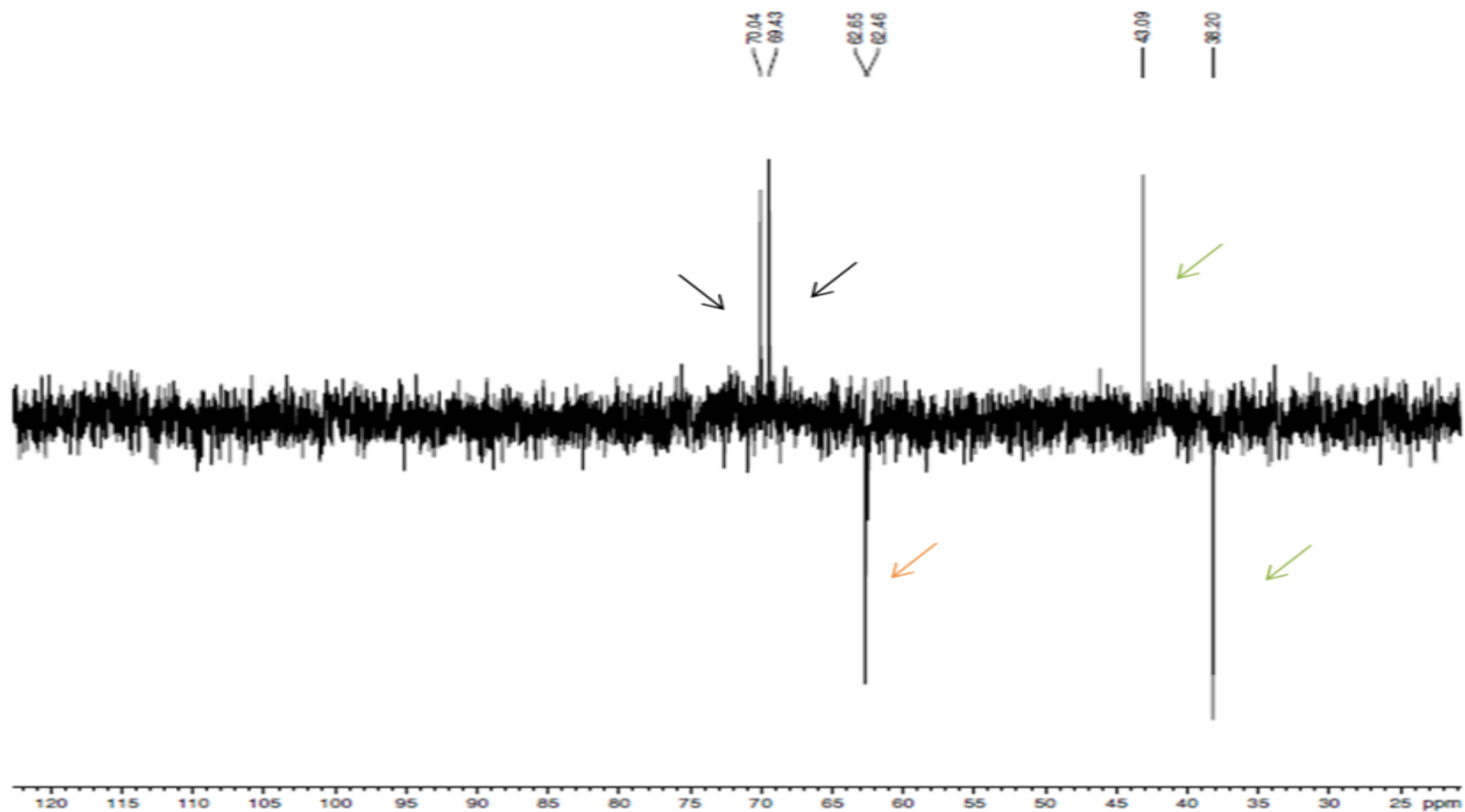
## ANEXO I – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DA FMSO COM IDENTIFICAÇÃO DE MTHP

Figura 1. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da FMSO



As setas na cor preta indicam sinais emitidos pelo derivado da prolina, o MTHP ( $\text{CH}$ ;  $\text{CH}_2$ ;  $\text{CH}_3$ ;  $\text{NCH}_3$ ). A seta em vermelho indica a presença do aminoácido serina. Já a seta em azul vem a indicar a presença de triterpenos (saponinas).

Figura 2. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) da FMSO.



As setas na cor preta indicam a presença de carbono  $-\text{CH}$ , a seta de cor laranja indica carbono  $-\text{CH}_2$  e as setas verdes indicam carbono  $-\text{CH}_3$ .

