



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Guilherme Cabral Gonçalves

***Centaurea benedicta* L.: uma fonte de cnicina com perspectiva para o tratamento de
inflamação cutânea**

Juiz de Fora
2019

Guilherme Cabral Gonçalves

***Centaurea benedicta* L.: uma fonte de cnicina com perspectiva para o tratamento de inflamação cutânea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

**Juiz de Fora
2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cabral Gonçalves, Guilherme.

Centaurea benedicta L.: uma fonte de cnicina com perspectiva para o tratamento de inflamação cutânea / Guilherme Cabral Gonçalves. -- 2019.

84 f. : il.

Orientador: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Centaurea benedicta. 2. Cnicina. 3. Edema de orelha. 4. Inflamação. 5. Atividade anti-inflamatória. I. Vieira de Sousa, Orlando, orient. II. Título.

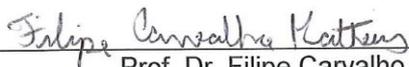
***Centaurea benedicta* L.: uma fonte de cnicina com perspectiva para o tratamento de inflamação cutânea**

Guilherme Cabral Gonçalves

ORIENTADOR (A): Orlando Vieira de Sousa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

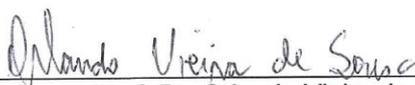
Aprovada em 16/07/2019



Prof. Dr. Felipe Carvalho Matheus



Prof^a. Dr^a Paula Rocha Chellini



Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

Dedico este trabalho aos meus pais Oscalino “in memoriam” e Wilma por todos os ensinamentos dados e por serem tão importantes na minha vida e a Luisa por ter sido a grande incentivadora para o início desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa pelo apoio e ensinamento diário durante estes dois anos nos estudos, eventos e escrita da dissertação.

Aos meus amigos do Mestrado. Agradeço pela ajuda e paciência durante os momentos difíceis da jornada.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo dia a dia partilhado comigo.

Aos professores Ademar Alves da Silva Filho, Paula Rocha Chellini, Maria Silvanda Alves e Ana Lucia Santos de Matos Araujo pelas valiosas contribuições na banca de qualificação e na organização desta dissertação.

Aos professores Felipe Carvalho Matheus, Paula Rocha Chellini, Rômulo Augusto Abreu Franchini e Ademar Alves da Silva Filho pelo aceite em participar da minha banca de Mestrado e por abrilhantarem este momento.

RESUMO

Centaurea benedicta L., conhecida como “cardo-santo”, é usada na medicina tradicional como tônico, antidepressivo, anti-inflamatório, antibacteriana e antisséptica. A presença de substâncias, tais como cnicina, uma lactona sesquiterpênica, pode ser responsável por suas propriedades terapêuticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato e da cnicina obtidos das folhas de *C. benedicta* em modelos experimentais. Após coleta, folhas foram submetidas à extração com diclorometano e etanol (9:1v/v) por lavagem foliar, obtendo o extrato ECB. Em seguida, ECB foi caracterizado por cromatografia em equipamento de UPLC-MS-Q/TOF e a cnicina (CNI) isolada em Coluna Líquida a Vácuo e identificada por cromatografia e espectrometria de massas. A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada pelo método de edema de orelha induzido por agentes flogísticos (óleo de Croton, fenol, capsaicina e histamina) nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/orelha. Mieloperoxidase (MPO), N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), óxido nítrico (ON) e análise histopatológica foram avaliadas. Os dados foram demonstrados como média \pm erro padrão e análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student–Newman–Keuls foi usada para medir o grau de significância ($p < 0,05$). Usando UPLC-MS-Q/TOF, com perfil cromatográfico, no tempo de retenção de 4,85 (modo positivo) e 4,87 (modo negativo), e espectro de fragmentação, a cnicina foi identificada. Após 24 horas de tratamento, ECB (59,76, 76,07 e 82,22% em doses crescentes) e CNI (39,59, 56,00 e 69,79% em doses crescentes) diminuíram a espessura do edema. ECB (68,07, 76,60 e 78,60%, 0,1, 0,5 e 1 mg/orelha, respectivamente) e CNI (89,64, 94,32 e 94,72% nas respectivas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/orelha, respectivamente) também reduziram a massa. As atividades de MPO e NAG e os níveis de ON foram reduzidos. A análise histopatológica revelou que a espessura do edema, os leucócitos e a vasodilatação foram inibidos após tratamento com ECB e CNI. Nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/orelha, a espessura (ECB = 48,10, 54,10 e 55,10% e CNI = 35,30, 47,60 e 47,10%, respectivamente) e a massa (ECB = 51,20, 58,70 e 62,50% e CNI = 65,80, 72,40 e 76,10%, respectivamente) foram diminuídas após indução do edema por fenol. ECB inibiu a ação da capsaicina reduzindo a espessura (37,75, 43,11 e 58,10% nas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/orelha, respectivamente) e a massa das orelhas em 34,01 (0,1 mg/orelha), 44,24 (0,5 mg/orelha) e 55,80% (1 mg/orelha), enquanto CNI não foi efetiva. Após 90 minutos de indução do edema por histamina, ECB e CNI reduziram a espessura e a massa do edema da orelha. Os resultados sugerem que ECB e CNI de *C. benedicta* apresentam atividade anti-inflamatória tópica, abrindo novas possibilidades para o tratamento de distúrbios associados a processos inflamatórios da pele.

Palavras-chave: *Centaurea benedicta*; cnicina; edema de orelha; inflamação; atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Centaurea benedicta L., known as "cardo-santo", is used in traditional medicine as tonic, antidepressant, anti-inflammatory, antibacterial and antiseptic. The presence of substances, such as cnicin, a sesquiterpene lactone, may be responsible for its therapeutic properties. The present study aimed to evaluate the topical anti-inflammatory activity of the extract and cnicin obtained from *C. benedicta* leaves in experimental models. After collection, leaves were extracted with dichloromethane and ethanol (9:1 v/v) by foliar washing for acquisition of extract ECB. Then, ECB was characterized by chromatography on UPLC-MS-Q/TOF equipment and cnicin (CNI) isolated in Vacuum Liquid Column and identified by chromatography and mass spectrometry. The topical anti-inflammatory activity was evaluated by the ear edema method induced by phlogistic agents (Croton oil, phenol, capsaicin and histamine) at the doses of 0.1, 0.5 and 1 mg/ear. Myeloperoxidase (MPO), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), nitric oxide (NO) and histopathological analysis were assessed. Data were demonstrated as mean \pm standard error and analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test was used to measure the degree of significance ($p < 0.05$). Using UPLC-MS-Q/TOF, with a chromatographic profile, at the retention time of 4.85 (positive mode) and 4.87 (negative mode), and fragmentation spectrum, cnicin was identified. After 24 hours of treatment, ECB (59.76, 76.07 and 82.22% in increasing doses) and CNI (39.59, 56.00 and 69.79% in increasing doses) decreased the thickness of the edema. ECC (68.07, 76.60 and 78.60%, 0.1, 0.5 and 1 mg/ear, respectively) and CNI (89.64, 94.32 and 94.72% at respective doses of 0.1, 0.5 and 1 mg/ear) also reduced the weight. MPO and NAG activities and NO levels were reduced. Histopathological analysis revealed that edema thickness, leukocytes and vasodilation were inhibited after ECB and CNI treatment. At doses of 0.1, 0.5 and 1mg/ear, the thickness (ECB = 48.10, 54.10 and 55.10% and CNI = 35.30, 47.60 and 47.10%, respectively) and weight (ECB = 51.20, 58.70 and 62.50% and CNI = 65.80, 72.40 and 76.10%, respectively) were decreased after induction of phenol edema. ECB inhibited the action of the capsaicin by reducing the thickness (37.75, 43.11 and 58.10% at the doses of 0.1, 0.5 and 1 mg/ear, respectively) and the weight of the ears at 34.01 (0.1 mg/ear), 44.24 (0.5 mg/ear) and 55.80% (1 mg/ear), while CNI was not effective. Ninety minutes after the induction by histamine, ECB and CNI reduced the thickness and weight of ear edema. The results suggest that ECB and CNI from *C. benedicta* leaves present topical anti-inflammatory activity, opening new possibilities for the treatment of disorders associated with inflammatory processes in the skin.

Keywords: *Centaurea benedicta*; cnicin; ear edema; inflammation; anti-inflammatory activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	P.
Figura 1 - Foto da espécie <i>Centaurea benedicta</i> L.	4
Figura 2 - Estrutura química da cnicina.....	8
Figura 3 - Biossíntese simplificada das lactonas sesquiterpênicas.....	10
Figura 4 - Mecanismo simplificado do processo inflamatório.....	13
Figura 5 - Coluna cromatográfica a vácuo durante o processo de separação.....	24
Figura 6 - Curva padrão para doseamento de proteínas totais.....	29
Figura 7 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de <i>C. benedicta</i>	33
Figura 8 - Frações obtidas após separação por coluna cromatográfica a vácuo.....	35
Figura 9 - Precipitado formado no balão após rotaevaporação e filtrado.....	36
Figura 10 - Rendimento total de cnicina ao final do processo.....	36
Figura 11 - Cromatograma da fração isolada do extrato de <i>C. benedicta</i>	37
Figura 12 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton.....	38
Figura 13 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre as atividades de MPO e NAG e ON em edema de orelha induzido por óleo de Croton.....	40
Figura 14 - Cortes histológicos representativos de fragmentos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com extrato de <i>C. benedicta</i> e cnicina.....	41
Figura 15 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	43
Figura 16 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.....	44
Figura 17 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre a espessura da orelha após indução do edema por histamina.	45
Figura 18 - Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre a massa da orelha após indução do edema por histamina.	46

LISTA DE TABELAS

	P.
Tabela 1 - Distribuição da <i>Centaurea benedicta</i> L. no mundo.....	4
Tabela 2 - Denominações populares da <i>Centaurea benedicta</i> L. em diferentes idiomas.....	5
Tabela 3 - Classificação taxonômica da espécie <i>Cnicus benedictus</i> ou <i>Centaurea benedicta</i>	5
Tabela 4 - Gradiente utilizado durante a análise por UPLC-Q-TOF.....	23
Tabela 5 - Gradiente de eluição em CLAE.....	25
Tabela 6 - Esquema para construção de curva padrão para doseamento de proteínas totais.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AEBt	Extrato aquoso das partes aéreas de <i>Baccharis trimera</i>
AFBt	Fração aquosa de sedimentos
AP-1	Proteína ativadora 1
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos
CLV	Coluna cromatográfica a vácuo
CNI	Cnicina
COX	ciclooxigenases
COX-2	ciclooxigenase-2
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DAMPs	Padrão molecular associado a perigos
DSS	Sulfato de dextrano
ECB	Extrato de <i>Centaurea benedicta</i>
EFBt	Fração sobrenadante etanólica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FPP	Farnesil pirofosfato
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos
GSH	Glutathiona
HEAS	Extrato hidroalcoólico de inflorescências de <i>Achyrocline satureioides</i>
HTBA	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina -1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-4	Interleucina 4
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
iNOS	atividade da óxido nítrico sintase induzível
IPP	Isopentenil difosfato
LOOH	hidroperóxido lipídicos

LTSs	Lactonas Sesquiterpênicas
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MG	<i>Mikania glomerata</i>
ML	<i>Mikania laevigata</i>
MPO -	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MVA	Mevalonato
NAG -	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NF-κB	Factor nuclear kappa B
ON	Oxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PKAM	Proteína quinase ativada por mitógeno
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PKC	Proteína quinase C
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)
TLRs	Receptores Toll-like
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
5- LOX	5-lipoxigenases

SUMÁRIO

	P.	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE.....	3
2.2	ESPÉCIE <i>Centaurea benedicta</i>	3
2.2.1	Aspectos botânicos e agronômicos.....	5
2.2.2	Usos medicinais e etnofarmacológico.....	6
2.2.3	Constituição química.....	6
2.2.4	Atividades biológicas e farmacológicas.....	7
2.3	CNICINA.....	8
2.3.1	Atividades biológicas e farmacológicas.....	8
2.4	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS...	9
2.5	ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	12
2.6	CARACTERÍSTICAS DA PELE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	14
2.7	PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE.....	16
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1	MATERIAL VEGETAL.....	22
5.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL E ISOLAMENTO DA CNICINA	22
5.2.1	Perfil cromatográfico do extrato de <i>C. benedicta</i> por UPLC-MS-Q-TOF.....	22
5.2.2	Isolamento da cnicina.....	24
5.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
5.3	ANIMAIS.....	25
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA.....	26
5.4.1	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de Croton.....	26
5.4.2	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol.....	26
5.4.3	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	27
5.4.4	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de histamina.....	27

5.5	ENSAIOS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	28
5.5.1	Obtenção do Sobrenadante.....	28
5.5.2	Dosagem de Proteínas Totais.....	28
5.5.3	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	30
5.5.4	Avaliação da atividade da enzima N-acetil-β-d-glucosaminidase (NAG).....	30
5.5.5	Determinação do óxido nítrico.....	30
5.6	ANALISE HISTOPATOLÓGICA.....	31
5.7	ANALISE ESTATÍSTICA.....	31
6	RESULTADOS	32
6.1	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE <i>C. benedicta</i>	32
6.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA.....	35
6.3	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE <i>Centaurea benedicta</i> E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CROTON.....	37
6.3.1	Efeito do extrato de <i>Centaurea benedicta</i> e cnicina sobre os marcadores inflamatórios.....	39
6.3.2	Análises histopatológicas do processo inflamatório cutâneo induzido por óleo de cróton.....	40
6.4	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE <i>Centaurea benedicta</i> E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR FENOL	42
6.5	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE <i>Centaurea benedicta</i> E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR CAPSAICINA.....	43
6.6	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE <i>Centaurea benedicta</i> E CNICINA SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR HISTAMINA.....	44
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÃO	55
9	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

Desde seus primórdios, o homem vive em contato direto com a natureza, a qual é responsável por fornecer condições para a sobrevivência e o desenvolvimento humano. Nessas condições, o conhecimento gradual, adquirido através de tentativa e erro, proporcionou o refinamento de técnicas que variam desde o preparo de alimentos à base de plantas até a criação de medicamentos. Por isso, ao longo dos anos, informações sobre plantas medicinais vêm sendo passadas de geração em geração, sendo, dessa forma, usadas por quase todas as culturas como fonte de cura e manutenção da saúde (JAMSHIDI-KIA et al., 2017).

O estudo de plantas através da avaliação de suas propriedades medicinais é considerado uma das ciências mais antigas em países como China, Grécia, Egito e Índia. Correlacionando o contexto histórico, a demanda global de medicamento a base de plantas não somente é grande, mas também crescente (HAMILTON, 2004) e o consumo dessas plantas, muitas vezes, é justificado pelo alto custo dos medicamentos sintéticos patenteados e a seus múltiplos efeitos colaterais. Sendo assim, o tratamento de muitos distúrbios usando plantas medicinais (por exemplo, alho, ginseng, gengibre, entre outras), ao longo do tempo, se tornou popular, o que despertou a atenção da comunidade científica, proporcionando um maior impacto acadêmico nas publicações com temas relacionados a plantas medicinais (RAFIEIAN-KOPAEI, 2012).

Segundo Takaki et al. (2007), o Brasil é um dos países com uma das maiores biodiversidades mundiais com aproximadamente 22% de todas as espécies vegetais do planeta e com uma extensa diversidade cultural. Apresenta cerca de 206 diferentes grupos indígenas inseridos neste contexto com grande potencial no processo de aprimoramento e descobrimento de novas plantas e princípios ativos com propriedades farmacológicas.