## ANEXO II – CERTIFICADOS DE AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Figura 1. Certificado



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da atividade anti-inflamatória de Sideroxylon obtusifolium e de N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina na dermatite de contato irritativa em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 9255280218 (ID 000223), sob a responsabilidade de **Flávia Almeida Santos e equipe; Paulo Iury Gomes Nunes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 26/04/2018.

We certify that the proposal "Study of the anti-inflammatory activity of Sideroxylon obtusifolium and N-methyl-trans-4-hydroxy-L-proline in irritative contact dermatitis in mice.", utilizing 8 Heterogenics mice (8 males), protocol number CEUA 9255280218 (ID 000223), under the responsibility of **Flávia Almeida Santos and team; Paulo Iury Gomes Nunes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/26/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de **05/2018** a **01/2020**

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [5 a 7 semanas](#)

N: [8](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, Nº 1315, 1º Andar. Bairro Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ceará.

Fortaleza, 01 de setembro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

## Figura 2. Errata - Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFC (ID 000112)



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Fortaleza, 17 de maio de 2019  
CEUA N 9255280218

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Flávia Almeida Santos  
Área: Departamento De Fisiologia E Farmacologia

Título da proposta: "Estudo da atividade anti-inflamatória de Sideroxylon obtusifolium e de N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina na dermatite de contato irritativa em camundongos".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFC (ID 000112)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 28/abril/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Em decorrência de problemas com a obtenção do material vegetal (drogas testes), houve um atraso no início deste estudo. Por este motivo, os testes in vitro foram inicialmente executados, em decorrência de seu baixo consumo de material vegetal. Os testes in vivo terão início ao final do mês de maio de 2019, possivelmente sendo concluídos no mês junho de 2019 e o processamento de todas as amostras a serem coletadas executado logo em seguida. 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: Em decorrência da possibilidade de repetições para a consolidação dos dados experimentais e pela possibilidade de solicitação de novos experimentos para responder novas questões que venham a surgir, acreditamos que o prazo final para coleta dos animais se estenda até a fevereiro de 2020. 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Não há. 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Não há. ".

Comentário da CEUA: "Se a solicitação é a extensão do prazo do projeto, não vejo motivos de não o ser feito, dada a argumentação feita pela pesquisadora, salvo melhor juízo ou outros fatos que possam surgir. Entretanto, é preciso verificar o planejamento da liberação de animais e possibilidade disso por parte do biotério setorial."

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará



### Figura 3. Errata - Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFC (ID 000111)



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Fortaleza, 17 de maio de 2019  
CEUA N 9255280218

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Flávia Almeida Santos  
Área: Departamento De Fisiologia E Farmacologia

Título da proposta: "Estudo da atividade anti-inflamatória de Sideroxylon obtusifolium e de N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina na dermatite de contato irritativa em camundongos".

#### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFC (ID 000111)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 02/maio/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o local de realização do estudo? Resp: Laboratório de Produtos Naturais (Prédio da Biomedicina; Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Campus do Porangabuçu, Universidade Federal do Ceará - Rua Coronel Nunes de Melo Nº 1315, 1º Andar, Bairro Rodolfo Teófilo). 2. Qual o número de animais utilizados até o momento? Especificar o número de animais por linhagem e gênero. Resp: Zero 3. Resumo da metodologia desenvolvida. Resp: Resumo: Dentre as mais diversas patologias que acometem a pele, a dermatite de contato irritativa (DCI) é a forma mais frequente de dermatose ocupacional e surge mediante a exposição única ou repetida a alguma substância. A dermatite de contato é um processo inflamatório cutâneo causado por um ou mais agentes exógenos que lesam direta ou indiretamente a pele, tendo, assim, envolvimento na liberação de mediadores inflamatórios, resultando em alterações na permeabilidade vascular e causando infiltração celular. As plantas medicinais têm sido tradicionalmente uma fonte importante para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos ao longo da história da humanidade. A Sideroxylon obtusifolium (Quixaba) é uma espécie nativa da região Nordeste do Brasil, utilizada na medicina popular para o tratamento de úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação crônica, lesão genital, inflamação dos ovários, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos, diabetes e com ação expectorante. Com base no potencial etnofarmacológico desta espécie vegetal, o presente estudo tem como objetivo investigar a sua ação anti-inflamatória em modelos experimentais de dermatite de contato irritativa em camundongos, verificando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito. Objetivos: Objetivo Geral: - Avaliar o efeito anti-inflamatório tóxico da fração metanólica do extrato aquoso das folhas de S. obtusifolium (FMSO), assim como de seu principal constituinte, a N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina (MTHP), em modelos de dermatite de contato irritativa em camundongos, investigando assim os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Objetivos específicos: - Avaliar a atividade antiedematogênica de FMSO e de MTHP em modelo de dermatite de contato irritativa aguda induzida por 13-acetato-12-o-tetradecanoil-forbol (TPA) ou capsaicina em camundongos, assim como no modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de Croton; - Avaliar a atividade de FMSO e de MTHP sobre a migração de neutrófilos (mieloperoxidase), quantificação de TNF-alfa (ELISA) e marcação tecidual de NF-kb e PCNA (Antígeno Nuclear de Células Proliferativas) por imunohistoquímica, além de avaliar a expressão gênica por PCR em tempo real para TNF-alfa, IL-6, IL-1b, IL-10, NF-kB e PCNA, realizando, também, a análise histológica em modelo de dermatite de contato irritativa por TPA em camundongos, assim como no modelo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de Croton; Justificativa e relevância: Com base no conhecimento etnofarmacológico da S. obtusifolium e da atividade antinociceptiva e antiinflamatória, em modelo de edema de pata e de peritonite, da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina, o presente estudo tem por propósito investigar o efeito anti-inflamatório tóxico da fração metanólica das folhas de S. obtusifolium, assim como de seu principal constituinte, a N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina, em modelos experimentais de dermatite de contato irritativa induzida em camundongos, verificando assim os seus possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito Delineamento experimental resumido: A quantidade dos animais levando-se em consideração que cada grupo terá 8 animais será apresentada em cada protocolo. O N de oito animais por grupo é preconizado na literatura como uma quantidade representativa para se trabalhar com animais que não apresentam isogeneidade, o que pode acontecer de alguns N ficarem fora da média padrão, e assim devem ser excluídos, por isso a importância de um N representativo de no mínimo 8 animais para se trabalhar com programas estatísticos de boa precisão. Algumas referências de artigos publicados em revistas científicas que trazem alguns dos protocolos aqui apresentados e o N de 8 animais: - Zhang M, et al. Caffeic Acid Reduces Cutaneous Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alfa), IL-6 and IL-1b Levels and Ameliorates Skin Edema in Acute and Chronic Model of Cutaneous Inflammation in Mice. Biol. Pharm. Bull., 37(3):347354, 2014. - Nakashima C., et al. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. J Allergy Clin Immunol., 134(1):100-7, 2014. Após os procedimentos experimentais, os animais serão eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg) misturado com lidocaína (10 mg/mL), administrado por via intraperitoneal (Procedimentos para Anestesia de Animais de Laboratório CREAL/2013). No protocolo de Dermatite de contato irritativa por TPA ou Capsaicina aqui apresentado irão conter 12 grupos experimentais, expostos como grupo controle veículo (2% Tween 80 em água destilada; 20 µl/orelha), grupo controle positivo (dexametasona 0,1 mg/20 µl/orelha) ou os grupos experimentais FMSO ou MTHP em cinco doses 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mg/orelha. No protocolo de dermatite de contato irritativa crônica por óleo de Croton será utilizada apenas a melhor dose da FMSO ou da MTHP, grupo veículo e grupo controle positivo, perfazendo um total de quatro grupos no protocolo. O modelo empregando o TPA, será

**ANEXO III – TABELAS DOS PARÂMETROS ANALISADOS NO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA  
POR VIA ORAL**

**Tabela 1. Massa corporal (g) dos animais que receberam 2% Tween 80 em salina por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1</b>	28	28	31	30	31	31	32	31	32	32	33	34	34	34	34	34	35	35	36	36
<b>2</b>	30	30	33	33	34	34	35	35	34	35	35	35	36	37	37	37	38	38	39	39
<b>3</b>	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27

**Tabela 2. Massa corporal (g) dos animais que receberam 2000 mg/kg de FMSO por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1</b>	31	31	32	31	32	32	35	35	35	35	36	36	36	38	37	37	38	39	39	40
<b>2</b>	30	30	30	31	32	32	33	35	34	35	35	35	36	36	36	36	37	37	37	38
<b>3</b>	29	29	31	31	31	31	35	35	35	37	36	36	37	38	37	39	40	40	40	40

**Tabela 3. Consumo total de ração (g) no grupo de animais que receberam 2% Tween 80 em salina por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	0	0	0	4	12	21	29	39	45	53	61	71	79	82	85	93	99
2	0	0	0	0	0	0	8	14	25	31	40	45	54	65	74	81	88	92	101	105
3	0	0	0	0	0	0	6	15	27	38	45	56	67	84	102	113	120	128	133	139

**Tabela 4. Consumo total de ração (g) no grupo de animais que receberam 2000 mg/kg de FMSO por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	0	0	0	6	15	24	31	40	46	54	61	71	78	83	90	105	110
2	0	0	0	0	1	1	7	14	21	27	39	46	47	53	61	68	76	80	87	91
3	0	0	2	2	3	3	11	20	30	38	49	53	62	70	79	87	95	100	108	112