Centaurea benedicta L., originalmente oriunda da região asiática e europeia, é também denominada popularmente em países de língua portuguesa como “Cardo Santo” e “Cardo Bento”. Pertencente à família das Asteraceae, *C. benedicta* é uma planta que possui aproximadamente de 30 a 50 centímetros de altura e se caracteriza principalmente pelos seus usos medicinais, destacando como anti-inflamatório, cicatrizante, antitérmica, estimulador do apetite, aumenta a secreção biliar, fortalece o fígado, diminui a icterícia, entre outras aplicações (MABONA; VUUREN, 2013; ULBRICHT et al., 2008). Essas características

podem estar relacionadas ao sabor amargo da planta que é decorrente principalmente da cnicina, uma lactona sesquiterpênica encontrada em abundância nesta espécie. Entre os efeitos farmacológicos da *C. benedicta*, as ações antimicrobiana, citotóxica contra células cancerígenas, cicatrizante e anti-inflamatória têm sido alvos de estudos (AL-SNAFI, 2016; MABONA; VUUREN, 2013). Com base nestes aspectos, a avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do extrato das folhas de *C. benedicta* e cnicina podem contribuir para futuras aplicações terapêuticas em desordens cutâneas, subsidiando estudos e desenvolvimentos de produtos farmacêuticos e dermocosméticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae compreende cerca de 23.000 (vinte e três mil) espécies e pertence à divisão das Angiospermas com capacidade de produzirem frutos e flores. Com exceção da Antártida, as espécies podem ser encontradas em todo o mundo e apresentam papel proeminente no ecossistema terrestre com grande influência na evolução de muitas espécies de animais, como abelhas, vespas e beija-flores, que dependem da inflorescência para sua sobrevivência (FUNK, 2009; BARREDA, 2015).

Como característica fitoquímica marcante desta família, destacam-se as lactonas sesquiterpênicas que são encontradas em abundância. Sua biossíntese, diversidade química, estrutural e propriedades fisiológicas são frequentemente relacionadas ao sucesso adaptativo e evolutivo das Asteráceas (NGUYEN et al., 2016). Além disso, diversos gêneros e subgêneros desta família são usados na medicina popular devido à presença de ácidos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas, entre outros constituintes (GIAMBANELLI et al., 2018).

2.2 ESPÉCIE *Centaurea benedicta* L.

Centaurea benedicta L., (Figura 1) também denominada como *Cnicus benedictus* e *Cardus benedictus*, pertence à família Asteraceae e popularmente conhecida como “Cardo Santo”. É uma espécie definida como uma erva anual, nativa da região mediterrânea e distribuída principalmente por todo o Sudeste e região Central da Europa (Tabela 1). Na medicina tradicional indígena de vários países, esta planta é utilizada como tônico, antidepressiva, anti-inflamatória, antibacteriana e antisséptica, para o tratamento de queimaduras e feridas e na produção de licores e cervejas (PENG et al., 2017).

Figura 1- Foto da espécie *Centaurea benedicta* L.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

Tabela 1 - Distribuição da *Centaurea benedicta* L. no mundo.

Continentes	Países
África	Argélia, Líbia e Egito
America do Norte	Canadá e EUA
America do Sul	Equador, Argentina, Chile e Uruguai
Ásia	Afganistão, Irã, Iraque, Cazaquistão, Quirguistão, Tadjiquistão, Turcomenistão, Turquia, Uzbequistão, Jordânia, Líbano, Palestina, Síria, Turquia, China e Paquistão
Europa	Albânia, Bósnia e Herzegovina, Bulgária, Grécia, Itália e Macedônia

Fonte: AL-SNAFI, 2016; CAN et al., 2017.

Devido à sua popularidade e fama milagrosa, no início do século XVI, *C. benedicta* já era amplamente cultivada em jardins de mosteiros. Ao nível religioso, esta espécie era associada à purificação e, com isso, usada em rituais. Seu crescente sucesso fez com que adquirisse várias denominações populares ao redor do mundo em diferentes idiomas como listado na Tabela 2 (AL-SNAFI, 2016).

Tabela 2 - Denominações populares da *Centaurea benedicta* L. em diferentes idiomas.

Alemão	Benediktenkraut, Bitterdistel;
Árabe	Farasion, kanterionmubark, shokmubark, shokmarimi, shokbari;
Chinês	Cangyehua
Espanhol	Cardo santo
Inglês	Blessed thistle; Benedict's thistle
Frances	Chardonbénit
Português	Cardo-bento, cardo-santo
Russo	Benediktaptečnyj, knikusblagoslovennyj
Sueco	Kardbenedikt
Turco	Sevketi Bostan, şevketotu

Fonte: AL-SNAFI, 2016; CAN et al., 2017.

2.2.1 Aspectos botânicos e agronômicos

C. benedicta é uma erva de ciclo anual, que cresce em média de 30 a 50 centímetros de altura, com caules fortes cobertos por pêlos curtos, finos e macios (pubescente). Suas folhas são alongadas e espinhosas e suas flores são amarelas e tubulares. Para melhor detalhamento botânico da espécie, observa-se na Tabela 3 sua classificação taxonômica (AL-SNAFI, 2016).

Tabela 3 - Classificação taxonômica da espécie *Cnicus benedictus* ou *Centaurea benedicta*.

Reino: Plantae
Sub-reino: Tracheobionta
Superdivisão: espermatófita
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Asteridae
Ordem: Asterales
Família: Asteraceae/Compositae
Gênero: <i>Cnicus</i>
Espécie: <i>Cnicus benedictus</i> ou <i>Centaurea benedicta</i>

Fonte: AL-SNAFI, 2016.

2.2.2 Usos medicinais e etnofarmacológicos

C. benedicta, ao longo de gerações, foi usada na medicina popular (folhas, caules e flores) como estimulador de apetite, fortalecedor hepático, no tratamento de icterícia e flatulência, ajuda na digestão, regula o sistema reprodutivo feminino e aumenta o fluxo de leite em mães que estão na fase de amamentação. Historicamente, também há relatos do uso da *C. benedicta* como diurético, anticoncepcional, emenagoga (promove o fluxo menstrual), antitérmico e antimalárico. Na homeopatia, seu uso está relacionado ao tratamento de náuseas, dor no estômago do lado esquerdo, cálculos biliares, febre intermitente e aumento do fígado (AL-SNAFI, 2016; ULBRICHT et al., 2008).

2.2.3 Constituição química

Dentre a ampla variedade de metabolitos secundários encontrados na *C. benedicta*, as lactonas sesquiterpênicas são consideradas as principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos, destacando-se a cnicina. Entre os demais constituintes, poliacetileno, absinto, salonitenolida, artemisiifolina, triterpenóides (amirrenona, acetato de α -amirina, e acetato de multiflorenol), lignanas (trachelogenina, nortracheloside e arctigenina), flavonoides (apigenina-7-O-glicosídeo, luteolina e astragalina). A quantificação de constituintes revelou 8% de taninos e 0,3% de óleos essenciais, compostos fenólicos, saponinas, alcalóides, amido, glicosídeos, e cumarinas. O óleo de *C. benedicta* apresenta uma alta concentração de ácido linoléico, com aproximadamente 70% do total dos ácidos graxos, e α -tocoferol representando mais de 90% dos tocoferóis presentes na espécie. Dentre o conteúdo mineral presente nesta planta, destacamos a presença de K, Ca, Na, P, Mg, Fe, Zn, B, Cu, Mn, Cr, Co, Mo e Se, importante fonte mineral para dietas (AL-SNAFI, 2016).

Constituintes fenólicos, como ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina, ácido siríngico e silibinina B, assim como saponinas, alcalóides, amido, triterpenos e cumarinas, foram também caracterizados quimicamente (AL-SNAFI, 2016; CAN et al., 2017).

2.2.4 Atividades biológicas e farmacológicas

Szabó e colaboradores (2009) mostraram que os extratos das flores de *C. benedicta* apresentaram efeito antibacteriano frente a diferentes cepas ATCC gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) e gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*). Além disso, cnicina produziu uma expressiva atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (BACH et al., 2011). Tal efeito associa-se as substâncias cnicina e cinaropicrina que atuam inibindo a enzima bacteriana MurA através da ligação covalente do grupamento tiol da Cys 115. Com relação a estrutura-atividade da cnicina e cinaropicrina, acredita-se que seus ésteres de cadeia lateral possuam importante papel na inibição de MurA (AL-SNAFI, 2016; BACHELIER et al., 2006).

De acordo com Can et al. (2017), polifenóis presente nas folhas e raízes da *C. benedicta* estão relacionados às suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Considerando estes aspectos, o consumo regular da espécie pode ter um importante papel na prevenção de patologias, como câncer e doenças relacionadas ao fígado associados a processos inflamatórios e oxidativos. Além disso, a presença de silibina e ácido vanílico tem aumentado o consumo desta planta e sua utilização em fitoterapia, etnofarmacologia e nutrição.

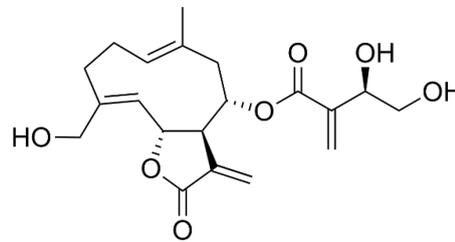
Outros efeitos terapêuticos da *C. benedicta* são o seu poder cicatrizante, sendo muito usada na forma de pasta para tratar úlceras (MABONA; VUUREN, 2013), e o emprego das partes aéreas como tônico, para aumentar o apetite e a secreção gastrointestinal (GHIASY-OSKOEAA et al., 2018).

O creme do pó de raiz de *Cnicus benedictus* foi utilizado para o tratamento de feridas induzidas em ratos e o efeito cicatrizante foi verificado após 14 dias de tratamento com uma cura total da ferida (DJAMILA et al., 2013).

2.3 CNICINA

Cnicina (Figura 2) é um composto abundante encontrado no gênero *Centaurea* e se caracteriza quimicamente como uma lactona sesquiterpênica que foi extraída e isolada pela primeira vez por Sorm e colaboradores em 1959 (MIZUNO; USUKI, 2018). Estudos demonstram seus potenciais biológicos e farmacológicos com atividades relacionadas à alelopatia, citotoxicidade, propriedades antibacterianas, atividade anti-mieloma e citostática (BACH et al., 2011; AL-SNAFI, 2016).

Figura 2- Estrutura química da cnicina



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

2.3.1 Atividades biológicas e farmacológicas

Como descrito por BACHELIER et al. (2006), a relação estrutura e atividade biológica evidenciou que a cadeia lateral da cnicina apresenta uma potente e irreversível inibição da enzima bacteriana MurA, o que pode ser o provável mecanismo de ação para o efeito antibacteriano desta substância.

Cnicina mostrou efeito citotóxico frente a macrófagos humanos (BACH et al., 2011) e em células epiteliais do rim de porco (LLC-PK1), melanoma maligno humano (SK-MEL) e carcinoma ductal humano (BT-549) com valores IC_{50} de 23,3, 14,0 e 18,3 μ M, respectivamente (EREL et al., 2011), produzindo uma ação antiproliferativa. A ação citotóxica da cnicina foi também avaliada em mieloma múltiplo que revelou efeitos antiproliferativos potentes e induziu morte celular em linhagens celulares de mieloma primário, mesmo na presença de citocinas de sobrevivência e do microambiente tumoral. Outras linhas celulares de origem hematopoiética também sucumbiram à morte celular, ao passo que as células estromais e as células endoteliais não foram afetadas. A combinação da

cnicina com o padrão terapêutico ou experimental atual leva ao aumento da morte celular. A ativação de caspases, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e a regulação negativa do fator nuclear *kappa-light-enhancer* (NF-κB) de células B ativadas contribuem para os efeitos citotóxicos da cnicina. A análise de *microarray* mostra a regulação negativa de Pim-2, uma serina/treonina quinase. Pim-2 constitui uma nova cinase de sobrevivência para células de mieloma *in vitro* e é altamente expressa em células plasmáticas malignas, mas não em células *in vivo* normais. Portanto, a cnicina induz a morte celular do mieloma através de várias vias e revelou Pim-2 como um novo alvo molecular (JÖHRER et al., 2012).

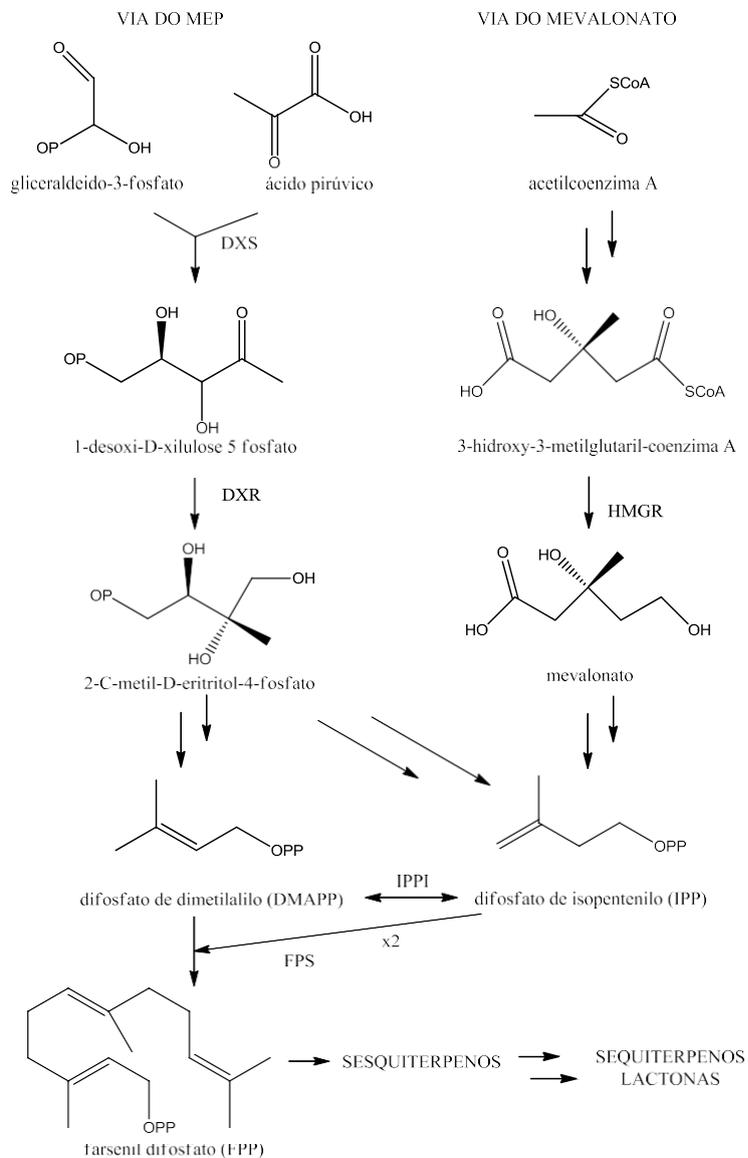
Considerando o efeito anti-inflamatório da *C. benedicta*, os achados experimentais mostram que pode ser devido à presença de cnicina, uma vez que essa substância foi capaz de inibir o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com valores de IC₅₀ iguais a 1,8 e 6,5 μM, respectivamente (AL-SNAFI, 2016; EREL et al., 2011).

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

As lactonas sesquiterpênicas (LSTs) são substâncias naturais caracterizadas como metabólitos secundários da classe dos terpenoides. Originado dos terpenos ou isoprenoides com estrutura construída a partir do isopreno que compreendem substâncias com esqueleto (C₅H₈). Dentre os subgrupos dos terpenoides, temos os hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e assim por diante (VOLLHARDT; SCHORE, 2004). A junção de três moléculas de isopreno derivados do ácido mevalônico, também conhecido como mevalonato, forma o farnesil pirofosfato (FPP). Derivados do FPP, sesquiterpenos, através de rearranjos mediados por enzimas e processos de ciclizações, formam diversos subtipos de compostos desta classe (ADEKENOV, 2017). No entanto, para um melhor entendimento de sua biossíntese, convém destacar que as lactonas sesquiterpênicas são derivadas do isopentenil difosfato (IPP) que pode ser sintetizado por duas vias diferentes: a via do mevalonato (MVA) e a via 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), como são mostradas na Figura 3. As enzimas da via MEP estão localizadas em plastídios (ou plastos), organelas presentes nas plantas responsáveis pela fotossíntese, enquanto as enzimas MVA são encontradas no citosol (VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2013).

As substâncias sesquiterpênicas são incolores lipofílicas com sua biossíntese oriunda de três unidades de isopreno (C_5H_8) que atuam na via do farnesil pirofosfato (FPP) no retículo endoplasmático da planta. Sua estrutura é composta por 15 átomos de carbono, com formas estruturais cíclicas e acíclicas, mas, em geral, destacam-se as formas cíclicas por serem mais funcionais. As lactonas sesquiterpênicas apresentam um anel lactâmico ligado a um esqueleto terpênico devido à oxidação da cadeia lateral do carbono na posição 3 que é responsável pela formação do anel lactona em sesquiterpenos do tipo germacranolídeos. O guaianolídeos e os eudesmolídeos são derivados deste último (CHADWICK et al., 2013).

Figura 3- Biossíntese simplificada das lactonas sesquiterpênicas.



DXS, 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato-sintase; DXR, 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase; IPPI, IPP-isomerase; FPS, farnesil difosfato sintase.

Fonte: Adaptado de VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2013.

Comuns em plantas das famílias Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae e Euphorbiaceae, são conhecidas mais de 5000 lactonas sesquiterpênicas (LTSs) que, em geral, apresentam distintas atividades biológicas. Dentre as ações farmacológicas destas substâncias, destacam-se a estabilização de quadros de diarreia, queimadura, gripe (influenza) e neurodegeneração. Além disso, seu potencial anti-inflamatório, antibacteriano, antimalárico, antifúngico e anticancerígeno (sensibilizador tumoral) tem sido destacado (CHADWICK et al., 2013). Devido a estes efeitos, as preparações de plantas contendo lactonas sesquiterpênicas são frequentemente usadas na medicina popular (MERFORT, 2002; CHADWICK et al., 2013).

Nas plantas, as LTSs são encontradas em tecidos especializados como tricomas glandulares, laticíferos, vacúolos, dutos de resina, corpos oleosos, órgãos como frutas e raízes ou na planta como um todo e atuam como compostos de defesa, aleloquímicos, afetando o crescimento de outras plantas e atraindo polinizadores. Neste contexto, algumas lactonas sesquiterpênicas atuam destruindo a parede celular de fungos e bactérias invasoras ou na proteção da planta ao estresse ambiental e, conseqüentemente, danos oxidativos (CHADWICK et al., 2013; PERASSOLO et al., 2018).

Apesar de múltiplos alvos serem propostos para explicar o efeito inibitório tumoral de lactonas sesquiterpênicas, a maioria concentra sua ação no fator nuclear κ B (NF- κ B). O NF- κ B responde a uma variedade de estímulos, por exemplo, radiação ultravioleta, interleucinas, endotoxinas, fatores de necrose tumoral e antígenos bacterianos. Pensa-se também que desempenha um papel na destruição das vias de sinalização pelas quais as células *natural killer* e linfócitos T citotóxicos (CTLs) funcionam, promovendo uma superexpressão de NF- κ B que fornece resistência à resposta imunológica, bem como sendo integral na proliferação tumoral (RAVI; BEDI, 2004). Por conseguinte, está envolvido na resposta inflamatória e, por sua vez, desempenha um papel significativo na prevenção da carcinogênese (RAVI; BEDI, 2004). Brok et al. (1997) sugere que de 54 plantas medicinais mexicanas testadas, aquelas contendo eudesmanolídeos ou germacranolídeos mostraram um efeito significativo sobre o NF- κ B; e que o partenolídeo e a helenina eram especialmente citotóxicos. Desse modo, o efeito anti-inflamatório, característica clássica das lactonas sesquiterpênicas, nos trabalhos apresentado por Brok et al. (1997) e Sheehan et al. (2002), é demonstrado através da inibição fator de transcrição NF- κ B.

2.5 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

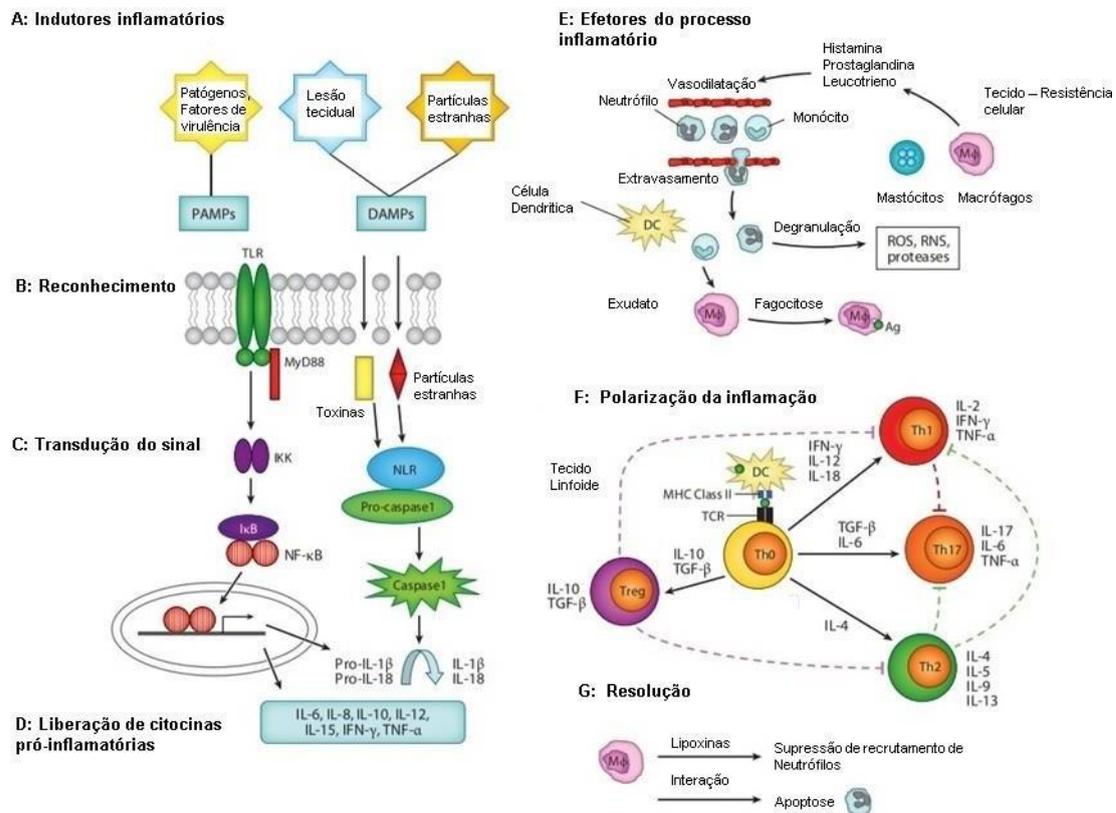
O reparo tecidual é necessário para a sobrevivência dos seres vivos e, neste contexto, o processo inflamatório estruturado de maneira correta é fundamental. A regulação da resposta inflamatória e imunológica é essencial, uma vez que seu descontrole causa grandes perigos, podendo até levar a morte, como nos casos agudos de anafilaxia não tratada rapidamente ou em quadros de asma, artrite reumatoide ou arteroscleroses (RANG et al., 2007). Dessa maneira, a inflamação se caracteriza como uma resposta do organismo através da presença de eritema (rubor), calor (elevação da temperatura na região), edema, dor e perda da função tecidual frente à ação de antígenos e patógenos ou estímulos irritantes de natureza química, físicos e/ou traumática. Tal processo tem como objetivo aumentar a vascularização do local e fornecer mecanismos de defesas ao agente nocivo, levando, assim, ao reparo tecidual e a homeostasia (IWALEWA et al., 2007).

Dentre os mecanismos oriundos do processo inflamatório, temos a imunidade inata que atua na fase inicial e aguda da inflamação, permanecendo por um curto período e em geral é benéfica ao hospedeiro. Em um segundo estágio, a inflamação crônica, por sua vez, merece maiores cuidados, podendo ativar uma resposta fibrinolítica, fazendo com que o tecido local perca sua função, predispondo assim o hospedeiro a várias complicações e doenças crônicas (REUTER et al., 2010).

Após a lesão, restos teciduais, reações de coagulação e possíveis agentes invasores ativam coletivamente uma resposta inflamatória que gera a liberação no local de fatores de crescimento e quimiotáticos. Inicialmente, os macrófagos, os neutrófilos e a imunidade inata atuam com objetivo de eliminar o agente invasor e o tecido danificado. Posteriormente, a preocupação do organismo é com o reparo tecidual (EMING et al., 2017).

Ao se tentar separar as subfases do processo inflamatório, temos uma fase aguda transitória, com aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo e vasodilatação localizada, orquestrada por mediadores como histamina e prostaglandinas, uma fase subaguda com infiltração de células leucocitária e fagocitárias e a fase proliferativa crônica com degeneração tecidual, fibrose e atuação de mediadores de cascatas enzimáticas como o sistema complemento, sistema da coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (BANGERT et al., 2011; MUELLER, 2006; RANG et al., 2007).

Figura 4 - Mecanismo simplificado do processo inflamatório



Ag, antígeno; DC, célula dendrítica; DAMP, padrão molecular associado a danos; IκB, fator nuclear do promotor do gene do polipeptídeo kappa light no inibidor de células B; IKK, inibidor da kappa B quinase; IFN-interferon gama; IL, interleucina; Mφ, macrófago; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; MyD88, gene de resposta primária de diferenciação mieloide (88); NF-κB, Factor nuclear kappa B; NLR, domínio de ligação a nucleótidos e receptores contendo repetições ricas em leucina; PAMP, padrão molecular associado a patógeno; RNS, espécies reativas de nitrogênio; EROs, espécies reativas de oxigênio; TCR, receptor de células T; TGF-β, fator de crescimento transformador beta; Th, célula auxiliar T; TLR, receptor do tipo toll; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; Treg, célula T reguladora.

Fonte: Adaptado de ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012.

A interação do tecido epitelial com agentes irritantes, tais como óleo de cróton, fenol e outros, desencadeia uma série de eventos, uma resposta fisiológica com o objetivo de destruir, diluir e/ou isolar o agente nocivo. O reparo começa na fase inicial da inflamação, mas só atinge sua conclusão após a neutralização da influência prejudicial presente no tecido inflamado. Após o contato com o agente irritante, mecanismos celulares e vasculares são disparados. Neste processo, macrófagos, células dendríticas e mastócitos, juntamente com mediadores químicos, atuam promovendo a vasodilatação local, permitindo assim a infiltração por

quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) e demais agentes moduladores do processo inflamatório. Desse modo, autacoides, como histamina, serotonina, bradicinina e leucotrienos, em geral, são liberados antes do início da resposta imune, desencadeiam efeitos como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (O'NEILL, 2006; RANG et al., 2007).

Destacam-se também o mediador, óxido nítrico (ON), que é produzido pelas células endoteliais e macrófagos locais, sendo um potente vasodilatador, pois aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas. Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interagem com células endoteliais das vênulas pós capilares gerando extravasamento de líquido com formação do edema. Além disso, a expressão de fatores de adesão como as selectinas e integrinas promovem a aderência dos neutrófilos circulantes no endotélio e, posteriormente, por quimiotaxia são direcionados até o local do edema que, com auxílio das opsoninas, promovem a opsonização do agente invasor e, conseqüentemente, sua fagocitose (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009).

2.6 CARACTERÍSTICAS DA PELE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A pele é o maior órgão do corpo humano com aproximadamente 1,5 a 2 m² de superfície (SPELLBERG, 2000) que atua como principal interface entre o corpo e o meio ambiente, proporcionando a linha de defesa inicial do organismo contra uma ampla gama de patógenos e agentes (térmicos, químicos e físicos). Com base nesses aspectos, a vida em um ambiente hostil proporcionou aos vertebrados o desenvolvimento de um complexo sistema imunológico (KUPPER, FUHLBRIGGE, 2004), uma vez que, frente a sinais de perigo, a epiderme e as células do sistema imune residentes ou atraídas atuam, inicialmente, através da ativação da imunidade inata e, posteriormente, a adaptativa, garantindo a homeostasia corporal (YAZDI, RÖCKEN, GHORESCHI, 2016). No entanto, o desequilíbrio imunológico e as falhas podem desencadear doenças inflamatórias agudas e crônicas da pele, como dermatite de contato alérgica e psoríase, que necessitam de medicações para a reversão do quadro patológico. Neste contexto, o tratamento tópico apresenta inúmeras vantagens, atuando diretamente no local da patologia e evitando assim inúmeros efeitos adversos dos agentes sistêmicos (SIGMUNSDOTTIR, 2010).

Considerando os aspectos anatômicos, histológicos e fisiológicos, a pele reflete a complexidade em suas funções, atuando na manutenção da temperatura corporal, como barreira protetora, na coleta de informações sensoriais sobre o ambiente e na atividade imunológica do organismo. A epiderme, a camada mais superficial da pele, é composta pelo estrato córneo, que é a região mais externa deste órgão e atua como barreira vital, e pelos estratos basal, espinhoso e granuloso. Entre as células especializadas da epiderme, destacam-se os melanócitos que são responsáveis pela produção de melanina e as células de Langerhans, células dendríticas que atuam diretamente nos processos imunológicos. Podem ser encontradas também no estrato basal e espinhoso células T raras, principalmente células T citotóxicas CD8⁺. Em relação à camada mais profunda da pele, a derme é composta por colágeno, fibras reticulares e tecido elástico. Entre suas células especializadas, destacam-se as células dendríticas, células T e células natural killer T. Além disso, estão presentes macrófagos, mastócitos e fibroblastos juntamente com vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (NESTLE et al., 2009).

Os queratinócitos compreendem cerca de 90% do número total de células encontradas na epiderme (SPELLBERG, 2000) e se destacam como os principais constituintes. Essas células reconhecem agentes estranhos e perigosos como os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) de origem microbiana e padrão molecular associado a perigos (DAMPs), como irritantes e toxinas, através de receptores Toll-like (TLRs) que estão presentes na superfície celular ou na superfície e de compartimentos endossomais. Através de mecanismos inflamatórios, esses receptores desempenham um papel ativo na resposta imune inata, secretando uma variedade de citocinas e quimiocinas (DONNARUMMA, 2011; NESTLE et al., 2009).

Em relação aos mediadores, os queratinócitos secretam interleucina 7 (IL-7), um fator de crescimento e sobrevivência que auxilia populações de células T presentes na epiderme, fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF). Esses fatores dão suporte e ativam populações de células de Langerhans. Os queratinócitos também apresentam em seu citoplasma grande quantidade de interleucina 1 α (IL-1 α) que, após liberação, induz a ativação da imunidade inata. Sendo assim, danos a queratinócitos geram extravasamento de IL-1 α e inicia-se a cascata inflamatória. Nesta situação, queratinócitos adjacentes recebem o estímulo da interleucina liberada e também secretam IL-1 α , interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF- α , potencializando assim ainda mais o processo pró-inflamatório (SPELLBERG, 2000). Então, a pele desempenha uma intensa

vigilância e sua desregulação impulsiona a patogênese de distúrbios inflamatórios (KUPPER, FUHLBRIGGE, 2004).

2.7 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE

Muitas doenças estão associadas com processos inflamatórios e necessitam de tratamento farmacológico. Neste contexto, é essencial compreender os possíveis mecanismos de ação de novos agentes terapêuticos, incluindo produtos naturais e plantas medicinais. Dentre os mecanismos das plantas medicinais com potencial anti-inflamatório, destaca-se a inibição da 15-lipoxigenase, óxido nítrico, cicloxigenases, fosfolipase A₂, citocinas pró-inflamatórias e a modulação da expressão gênica pró-inflamatória (OGUNTIBEJU, 2018). O potencial terapêutico das plantas e a necessidade de se desenvolver novos medicamentos mais potentes e seguros levaram pesquisadores a isolar e caracterizar substâncias afim de testar seu provável efeito anti-inflamatório (BHAGYASRI et al., 2015).

Resumos de artigos de revisão selecionados entre 2005 e 2016 por Azab et al. (2016), relatando os efeitos anti-inflamatórios de produtos naturais mostram que os principais temas abordados são, plantas brasileira, plantas medicinais e plantas medicinais indígenas. Entre os métodos de análise realizados destacam-se a indução do processo inflamatório em ratos e camundongos através de modelos diversificados *in vivo* (p. ex., edema de pata e de orelha) e modelos *in vitro*. Entre os principais efeitos sobre o processo inflamatório induzido, enfatizam-se os possíveis efeitos inibidores das substâncias ou extratos sobre os níveis de citocinas, enzimas pró-inflamatórias e possíveis efeitos analgésicos (AZAB et al., 2016).