**Tabela 5. Consumo total de água (mL) por animal que recebeu 2% Tween 80 em salina por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	3	5	5	25	38	50	60	70	76	82	92	105	120	130	145	154	169
2	0	0	0	4	7	7	32	42	63	72	82	89	96	108	123	139	148	162	170	183
3	0	0	0	0	3	3	20	35	47	57	67	75	83	95	112	129	136	149	157	172

**Tabela 6. Consumo total de água (mL) por animal que recebeu 2000 mg/kg de FMSO por gavagem**

Massa Corporal dos Animais (g)	Horas						Dias													
	0	1	2	4	6	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	3	3	3	3	30	42	51	61	71	79	87	100	119	139	158	178	186	195
2	0	0	0	2	2	2	25	40	65	75	85	90	96	106	122	138	157	175	184	192
3	0	0	2	3	3	3	29	44	60	71	81	89	98	111	126	142	163	181	188	196

**ANEXO IV – TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES**

**Tabela 1. Escores relativos aos parâmetros avaliados no teste de toxicidade cutânea por múltiplas aplicações em animais com a pele não escarificada (íntegra)**

	<b>Dias</b>									
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Formação de Eritema</b>										
Sham	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Não Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Formação de Edema</b>										
Sham	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Não Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota:** Os dados de preenchimento na tabela são provenientes da média estabelecida de cada grupo (n = 3) em análise.

**Tabela 2. Escores relativos aos parâmetros avaliados no teste de toxicidade cutânea por múltiplas aplicações em animais com a pele escarificada (lesada)**

	<b>Dias</b>									
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Formação de Eritema</b>										
Sham	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Não Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Formação de Edema</b>										
Sham	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Não Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escarificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nota:** Os dados de preenchimento na tabela são provenientes da média estabelecida de cada grupo (n = 3) em análise.

**ANEXO V – TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESCORES DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS PARA O TESTE DE EDEMA NA DCIA POR APLICAÇÃO DE TPA**

**Tabela 1. Veículo (TPA, 2,5 µg/orelha)**

<b>Amostras</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
1	1	3	2	0	1	0	0
2	1	3	2	0	1	0	0
3	1	3	2	0	1	0	0
4	1	3	2	0	1	0	0

**Tabela 2. Dexa (0,1 mg/orelha)**

<b>Amostras</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
1	0	0	1	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0

Tabela 3. FMSO (0,06 mg/orelha)

Amostras	Edema	Infiltrado Inflamatório	Vasos Sanguíneos Ectásicos	Vasos Neoformados	Hemorragia	Mastócitos	Cartilagem
1	1	2	1	0	0	0	0
2	1	2	2	0	1	0	0
3	0	1	1	0	0	0	0
4	1	2	1	0	0	0	0

Tabela 4. MTHP (0,06 mg/orelha)

Amostras	Edema	Infiltrado Inflamatório	Vasos Sanguíneos Ectásicos	Vasos Neoformados	Hemorragia	Mastócitos	Cartilagem
1	0	1	1	0	0	0	0
2	0	2	1	0	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0	0
4	0	1	1	0	0	0	0



**ANEXO VI – TABELAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NOS ESCORES DE ANÁLISES HISTOLÓGICAS PARA O TESTE DE EDEMA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE ÓLEO DE *Croton* NO MODELO DE DCIC**

**Tabela 1. Veículo (Óleo de *Croton*, 2,5 µg/orelha)**

<b>Amostras</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
1	1	3	2	0	0	0	0
2	1	2	1	0	0	0	0
3	1	3	2	0	0	1	2
4	0	3	2	0	0	1	2

**Tabela 2. Dexta (0,1 mg/orelha)**

<b>Amostras</b>	<b>Edema</b>	<b>Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Vasos Sanguíneos Ectásicos</b>	<b>Vasos Neoformados</b>	<b>Hemorragia</b>	<b>Mastócitos</b>	<b>Cartilagem</b>
1	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 3. FMSO (0,06 mg/orelha)

Amostras	Edema	Infiltrado Inflamatório	Vasos Sanguíneos Ectásicos	Vasos Neoformados	Hemorragia	Mastócitos	Cartilagem
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	2
4	1	1	1	0	0	0	1

Tabela 4. MTHP (0,06 mg/orelha)

Amostras	Edema	Infiltrado Inflamatório	Vasos Sanguíneos Ectásicos	Vasos Neoformados	Hemorragia	Mastócitos	Cartilagem
1	1	1	0	0	0	1	2
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0