Entre as plantas com propriedades anti-inflamatórias, destaca-se na literatura o potencial da família Asteraceae, um grupo abundante em gênero e espécie, com muitos estudos direcionados a este fim. Como exemplo de espécies muito utilizadas em nosso país, podemos destacar a carqueja (*Baccharis trimera*) (RABELO; COSTA, 2018), o guaco (*Mikania laevigata*) (DELLA et al., 2019), a calêndula (*Calendula officinalis*) (ALEXANDRE et al., 2018; LOVECKA et al., 2017; PARENTE et al., 2012), o assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) (RODRIGUES et al., 2016) a marcela (*Achyrocline satureioides*) (DE SOUZA et al., 2007), entre outras. Um breve relato da atividade anti-inflamatória dessas plantas foi descrito abaixo.

Extrato etanólico das folhas de *Vernonia polyanthes*, por exemplo, apresentou efeito anti-inflamatório ao reduzir edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar após aplicação das doses de 100, 200 e 400 mg/kg (TEMPONI et al., 2012). Nas doses de 200 e 400 mg/kg, este extrato inibiu o volume de exsudato e o número de leucócitos (migração leucocitária) no modelo de pleurisia induzida por carragenina (TEMPONI et al., 2012). Além disso, Rodrigues e cols. (2016) mostraram que os extratos hexânico e em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes*, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, apresentaram atividade anti-inflamatória ao diminuir o edema de orelha induzido pelos agentes flogísticos, como óleo de cróton, fenol, ácido araquidônico, fenilpropiolato de etila e capsaicina. Esses achados foram confirmados pela inibição da atividade da mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase, bem como da redução dos parâmetros inflamatórios demonstrados na análise histopatológica. Do ponto de vista de mecanismo, o efeito observado foi relacionado à inibição de mediadores inflamatórios, tais como serotonina, histamina, cininas, prostaglandinas ou ciclooxigenase, sugerindo que componentes dos extratos possuem um papel fundamental na proteção da inflamação aguda.

Extrato aquoso das partes aéreas de *Baccharis trimera* (AEBt), obtido por infusão, sofreu um processo de extração usando etanol, originando a fração aquosa de sedimentos (AFBt) e a fração sobrenadante etanólica (EFBt). Usando esses extratos, nas doses de 3, 30 e 300 μ g/kg, em modelo de edema de pata em camundongos Swiss induzido por carragenina, foi observado que EFBt causou redução do edema a de 49,3 a 58,2%, apresentando um melhor efeito quando comparado ao AEBt e AFBt. Diante dos dados obtidos, os autores sugerem que as propriedades antidematogênicas dos extratos podem está relacionadas com a inibição do metabolismo do ácido araquidônico (NOGUEIRA et al., 2011). Este efeito também foi descrito por De Oliveira e colaboradores (2012) que avaliou a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso e enriquecido por fenólicos da *B. trimera* em edema de pata induzido por carragenina e pleurisia. Doses de 400 e 800 mg/kg do extrato aquoso promoveram a redução do processo inflamatório, com redução do volume de exsudação e migração leucocitária, enquanto o extrato enriquecido, nas doses de 5 e 15 mg/kg, apresentou maior potencial anti-inflamatório. Pesquisa semelhante feita por Paul et al. (2009) também exhibe a atenuação de parâmetros inflamatórios ao se utilizar o extrato aquoso da *B. trimera* (400 e 800 mg/kg – intraperitoneal) frente a pleurisia em ratos induzida pela carragenina, comprovando assim em dois estudos o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso da “Carqueja”. Sugere-se que o bloqueio das ciclooxigenases e, conseqüentemente, a diminuição

da biossíntese de prostaglandinas sejam os mecanismos responsáveis pela capacidade do extrato de reduzir o edema, mas acredita-se que outras vias podem estar envolvidas também neste contexto (PAUL et al., 2009).

Extrato aquoso de flores de *Calendula officinalis*, administrado por via oral, nas doses de 10, 30 ou 90 mg/kg por 11 dias foi usado para tratar a perda óssea dos alvéolos dentários em ratos machos Wistar induzido por ligadura, um método eficaz para investigar a resposta inflamatória no periodonto (tecido conjuntivo que fixa os dentes no alvéolo). *C. officinalis* preservou a região em estudo quando comparada com o grupo controle negativo, tratado com solução salina. Tecidos gengivais foram utilizados para quantificar a atividade da mieloperoxidase (MPO), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Verificou-se que o extrato em concentração de 90 mg/kg reduziu a perda óssea e os mediadores inflamatórios analisados (ALEXANDRE et al., 2018). Extrato de flores de *C. officinalis* também demonstrou resultados satisfatórios na inibição do processo inflamatório no edema de pata induzido por carragenina e dextrano em estudo feito por Preethi e cols. (2009). A administração oral do extrato foi mais eficiente no controle do edema gerado pela carragenina. Em modelo de inflamação crônica usando formalina como agente flogístico o potencial anti-inflamatório também foi proporcional a dose de extrato administrada quando comparado com o grupo controle. De maneira complementar, foram dosadas as enzimas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), TNF- α e IFN-gama. A inibição do edema somado a inibição das enzimas pró-inflamatórias mostra o potencial da Calêndula de inibir a ciclooxigenase-2 (COX-2) e conseqüentemente a síntese de prostaglandinas (PREETHI; KUTTAN; KUTTAN, 2009).

Extratos de *Mikania glomerata* Spreng. (MG) e *Mikania laevigata* Sch. Bip ex Baker (ML), conhecido como guaco, foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória usando os ensaios de edema de pata, pleurisia e desgranulação de mastócitos peritoneais. A administração oral de MG e ML inibiu o edema de pata induzido por carragenina em 55% (400 mg/kg) e 57% (400 mg/kg), respectivamente, mas não impediram a desgranulação de mastócitos peritoneais de ratos Wistar. Embora MG não tenha inibido a infiltração celular na pleurisia, ML foi capaz de reduzir a migração de leucócitos nas doses de 200 (23%) e 400mg/kg (30%). Os resultados indicaram que a atividade anti-inflamatória de MG e ML pode estar associada com a presença de cumarina quantificada nas amostras, mas outros componentes podem envolver o efeito terapêutico dos extratos (DELLA et al., 2019).

Extrato hidroalcoólico de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (HEAS) foi avaliado em modelo de colite induzida por sulfato de dextrano (DSS) em camundongos. HEAS, na dose de 10 mg/kg, diminuiu o encurtamento do cólon evocado pela exposição ao DSS em 19%. Alterações patológicas no cólon foram melhoradas após tratamento com HEAS (10 e 100 mg/kg). A aplicação de HEAS (10 ou 100 mg/kg) não alterou os níveis de glutathiona (GSH) ou hidroperóxido lipídicos (LOOH) no tecido do cólon, mas restaurou totalmente a atividade da superóxido dismutase (SOD) aos níveis basais. HEAS confirmou a atividade antioxidante usando o ensaio do DPPH. O tratamento com HEAS (10 mg/kg) reduziu a atividade da MPO em 30%, enquanto a dose de 100 mg/kg foi capaz de restaurar os níveis desse parâmetro. O tratamento com HEAS, nas doses de 10 e 100 mg/kg, reduziu os níveis de TNF- α em 46 e 62%, respectivamente, enquanto os níveis de IL-6 foram diminuídos em 62 e 75% em camundongos colíticos nas respectivas doses. Além disso, a administração diária de HEAS (100 mg/kg) aumentou os níveis de IL-4 e IL-10 em 40 e 112%, respectivamente, assim como o nível de ON foi reduzido a 50% com 100 μ g/mL de HEAS. Esses dados sugerem que o extrato hidroalcoólico de inflorescências de *A. satureioides* apresentou atividade anti-inflamatória intestinal pela manutenção da barreira mucina intestinal e pela redução da migração de neutrófilos e a ativação de macrófagos, do dano oxidativo, dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (DA SILVA et al., 2016).

Entre as classes de substâncias presentes nas Asteraceae, podemos destacar o conhecido potencial anti-inflamatório dos terpenoides (SINGH; SHARMA, 2015). Semelhante aos terpenoides, os flavonoides também presentes nesta família apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, destacando-se seus potenciais efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (KUMAR; PANDEY, 2013). Sendo assim, produtos naturais são uma fonte inestimável de inspiração no desenho e desenvolvimento de drogas, a busca por novos candidatos a medicamentos com atividade anti-inflamatória tópica e produtos naturais em geral se tornou mais intensa ao se perceber que estruturas químicas biologicamente relevante não pode ser eficientemente explorado por compostos sintéticos. Recentes progressos têm focado na melhoria da potência, seletividade e farmacocinética de produtos naturais bioativos através de modificação estrutural (LACHANCE et al., 2002; GERRY, SCHREIBER, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

O tratamento da inflamação cutânea ainda é um desafio para pesquisadores e profissionais de saúde, uma vez que vários distúrbios de pele podem afetar a qualidade de vida das pessoas, causando morbidade e mortalidade (DAINICHI et al., 2014). Esses distúrbios se apresentam de diferentes formas, desde as mais simples e ocasionais erupções e vermelhidões, até condições crônicas como psoríase, rosácea, dermatite e acne (DAINICHI et al., 2014; HAHNEL et al., 2017). Em particular, aquelas lesões provenientes da desregulação da resposta imunológica da pele possuem tratamento limitado em decorrência do uso de imunossupressores sistêmicos na terapêutica (DAINICHI et al., 2014). No entanto, esses medicamentos podem causar efeitos adversos, tais como irritação gástrica, ulceração, hemorragia, insuficiência renal, nefrite intersticial, dor de cabeça, trombocitopenia, anemia hemolítica, asma, exacerbação, erupção cutânea, angioedema e prurido, o que restringem o seu uso prolongado (ALJEBAB et al., 2016; ALJEBAB et al., 2017). Diante desses efeitos nocivos, os produtos naturais e/ou plantas medicinais constituem alternativas dentro das estratégias que visam a busca de novos agentes anti-inflamatórios (ASHIMA, 2016).

Por outro lado, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, proposta pelo Ministério da Saúde do Brasil, tem como objetivos geral “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006). Além disso, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), também proposta pelo Ministério da Saúde do Brasil, contempla sistemas médicos complexos e recursos terapêuticos, que buscam estimular os mecanismos naturais de prevenção de agravos e recuperação da saúde por meio de tecnologias eficazes e seguras, com ênfase na escuta acolhedora, no desenvolvimento do vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade (BRASIL, 2015). Entre esses sistemas médicos, destacam-se a medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia, fitoterapia e da medicina antroposófica, além das práticas complementares de saúde. Com isto, a pesquisa e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos encontram-se de acordo com importantes políticas apoiadas pelo governo brasileiro.

Portanto, o presente trabalho tem como estratégia a busca de novos agentes para o tratamento de condições inflamatórias cutâneas a partir de produtos naturais e encontra-se respaldada por políticas governamentais.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato de *Centaurea benedicta* e sua substância isolada cnicina com intuito de buscar novas opções terapêuticas para o tratamento de processos inflamatórios cutâneos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina em modelos de edema de orelha.
- ✓ Analisar o efeito do extrato de *C. benedicta* e cnicina sobre marcadores inflamatórios indicativos da migração leucocitária;
- ✓ Realizar uma análise histopatológica dos tecidos submetidos ao tratamento com extrato de *C. benedicta* e cnicina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Centaurea benedicta* foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 16 de agosto de 2017. Uma exsicata (nº CESJ 71393), identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF.

As etapas de extração e identificação das substâncias obtidas do extrato foram realizadas no Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais – NIPPAN, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo mestrando Lucas Sales Queiroz. As amostras (extrato e cnicina) foram cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho para avaliar o potencial anti-inflamatório tópico. Os procedimentos foram descritos nos itens abaixo.

5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL E ISOLAMENTO DA CNICINA

Após coleta, 1000 g de folhas integras da espécie *C. benedicta* foram submetidas ao processo de lavagem foliar com diclorometano: etanol (9:1 v/v). Durante 30 segundos, por duas vezes com o mesmo material, partes aéreas de *C. benedicta* foram mergulhadas em um béquer contendo a mistura destes solventes (SANTANA, 2015). Em seguida, o extrato foi filtrado e os solventes foram recuperados por rotaevaporação até a obtenção de 15 g de extrato.

5.2.1 Perfil cromatográfico do extrato de *C. benedicta* por UPLC-MS-Q-TOF

O lavado foliar foi preparado para análise cromatográfica para análise geral dos componentes do extrato, com foco na busca pela cnicina.

Foram pesados em torno de 100 mg do extrato e foram adicionados 1 mL de metanol LC-MS (*BAKER ANALYZED*) para solubilização e posterior análise. Para facilitar o processo de solubilização dos compostos mais polares na amostra, o microtubo do tipo *ependorf* contendo a solução com extrato foi levado até o aparelho de ultrassom e aquecidos a 35 °C por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga por 5

min a 10.000 rpm e apos a centrifugação o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo onde 10% de água ultrapura foram adicionados para facilitar uma possível precipitação de impurezas nesta etapa. Em novos tubo foi feita uma nova centrifugação das amostras 5 min a 15.000 rpm. O sobrenadante foi coletado novamente e filtrado em unidade filtrante de poro 0,22 μm . A amostra e o branco (MeOH + água) foram levadas para análise em UPLC-MS-q/TOF.

Para separar os componentes da amostra foi usado o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C-18 2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm . A eluição foi feita por gradiente com fluxo linear de 400 $\mu\text{/min}$ o solvente A foi água purificada (filtração Milli-Q) com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B de acetonitrila (grau cromatográfico), o volume de injeção foi de 0,15 μl Os valores do gradiente estão descritos na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4 – Gradiente utilizado durante a análise por UPLC-Q-TOF.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0,4	95	5
2	0,4	95	5
14	0,4	2	98
16	0,4	2	98
20	0,4	95	5

Fonte: Dados fornecidos pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

Foi usado espectrômetro de massas da marca XEVO G2- S QTOF híbrido contendo um quadrupolo e um analisador por tempo de voo (TOF) de alta resolução. As condições de ESI- MS foram realizadas em modo negativo com as seguintes especificações: voltagem no cone de 40 V, Capilar de 3 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C, fluxo do gás de 50 L/hr, energia inicial de colisão foi de 6V para geração do íon precursor e taxa de fluxo de infusão 400 $\mu\text{/min}$. Para as análises MS/MS foi estabelecido a taxa de variação de m/z entre 100 – 1000, a energia de colisão em MS/MS foi feito em modo rampa variando de 15-30 eV. Para garantir a precisão da massa e reprodutibilidade, leucina encefalina (m/z 554,2615 em modo negativo) foi utilizado como o *lock mass* de referência.

5.2.2 Isolamento da cnicina

Com o objetivo de separação dos constituintes presentes no extrato e, principalmente com foco no isolamento da cnicina, 15 g do extrato obtido foram submetidos a fracionamento cromatográfico em coluna líquida a vácuo (CLV) (Figura 5). A fase móvel de escolha foi baseada no perfil de separação obtido por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizado mistura de clorofórmio: metanol com aumento crescente de polaridade. A mistura de sílicas adsorventes para composição da coluna foi de 300 g de sílica 40- 63 mm mais 100 g de sílica 70-230 mm. A amostra foi aplicada juntamente com Celite atingindo altura de 0,8 cm na coluna de vidro.

Figura 5- Coluna cromatográfica a vácuo durante o processo de separação



Fonte: Figuras fornecidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

5.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O precipitado branco obtido ao final da CLV foi submetido a análise por CLAE em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 mm), fluxo de 1mL/min, volume de injeção foi 30 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A análise de dados foi feita a partir do *Software* Empower 3, no qual a partir da varredura (190 – 400 nm) foi selecionada o comprimento de onda de 245 nm para leitura. sendo que o gradiente de eluição consistiu de fase binária composta de H₂O (acidificada com ácido acético glacial) e metanol seguindo a tabela abaixo:

Tabela 5 - Gradiente de eluição em CLAE

Tempo (min)	Fluxo	%H₂O	%MeOH
inicial	1.00	60.0	40.0
40.00	1.00	0.0	100
45.00	1.00	0.0	100
46.00	1.00	60.0	40.0
60.00	1.00	60.0	40.0

Fonte: Dados fornecidos pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

A amostra foi preparada para injeção no sistema CLAE através de solubilização em MeOH, com auxílio de banho ultrassônico aquecido a 35° C por 15 minutos. Em seguida, foi diluída com água até obter a proporção de 9:1 v/v (MeOH:água). A amostra foi centrifugada em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtrada em unidade filtrante de poro 0,45 µm.

5.3 ANIMAIS

Camundongos Swiss (30-35 dias e pesando 25-30 g), machos, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF e os animais foram mantidos em gaiolas de plástico (47 x 34 x 18 cm) com temperatura

de 23-25 °C, ciclo de luz 12/12 h, com ração e água *ad libitum*. Os mesmos foram ambientados na sala de experimento durante 24 horas antes da realização dos ensaios. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o número 022/2018.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos Swiss frente a diferentes agentes flogísticos. Ação desses agentes sobre a pele tem por finalidade mimetizar doenças inflamatórias cutâneas semelhantes àquelas observadas em humanos.

5.4.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de Croton

O edema de orelha induzido por óleo de Croton foi executado como descrito por Schiantarelli et al. (1982) com pequenas modificações. Os camundongos foram separados em grupos de 8 ($n = 8$) e a inflamação foi induzida com 20 μL de óleo de Croton 2,5% (v/v, diluído em acetona) aplicado na superfície interna da orelha direita, enquanto a orelha esquerda foi tratada com 20 μL de acetona. Após 15 minutos, a orelha direita foi tratada com extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), cnicina (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e o grupo controle negativo recebeu 20 μL de salina. Um grupo basal foi adicionado ao estudo. A espessura das orelhas (mm) foi medida após 6 e 24 horas para avaliar a evolução do edema, ao passo que a massa foi quantificada 24 horas após o tratamento. Para a eutanásia, uma sobredosagem anestésica com cetamina (300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg) foi utilizada. Os fragmentos das orelhas (direita e esquerda) foram removidos utilizando um punch metálico (Richter, 0,6 mm) e pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu). A diferença da espessura e massa (mg) entre as orelhas direita e esquerda (não inflamada) foi a medida do edema.

5.4.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

Como descrito por Lim; Park; Kim (2004), com modificações, a atividade anti-inflamatória tópica foi também avaliada pelo método do edema de orelha induzido por fenol. Assim como citado no item anterior, os camundongos foram separados em grupos de 8 ($n = 8$)

e a inflamação foi induzida com 20 μ L de fenol 10% (v/v, diluído em acetona) aplicado na superfície interna da orelha direita, enquanto a orelha esquerda recebeu 20 μ L de acetona. Após 15 minutos, a orelha direita foi tratada com extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), cnicina (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e 20 μ L de salina (grupo controle negativo). Um grupo basal foi adicionado ao estudo. O edema de orelha foi avaliado após 2 horas de tratamento através da medida da espessura e massa das orelhas, como descrito no método anterior.

5.4.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

O processo inflamatório foi induzido em camundongos como descrito por Silva et al. (2018) com pequenas modificações. Os camundongos foram separados em grupos de 8 ($n = 8$) e tratados com extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), cnicina (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e 20 μ L de salina (grupo controle negativo), enquanto os animais do grupo basal não foram tratados. Após 1 hora de tratamento, a inflamação foi induzida com 20 μ L de capsaicina 0,01mg/ μ L (v/v, diluído em acetona) aplicada na superfície interna da orelha direita e a orelha esquerda recebeu 20 μ L de acetona. Os animais, então, foram eutanasiados com sobredosagem anestésica (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg) após 30 minutos da aplicação do agente flogístico. A diferença da espessura (usando um micrômetro digital) e massa das orelhas (mg) direita e esquerda, usando fragmentos (0,6 mm) obtidos com punch metálico (Richter) e pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu), foi a medida do edema.

5.4.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de histamina

A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada pelo método descrito por Brand et al. (2002), com pequenas modificações. Camundongos Swiss foram divididos em grupos de 8 animais ($n = 8$). Inicialmente, os animais foram tratados com extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), cnicina (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha), dexclorfeniramina (0,1 mg/orelha) e 20 μ L de salina (grupo controle negativo), enquanto o grupo basal não sofreu nenhum procedimento. Trinta minutos após o tratamento, os animais foram anestesiados (cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg) e 10 μ L de uma solução de histamina (100 mg/mL) em solução salina foram aplicados intradermicamente com auxílio de uma agulha hipodérmica 30G. Na orelha esquerda, foi

administrado o mesmo volume de solução salina. O edema foi avaliado pela diferença da medida de espessura das orelhas direita e esquerda dos animais dos a cada 15 minutos por 90 minutos e através da medida da massa dos fragmentos de orelhas obtidos após a eutanásia dos animais.

5.5 ENSAIOS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

5.5.1 Obtenção do sobrenadante

Como descrito na metodologia de De Young et al. (1989), com pequenas modificações, três fragmentos (6 mm) de orelhas de camundongos, obtidos do ensaio com óleo de Croton, foram colocados em um gral de porcelana sob banho de gelo e adicionado 1mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTBA) e posteriormente triturados com auxílio de um pistilo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4. As amostras foram transferidas para um tubo de ensaio e sonificadas no ultrassom Ultra Cleaner 1600^a (Unique[®]) por 10 min. Finalizando o processo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e usados nas análises de proteínas totais, mieloperoxidase (MPO), N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e óxido nítrico (ON).

5.5.2 Dosagem de Proteínas Totais

O ensaio de doseamento de proteínas foi feito com base nas metodologias descritas por Lowry (1951) e modificada por Sargent (1987). As proteínas presentes na amostra reagem com o sulfato de cobre alcalino da mistura reativa, liberando cobre monovalente que reduz o heteropoliácidos do Reagente de Folin (p. ex: fosfomolibdato e fosfotungstato), formando o complexo molibdênio com coloração azul. Em tubos de ensaio, os experimentos foram feitos, em triplicatas, com 40 μ L do sobrenadante, 360 μ L de água destilada e 2 mL de mistura reativa (1,960 mL de solução alcalina, 1 g de NaOH mais 5 g de Na₂CO₃ em 250 mL de água, 20 μ L de tartarato de cobre e 20 μ L sulfato de cobre). Após 10 minutos, adicionou-se 200 μ L de solução Folin (1:5) em cada tubo de ensaio que foi mantido em repouso por 30 minutos. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro UV-VIS 1800 (Shimadzu[®]) a 660 nm, zerando o branco com água destilada. Da mesma forma, uma curva padrão de albumina 1 mg/mL (80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 e 400 μ g/mL) foi elaborada (Tabela 6).

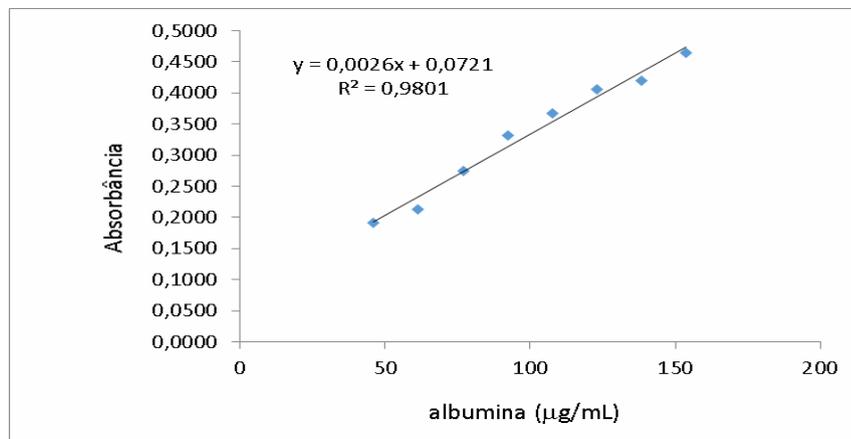
Usando análise de regressão linear, foi adquirida uma curva padrão com equação de reta $y = 0,0026x + 0,0721$ e coeficiente de determinação $R^2 = 0,9801$ (Figura 6). A partir dessa equação, as absorvâncias das amostras foram adicionadas a variável x para determinar as concentrações de proteínas totais nos fragmentos de orelha.

Tabela 6 - Esquema para construção de curva padrão para doseamento de proteínas totais

Tubo	H ₂ O (μL)	Albumina 1mg/mL (μL)	Mistura Reativa (mL)	Folin (μL)	Albumina (μg/mL)
Branco	400	-----	2	200	
1	320	80	2	200	30,80
2	280	120	2	200	46,15
3	240	160	2	200	61,54
4	200	200	2	200	76,92
5	160	240	2	200	92,31
6	120	280	2	200	107,70
7	80	320	2	200	123,08
8	40	360	2	200	138,50
9	0	400	2	200	153,80

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

Figura 6 - Curva padrão para doseamento de proteínas totais



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

5.5.3 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

MPO, uma hemoproteína localizada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e nos demais leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e basófilos) é usada como marcador de processo inflamatório (SANCHEZ; MORENO, 1999). Com base na metodologia de Bradley et al. (1982), modificada por De Young et al. (1989). Em triplicatas, 70 μL do sobrenadante do homogenato obtido no item 5.5.1 foram adicionados juntamente com 35 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 1,6 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) e 105 μL de peróxido de hidrogênio 0,003% v/v diluído em tampão fosfato de sódio 80mM (pH 5,4) para promover o início da reação. Posteriormente, a microplaca foi incubada a 37 °C por 5 minutos e 140 μL de ácido sulfúrico 4 M a 4 °C foram adicionados em cada poço para parar a reação. As absorvâncias foram avaliadas a 450 nm em leitor de microplaca (THERMOPLATE[®], TP-READER), zerando o branco com água destilada e os resultados expressos em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas).

5.5.4 Avaliação da atividade da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG)

Indicativo de leucócitos mononucleares nos tecidos, N-acetil- β -D-glucosaminidase foi quantificada para avaliar o processo inflamatório induzido por óleo de Croton. Para isso, foi usado a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). Análises, em triplica, foram feitas com 200 μL do sobrenadante do homogenato obtido no item 5.5.1 adicionados em placas de 96 poços juntamente com 50 μL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio 100 mM pH 4,5, para promover o início da reação. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 10 minutos e a reação interrompida pela adição de 100 μL de tampão glicina 200 mM pH 10,6 em cada poço. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE[®], TP-READER) em comprimento de onda de 405 nm e resultados expressos em densidade óptica/mg (mDO/mg) de proteína.

5.5.5 Determinação do óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (ON) foi analisada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito (NO_2^-) pelo método de colorimétrico de Griess (GREEN et al, 1982). O reagente de Griess consiste de uma mistura 1:1 da solução de

sulfanilamida a 1% (m/v) com a solução de α -naftil-etilenodiamina a 0,1% (m/v) ambas em ácido fosfórico a 5%. O homogenato foi preparado com os fragmentos de orelhas obtidos no modelo de edema induzido por óleo de Croton pela adição de 3000 μ L de salina tamponada (PBS – pH 7,2) e triturados por cerca de 60 s. O homogenato foi coletado, armazenado em microtubos a -80° C.

A concentração de nitrito foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 100 μ L do homogenato e 100 μ L do reagente de Griess. A microplaca foi incubada durante 20 minutos em temperatura ambiente. As medidas das absorvâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE[®], TP-READER) em comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) nas concentrações 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M. As absorvâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva padrão, e os resultados obtidos expressos μ M.

5.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Amostras de tecido, submetidas à inflamação com óleo de Croton, foram conservadas em formol 10% para análise histopatológica. Seções verticais dos fragmentos (6 mm) de tecido com intervalo de 6 micrometro entre os cortes e a utilização de microscopia ótica com aumento de 100x, 200x e 400x foram necessários para avaliar a infiltração de leucócitos e a vasodilatação em áreas representativas do tecido.

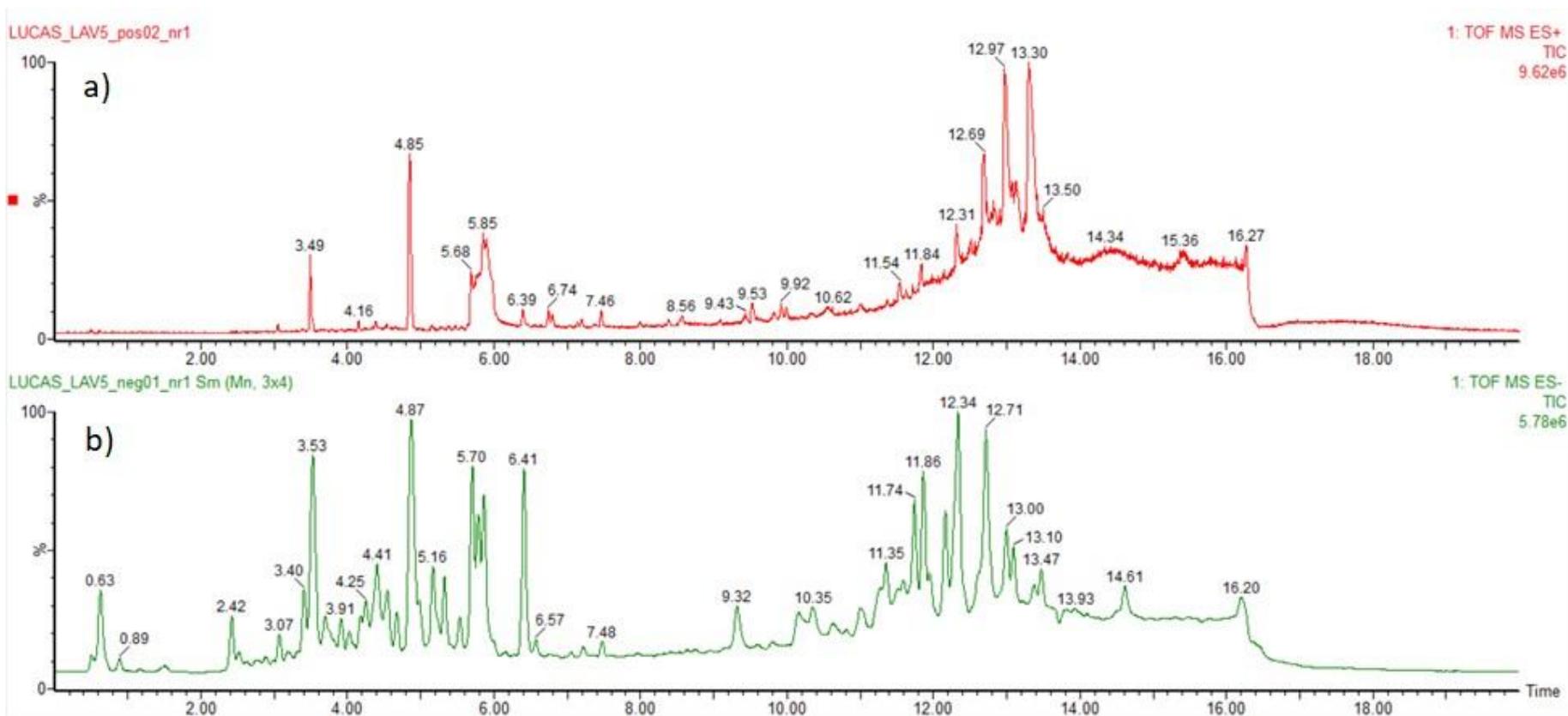
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

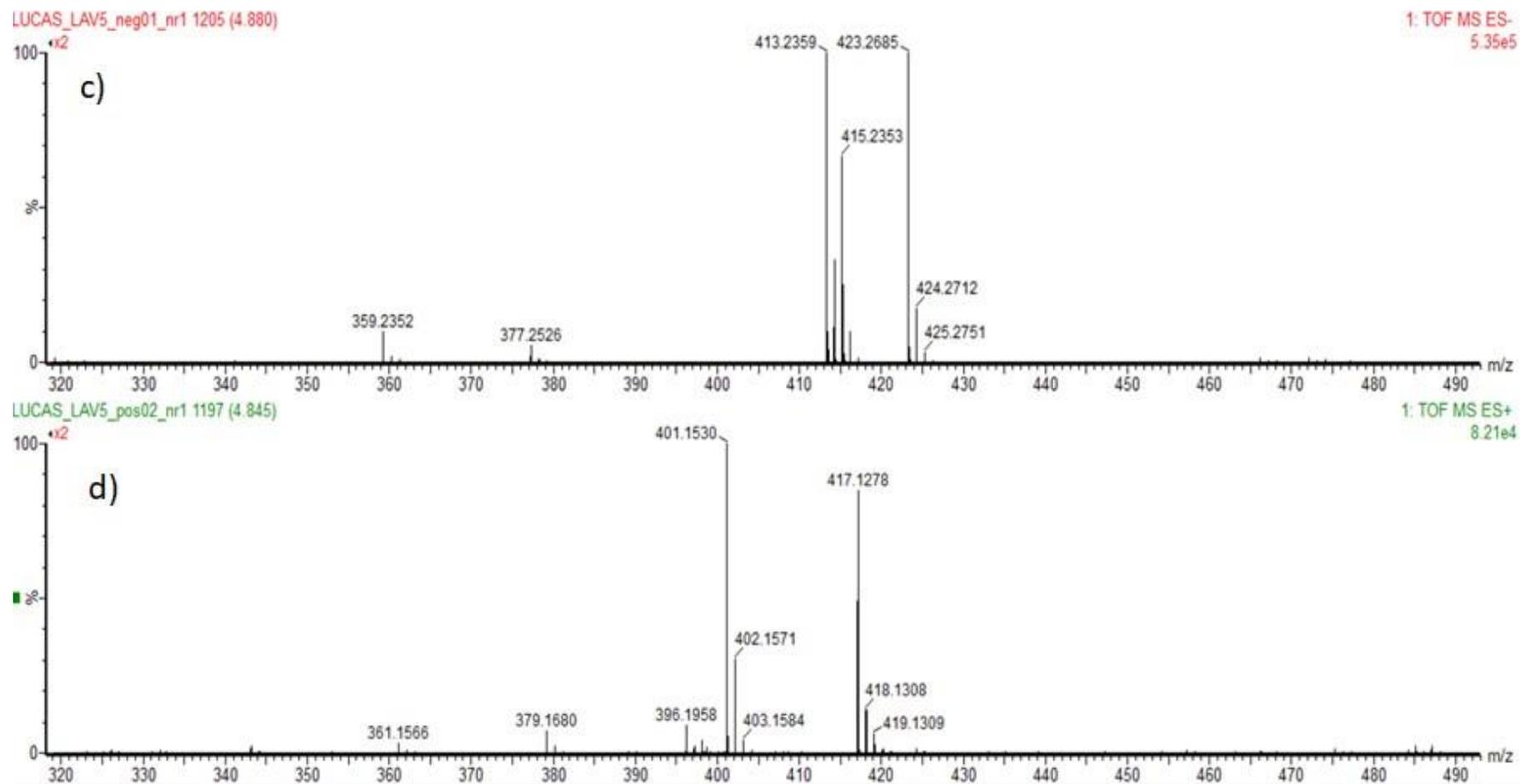
Os resultados foram demonstrados através da média \pm erro padrão médio (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student–Newman–Keuls foi utilizado para medir o grau de significância para $p < 0,05$. O programa Graph Pad Prism[®] 7.0. será empregado nessas análises.

6. RESULTADOS

6.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *C. benedicta*

Após processo de lavagem das partes aéreas foram obtidos 15 g de extrato que foram submetidos à análise em UPLC-MS-Q/TOF. Após análise foi possível observar a presença de uma substância com mesmo perfil de fragmentação da cnicina no extrato. No entanto seu perfil de fragmentação foi caracterizado pela formação de adutos, tanto para modo positivo quanto no modo negativo. Na Figura 7, é possível observar o cromatograma do extrato em modo positivo (Figura 7a) e no modo negativo (Figura 7b). Pode-se observar, no tempo de retenção de 4,85 (modo positivo) e 4,87 (modo negativo), a presença de uma substância que após análise do perfil de fragmentação foi identificada como sendo a cnicina. Para análise do perfil de fragmentação dessa substância o espectro de massas foi gerado (Figura 7c e 7d), devido a massa exata da cnicina de 378,168 g/mol, era esperado o aparecimento do sinal com massa carga (m/z) +H e -H para os modos positivos (+) e negativos (-), respectivamente. De fato, tais sinais foram observados sendo eles 377,2526 m/z (-) e 379,168 m/z (+), no entanto os sinais de maior abundância foram de 423,268 m/z (-) o que indica uma possível ligação do fragmento ao íon formiato (44,9982), logo $378,1679 + 44,9982 = 423,1661$. Outro sinal com grande abundância foi o de 413,2359 nesse caso ocorre possível formação de aduto com íon cloreto, já que massa do Cl= 34,9694, logo $378,1679 + 34,9694 = 413,1373$. Para o modo positivo, o sinal 401,1530 indica possível formação de aduto com íon sódio, sendo a massa do sódio 22,9892, logo $378,1679 + 22,9892 = 401,1571$.

Figura 7 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de *C. benedicta*



6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA

A partir de 15 g do extrato de *C. benedicta* foi então realizado uma CLV com intuito de isolar ou obter uma fração mais pura contendo cnicina. A fase móvel inicial foi de clorofórmio 100% com adição de metanol em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas num total de 10 frações (Figura 8) ao término da coluna com 100% metanol.

Figura 8- Frações obtidas após separação por coluna cromatográfica a vácuo



Fonte: Dados fornecidos pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

Durante a passagem de solvente na proporção metanol 5% pela coluna cromatográfica (fração 8.1) um precipitado começou a se formar no fundo do balão que ao ser rotaevaporado formou um precipitado branco quase cristalizado por toda extensão do fundo do balão. Esse resultado se estendeu até a fração 8.7, essas frações foram recuperadas com clorofórmio, o qual não solubilizou completamente a amostra, mas auxiliou na retirada do precipitado do balão. Esse produto foi então filtrado a vácuo e todo sólido recuperado e armazenado para secagem e posterior identificação. Foram obtidos, ao final do processo 3,198 g de cnicina (Figuras 9 e 10) o que destaca a grande eficiência desse processo de extração, principalmente para técnica de lavagem das folhas que tornou o extrato final muito mais limpo e seletivo para o isolamento de substâncias presentes nos anexos foliares.

Figura 9- Precipitado formado no balão após rotaevaporação e filtrado



Fonte: Figuras fornecidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

Figura 10- Rendimento total de cnicina ao final do processo.

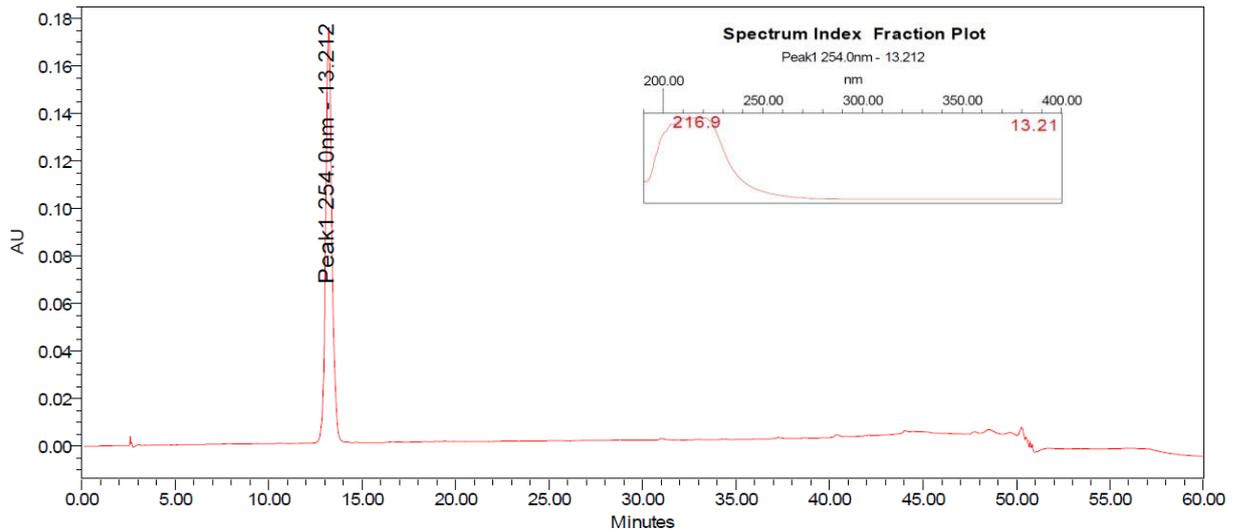


Fonte: Figura fornecida pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

Foi realizado CCD das frações em fase móvel clorofórmio: metanol 98:02 v/v, para análise da eficiência de separação da coluna no início da formação do precipitado (fração 8.2) até a última fração (8.7). O precipitado branco também foi submetido a análise em CLAE-DAD no comprimento de 254 nm (Figura 11). O espectro de UV também foi analisado indicando máximo de absorção em 216 nm. Dado este que corrobora com resultados encontrados na literatura onde cnicina demonstra o efeito Cotton negativo que é atribuído a uma transição da γ -lactona α,β -insaturada em 218 nm em MeOH de acordo com Uchida e Kuriyama (1974) e esse sinal do efeito Cotton é determinado devido a quiralidade do grupo C=C-C=O. No cromatograma é evidente a identificação de somente um pico em 13,212

minutos, o que revela uma grande pureza do precipitado branco isolado que baseado nas técnicas de identificação por cromatografia e fragmentação por espectrometria de massas leva a lactona sesquiterpenica, cnicina.

Figura 11- Cromatograma da fração isolada do extrato de *C. benedicta*.



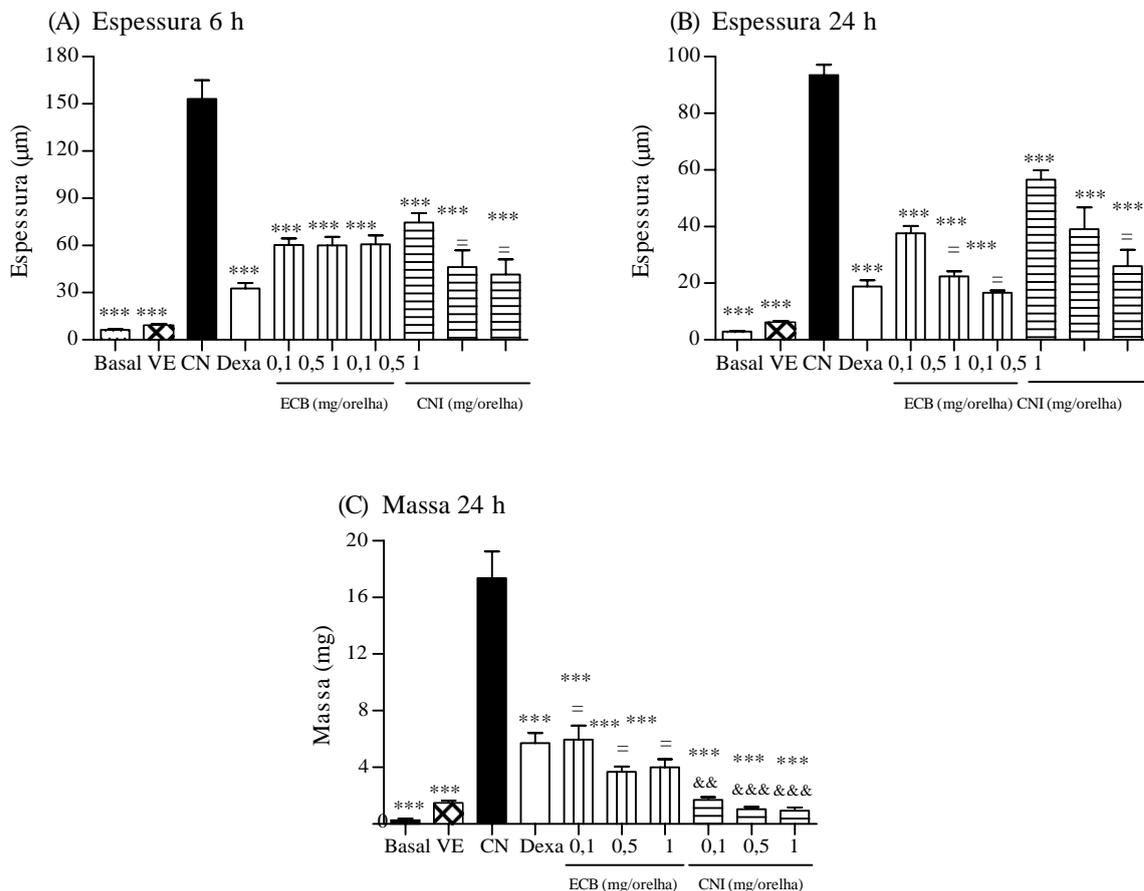
Fonte: Figuras fornecidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais.

6.3 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE *Centaurea benedicta* E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CROTON

A indução do processo inflamatório com óleo Croton produziu um aumento expressivo da espessura e massa do edema no grupo controle após 6 e 24 horas (Figura 12). ECB reduziu a espessura do edema em 60,67, 60,73 e 60,40% nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/orelha após 6 horas de tratamento, respectivamente, enquanto CNI inibiu 51,29, 69,71 e 72,90% nas doses em ordem crescente. Após 24 horas de tratamento, o extrato diminuiu a espessura em 59,76 (0,1 mg/orelha), 76,07 (0,5 mg/orelha) e 82,22% (1 mg/orelha), enquanto a CNI reduziu em 39,59, 56,00 e 69,79% nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/orelha, respectivamente. Considerando ainda o tratamento de 24 horas, o extrato também reduziu a massa das orelhas em 68,07 (0,1 mg/orelha), 76,60 (0,5 mg/orelha) e 78,60% (1 mg/orelha), enquanto CNI diminuiu em 89,64, 94,32 e 94,72% nas respectivas doses (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha). Dexametasona, controle positivo, foi ativa ao inibir ambas as espessura e massa do edema.

Considerando a Figura 12A, verifica-se que, após 6 horas de tratamento, as doses de 0,5 e 1 mg/orelha de CNI foram significativamente iguais a dexametasona ($p < 0,05$) (Figura 12A). Após 24 horas, as doses de 0,5 e 1 mg/orelha de ECB produziram espessuras similares ao grupo controle positivo (Figura 12B), enquanto este efeito foi observado somente na dose de cnicina 1 mg/orelha. A comparação das medidas de massa dos fragmentos das orelhas com a dexametasona mostrou que ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelhas) apresenta efeito significativamente igual. Já os grupos tratados com CNI (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) foram mais efetivos em reduzir a inflamação em relação à dexametasona (Figura 12C).

Figura 12 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre o edema de orelha induzido por óleo de Croton



Cada barra representa a média±erro padrão (n = 8). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. CN = Controle; VE = Veículo; Dexa = Dexametasona; ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI = Cnicina; =: Não houve diferença significativa em relação à dexametasona após ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$ em relação à dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

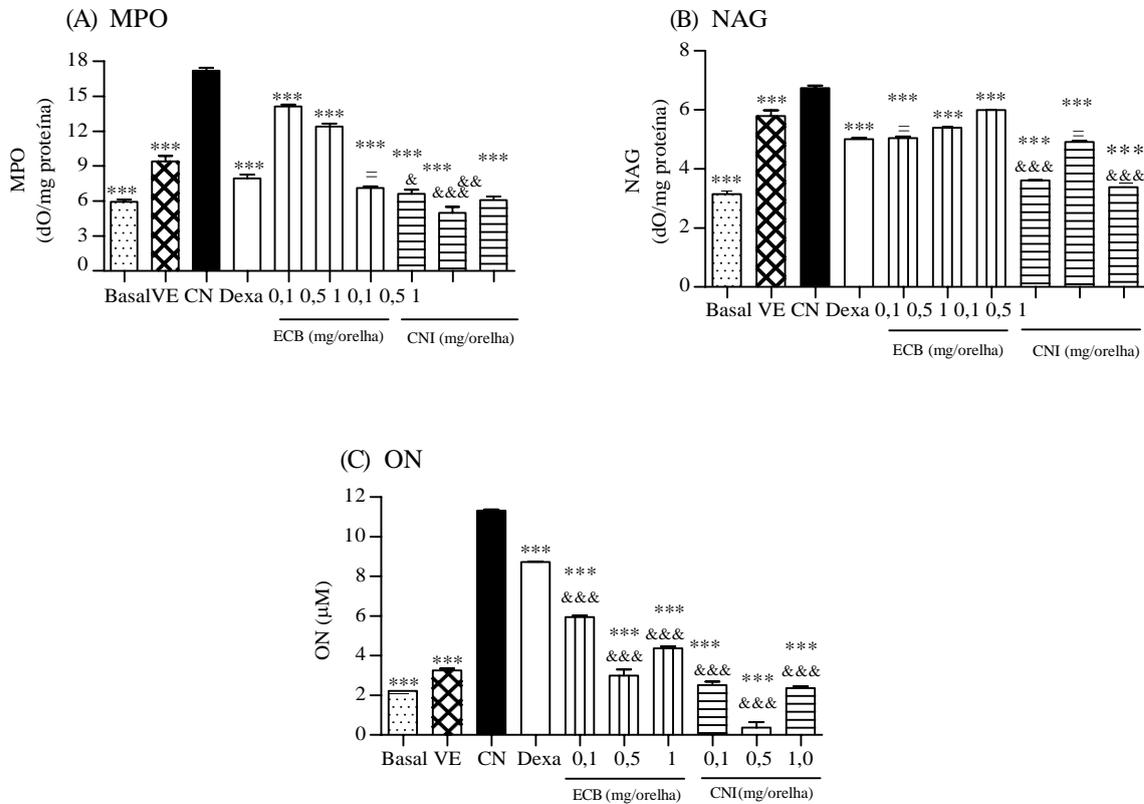
6.3.1 Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre os marcadores inflamatórios

Na Figura 13A é mostrado que o efeito do óleo de Croton sobre o edema de orelha também foi observado pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) que foi aumentada em 189% no grupo controle quando comparado ao grupo basal. O tratamento com ECB reduziu a MPO em 19, 28 e 59% nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, em relação ao grupo controle. CNI também inibiu a MPO em 62, 72 e 65% nas respectivas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha. Dexametasona produziu 54% de inibição da atividade da MPO.

Após indução da inflamação por óleo de Croton, a atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) aumentou significativamente no grupo controle negativo quando comparado aos grupos basal e veículo (Figura 13B). O tratamento com ECB promoveu uma inibição de 26, 20 e 11% da atividade da NAG nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, quando comparado com grupo controle negativo. Quando tratado com CNI, a atividade da NAG foi reduzida em 47, 28 e 50 % nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente. Dexametasona foi efetiva em inibir a atividade da NAG em 26%.

O aumento da concentração de óxido nítrico (ON) nos animais tratados com óleo de Croton foi bastante expressivo no grupo controle negativo em relação ao grupo basal (Figura 13C). Nos grupos submetidos ao tratamento com ECB, doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, houve a redução das concentrações de ON em 48, 74 e 62%, respectivamente ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. CNI, nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, também reduziram a presença tecidual de ON em 78, 97 e 80 %, respectivamente. Dexametasona reduziu em 23% a concentração de ON no tecido avaliado.

Figura 13 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre as atividades de MPO e NAG e ON em edema de orelha induzido por óleo de Croton



As barras representam a média \pm S.E.M. ($n = 3$). *** $p < 0,001$ diferente quando comparado ao grupo controle negativo. ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls como post-hoc. VE = Veículo; CN = Controle; Dexa = Dexametasona; ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI= Cnicina. =: Não houve diferença significativa em relação à dexametasona após ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$ em relação à dexametasona.

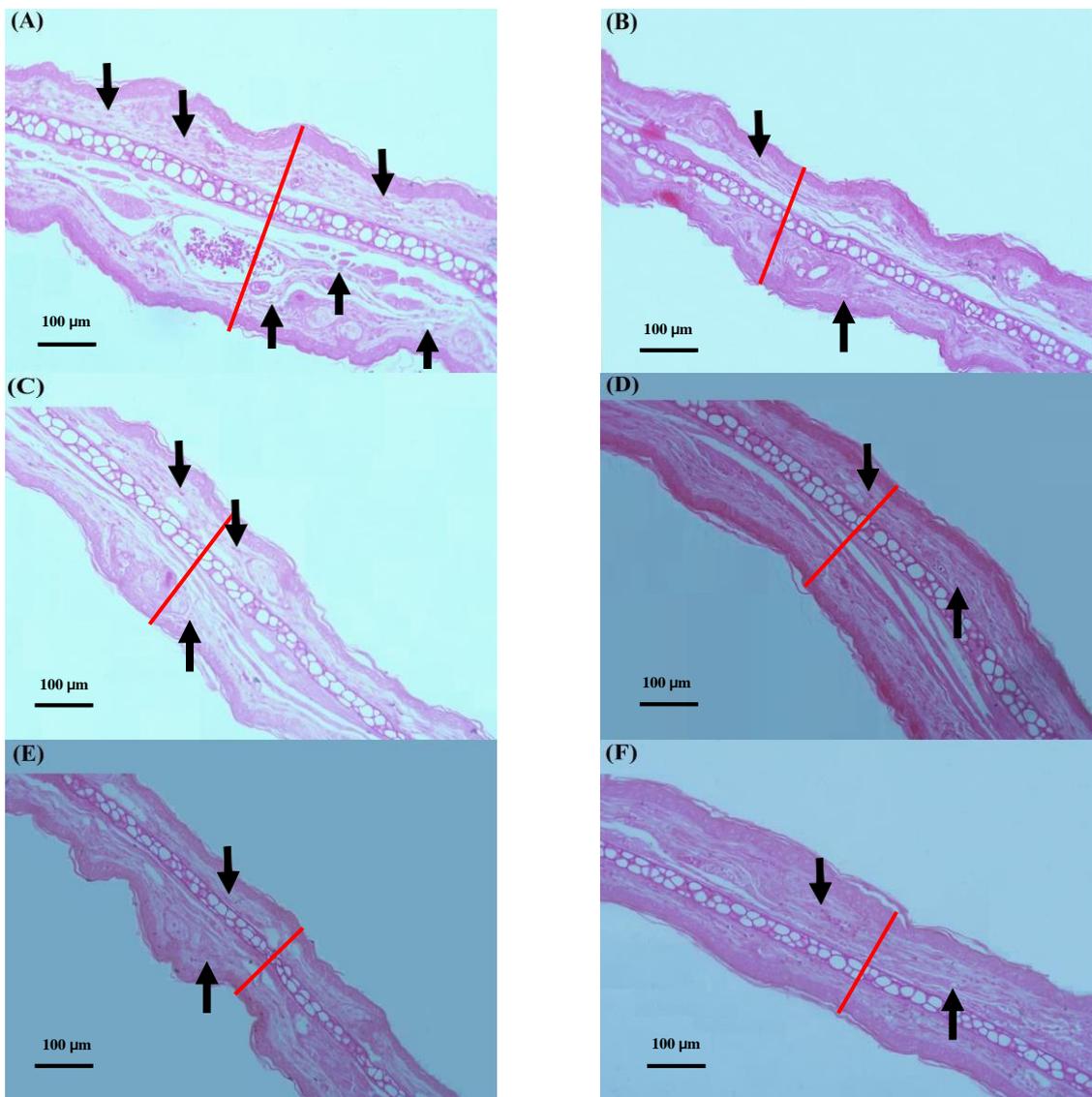
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

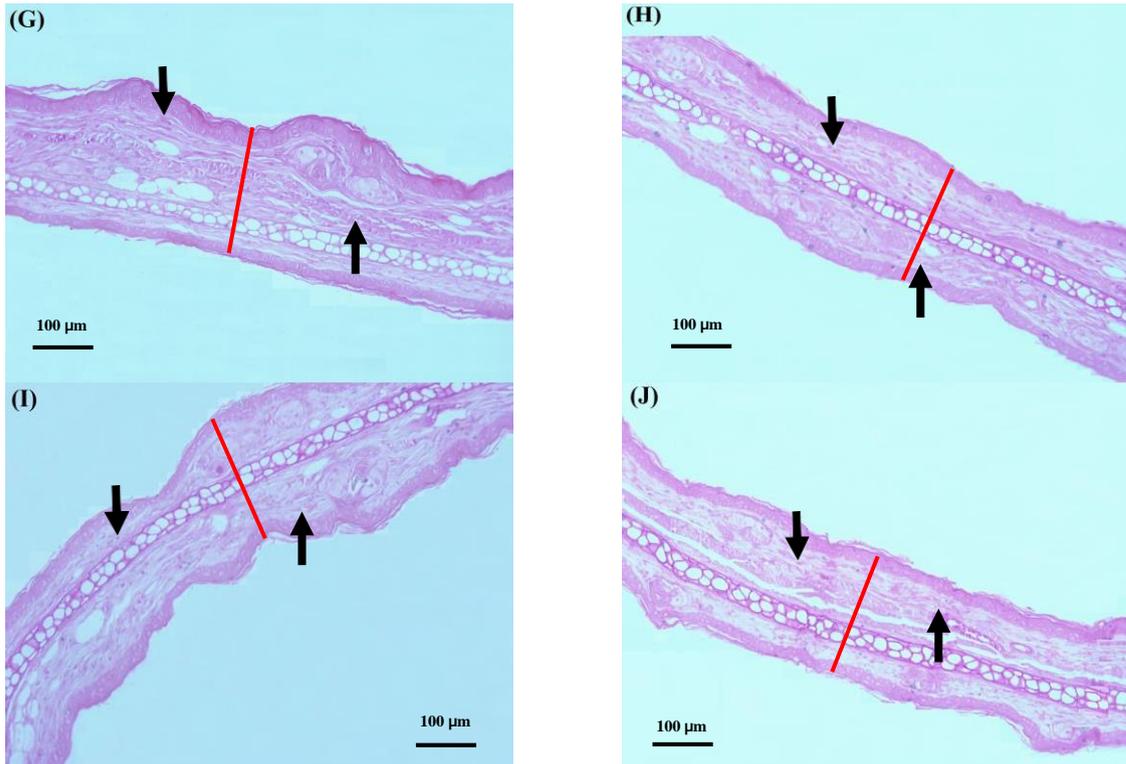
6.3.2 Análises histopatológicas do processo inflamatório cutâneo induzido por óleo de cróton.

Fragmentos de orelha obtidos a partir do modelo do óleo de Croton foram analisados histopatologicamente para corroborar com os resultados de espessura e massa do edema, assim como atividades de mieloperoxidase, *N*-acetil- β -*D*-glucosaminidase e óxido nítrico descritas anteriormente. Cortes representativos são mostrados na Figura 14 após tratamento com ECB e CNI nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha. Os grupos basal e veiculo, ambos sem indução do edema, mostram ausência de edema e de processo inflamatório (Figuras 14I e 14J), respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo, com indução do edema e sem tratamento, apresentou um aumento acentuado da espessura da orelha, caracterizando edema

típico de processo inflamatório, presença expressiva de leucócitos e vasodilatação (Figura 14A). O tratamento com ECB (0,1 0,5 e 1,0 mg/orelha, Figuras 14C, 14D e 14E, respectivamente) e CNI (0,1 0,5 e 1,0 mg/orelha, Figuras 14F, 14G e 14H, respectivamente) reduziram a espessura do edema, os leucócitos e a vasodilatação induzidos pelo óleo de Croton. O controle positivo, dexametasona 0,1 mg/orelha, foi efetivo em reduzir os parâmetros analisados como mostra a Figura 14B.

Figura 14 - Cortes histológicos representativos de fragmentos de orelhas com edema induzido por óleo de Croton após tratamento com extrato de *C. benedicta* e cnicina





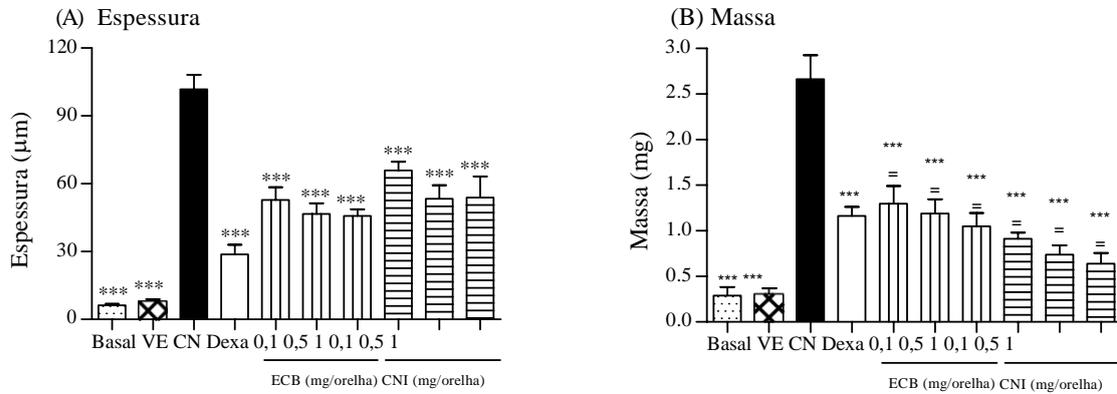
Cortes histológicos de orelha de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (20x, escala de 10000 µm). (A) Controle negativo; (B) Controle positivo (Dexametasona); (C) ECB 0,1 mg/orelha; (D) ECB 0,5 mg/orelha; (E) ECB 1,0 mg/orelha; (F) CNI 0,1 mg; (G) CNI 0,5 mg/orelha; (H) CNI 1.0 mg/orelha; (H) Basal (sem inflamação); (J) Veículo (Acetona); Seta para baixo = Leucócitos; Seta para cima = Vasodilatação; Traço vermelho = Espessura do edema.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

6.4 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE *Centaurea benedicta* E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR FENOL

O fenol produziu um processo inflamatório auricular (Edema) que gerou um aumento significativo na espessura e massa das orelhas direitas, como mostrado no grupo controle negativo (Figura 15A). Após 2 horas de tratamento, ECB reduziu a espessura do edema em 48,10, 54,10 e 55,10% nas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/orelha, respectivamente, enquanto a massa das orelhas foi diminuída em 51,20 (0,1 mg/orelha), 58,70 (0,5 mg/orelha) e 62,50% (1 mg/orelha). Dexametasona, controle positivo, foi efetiva ao inibir a espessura e a massa do fragmento de orelha em 71,80 e 56,40%, respectivamente. Neste ensaio, CNI foi capaz de reduzir a espessura do edema em 35,30, 47,60 e 47,10% nas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/orelha, respectivamente, enquanto a massa das orelhas foi inibida em 65,80 (0,1 mg/orelha), 72,40 (0,5 mg/orelha) e 76,10% (1 mg/orelha) (Figura 15B).

Figura 15 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre o edema de orelha induzido por fenol.



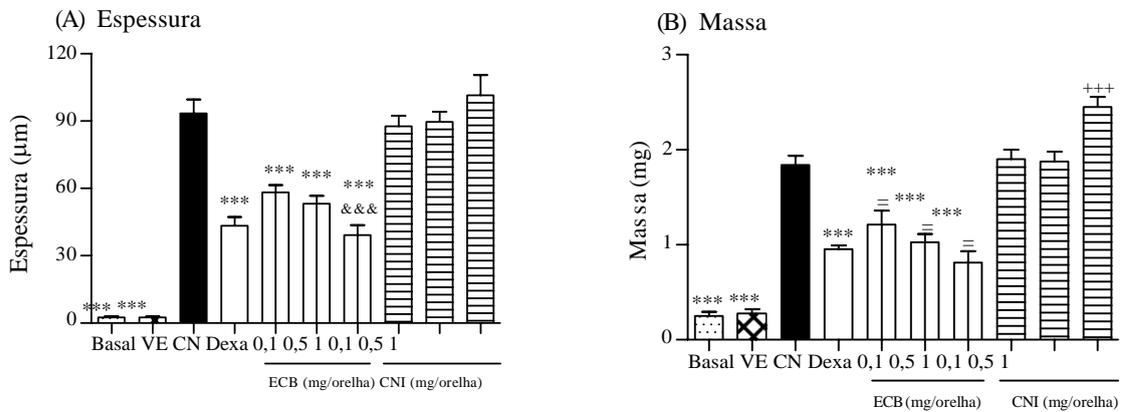
Cada barra representa a média±erro padrão (n = 8). *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI= Cnicina. VE = Veículo; CN = Controle; Dexa = Dexametasona. =: Não houve diferença significativa em relação à dexametasona após ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

6.5 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE *Centaurea benedicta* E CNICINA EM EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR CAPSAICINA

A indução do processo inflamatório com capsaicina produziu um aumento expressivo da espessura e massa do edema no grupo controle negativo após 30 minutos (Figura 16). Tratamento prévio com o extrato de *C. benedicta* inibiu a ação do agente flogístico, reduzindo a espessura tecidual em 37,75, 43,11 e 58,10% nas doses de 0,1, 0,5 e 1mg/orelha após 1 hora de tratamento, respectivamente. Neste período, ECB inibiu o aumento da massa das orelhas em 34,01 (0,1 mg/orelha), 44,24 (0,5 mg/orelha) e 55,80% (1 mg/orelha). Usando a capsaicina, os dados da espessura e massa mostraram que a cnicina não foi efetiva em reduzir o processo inflamatório. Ao contrário, a dose de 1,0 mg/orelha de cnicina potencializou o efeito da capsaicina em relação à massa. Dexametasona, controle positivo, foi ativa ao inibir o aumento da espessura e massa do edema.

Figura 16 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.



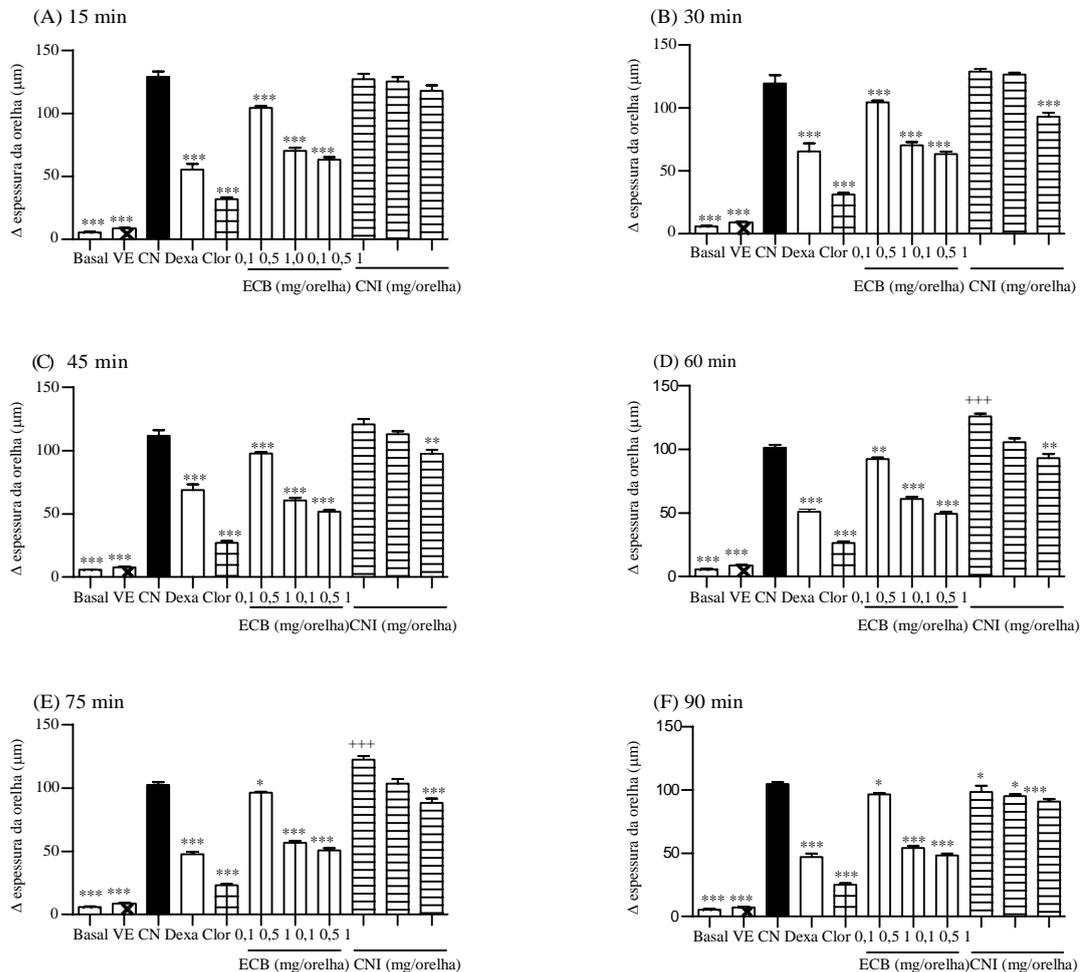
Cada barra representa a média±erro padrão (n = 8). *** $p < 0,001$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI= Cnicina. VE = Veículo; CN = Controle; Dexa = Dexametasona. =: Não houve diferença significativa em relação à dexametasona após ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. &&& $p < 0,001$ em relação à dexametasona.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

6.6 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO DE *Centaurea benedicta* E CNICINA SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR HISTAMINA

A partir de 15 minutos de tratamento, o extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) proporcionou uma redução significativa da espessura auricular após 2 horas da aplicação intradérmica de histamina quando comparado ao grupo controle negativo (Figura 17). No entanto, nos tempos de 75 e 90 minutos, a dose de 0,1 mg/orelha de ECB produziu uma diminuição menos significativa ($p < 0,05$) do efeito sobre o processo inflamatório. Neste experimento, cnicina (1 mg/orelha) inibiu o edema induzida pela histamina após 30 minutos de tratamento. Mesmo com menor intensidade, este efeito pode ser observado após 90 minutos de tratamento com CNI (0,1 e 0,5 mg/orelha) ($p < 0,05$). Além disso, a dose de 0,1 mg/orelha de CNI potencializou o efeito da histamina nos tempos de 60 e 75 minutos de tratamento, produzindo uma ação contrária. Embora a dexclorfeniramina tenha sido mais potente do que a dexametasona na redução do edema, ambas foram bastante ativas em todos os tempos avaliados (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre a espessura da orelha após indução do edema por histamina.

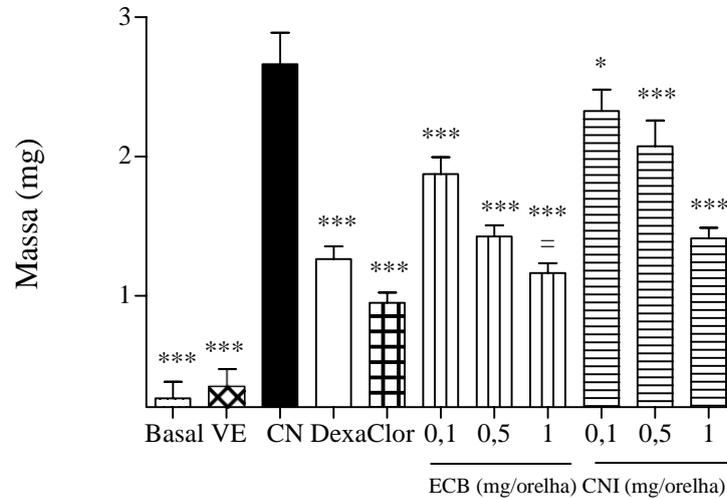


Cada barra representa a média \pm erro padrão ($n = 8$). Medida de espessura a cada 15 minutos após aplicação de histamina ($10 \mu\text{L}/\text{orelha}$ direita). VE = Veículo; CN = Controle; Dexa = Dexametasona ($0,1 \text{ mg}/\text{orelha}$); Clor = Dexclorfeniramina ($0,1 \text{ mg}/\text{orelha}$); ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI = Cnicina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. +++ $p < 0,001$, média foi significativamente maior que o grupo controle após ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019.

Considerando ainda as medidas da massa, ECB ($0,1, 0,5$ e $1,0 \text{ mg}/\text{orelha}$) reduziu a massa do edema da orelha em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$) (Figura 18), confirmando os achados demonstrados para espessura da Figura 17. É observado também que a cnicina foi ativa em inibir a massa do edema de orelha nas doses de $0,5$ ($p < 0,05$) e $1 \text{ mg}/\text{orelha}$ ($p < 0,001$). Ambos os controles positivos, dexametasona e dexclorfeniramina, foram eficientes em diminuir a massa edematosa induzida por histamina (Figura 18).

Figura 18 - Efeito do extrato de *Centaurea benedicta* e cnicina sobre a massa da orelha após indução do edema por histamina.



Cada barra representa a média \pm erro padrão (n = 8). Medida da massa dos discos das orelhas 90 minutos após aplicação de histamina (10 μ L/orelha direita). VE = Veículo; CN = Controle; Dexa = Dexametasona (0,1 mg/orelha); Clor = Dexclorfeniramina (0,1 mg/orelha); ECB = Extrato de *C. benedicta*; CNI = Cnicina. *p < 0,05 e ***p < 0,001 diferente do grupo controle após ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. = Média igual da dexclorfeniramina.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2019

7. DISCUSSÃO

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha várias funções vitais, como proteção, termorregulação, absorção percutânea, bem como atividades secretoras e sensoriais (SLOTTA et al., 2015). No entanto, a sua integridade pode ser comprometida por diferentes condições inflamatórias ou não inflamatórias, que resultam em erupções cutâneas leves, dermatite (eczema), psoríase, eritema agudo, vitiligo e queimaduras e feridas profundas. Além disso, as infecções de pele por uma variedade de patógenos (viral, parasitária, bacteriana ou fúngica) podem estar associadas com os processos inflamatórios instalados, o que podem ocasionar danos mais severos ao tecido (BOUWSTRA; PONEC, 2006; SLOTTA et al., 2015). Então, com intuito de buscar alternativas para tratar distintas condições dermatológicas, a sociedade tradicional tem usado as plantas medicinais e produtos naturais como estratégias para inibir os mecanismos inflamatórios, impedir o sangramento, acelerar a cicatrização de feridas e reduzir o crescimento de microrganismos (DAWID-PAĆ, 2013; GUPTA et al., 2017).

Considerando que o processo inflamatório se caracteriza como uma resposta do organismo a um agente agressor, visando diluir, destruir e bloquear este agente (ROBBINS et al., 2005), a busca por novos produtos terapêuticos com propriedades anti-inflamatórias eficazes e com menos efeitos adversos tem sido uma das vertentes dos pesquisadores da área de produtos naturais. Neste contexto, o foco do presente trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) usando modelos de edema de orelha induzidos por diversos agentes flogísticos (óleo de cróton, fenol, capsaicina e histamina) em camundongos. O uso desses agentes tem grandes vantagens, uma vez que eles estão associados a diferentes mecanismos inflamatórios e mimetizar condições patológicas semelhantes aos seres humanos. Além disso, o uso de camundongos Swiss para testes *in vivo* da atividade anti-inflamatória constitui um ensaio prático, com baixo custo, reprodutível e confiável quando comparado a um grupo controle negativo.

A aplicação tópica de óleo de Croton, em dose única, fornece dados comparativos com as substâncias testadas, e avalia a atividade antiedema de um processo inflamatório agudo. O óleo de Croton, extraído das sementes de *Croton tiglium*, apresenta como seu componente majoritário o 13-acetato de 12-o-tetracanoiforbol (TPA) que tem como característica induzir a inflamação cutânea e a hiperproliferação celular (em caso de múltiplas aplicações do óleo de cróton), mimetizando assim patologias cutâneas, como a psoríase. O processo inflamatório agudo induzido pela administração tópica de óleo de cróton gera um aumento da

permeabilidade vascular, vasodilatação pela liberação de histamina e estimula a migração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e macrófagos (TUBARO et al., 1985; DE YOUNG et al., 1989).

O TPA encontrado no óleo de Croton estimula a via da fosfolipase A₂ (PLA₂), enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membranas. Esta via também ativa uma maior expressão gênica da cicloxigenase e lipoxigenase (COX-2/LOX) e proteína quinase C (PKC) que estimula a cascata das proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAP quinase), promovendo assim a ativação de fatores de transcrição nuclear (NF-κB e a AP-1) que atuam regulando diversas enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS), proteínas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α) e moléculas de adesão (PUNGERÓ et al., 1998; CHI et al., 2003; MURAKAWA et al., 2006; BADILLA et al., 2007; FERREIRA et al., 2010). Substâncias que se assemelham a corticoides, inibidores das cicloxigenases, fosfolipase A₂ (PLA₂), 5-lipoxigenase e antagonistas de LTB₄ apresentam excelente eficácia frente ao processo inflamatório causado pelo TPA (FÜRSTENBERGER et al., 1994). Isto demonstra que o TPA é capaz de ativar diferentes vias do processo inflamatório através de mecanismos distintos. Nossos resultados mostraram que o extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) reduziram significativamente a espessura e o peso das orelhas dos camundongos, sugerindo assim um expressivo potencial contra os mecanismos inflamatórios associados com a ação do óleo de Croton (Figura 12). Dessa forma, esses agentes podem ser úteis no tratamento de inflamação relacionada à psoríase e patologias afins (CHIBLI et al., 2014).

Baseado nos resultados da espessura do edema, é observado que, após 6 horas de tratamento, a cnicina, nas doses de 0,5 e 1 mg/orelha, produziu um efeito igual à da dexametasona, o que pode sugerir um mecanismo semelhante a este fármaco usado na terapêutica como anti-inflamatório esteroide. No entanto, após 24 horas de tratamento, somente a dose de 1 mg/orelha de cnicina foi tão efetiva quanto o fármaco padrão, enquanto o efeito do extrato ECB (0,5 e 1 mg/orelha) foi potencializado tornando-se significativamente igual a dexametasona. Com base no efeito da massa dos fragmentos da orelha, embora corrobore os resultados da espessura, o efeito das doses (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) de ECB foram semelhantes a dexametasona, enquanto as doses (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) de cnicina foram mais potentes do que este fármaco de referência. É possível que esses agentes apresentem mecanismos de ação parecidos com os glicocorticoides que começam com sua ligação a receptores nucleares específicos no citoplasma das células-alvo. O complexo receptor-esteroide então migra para o núcleo, onde se liga ao DNA e altera a síntese de

proteínas (BECKER, 2013; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016). Qualquer número de funções celulares é assim modificado, incluindo a produção de enzimas que regulam os processos metabólicos e aquelas que regulam a síntese de autacoides inflamatórios e citocinas relacionadas com a imunidade. Esse mecanismo consome tempo e é responsável pelo início tardio do efeito (6 a 8 horas) quando os glicocorticoides são administrados clinicamente (BECKER, 2013). Por isso, um tratamento mais prolongado pode ser útil para um melhor entendimento das ações dos produtos que estão sendo avaliados.

Devido à migração leucocitária induzida pela aplicação tópica do óleo de Croton, uma elevação dos teores da enzima mieloperoxidase (MPO) é indicativa da presença de polimorfonucleares no tecido inflamado (BRADLEY et al, 1982). A redução da atividade de MPO após tratamento do processo inflamatório pode estar associada como a inibição da vasodilatação e, conseqüentemente, da diminuição da migração de neutrófilos no tecido inflamado (ARNHOLD, 2004). Desse modo, o acúmulo de neutrófilos no tecido auricular que teve contato com o óleo de Croton foi medido por meio do ensaio da atividade da MPO (MENDES et al., 2009). Os resultados mostraram uma redução dos valores de MPO nos tecidos tratados com o extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha), indicando assim a redução de infiltrados de leucócitos polimorfonucleados (neutrófilos) e inibição do processo inflamatório. Nossos dados também revelaram que a dose de 0,5 mg/orelha de ECB produziu uma redução significativamente igual a dexametasona, enquanto as doses de cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) foram mais potentes que este fármaco de referência ($p < 0,001$) (Figura 13A). Esses achados confirmam os resultados da espessura e massa mostrados na Figura 12.

O acúmulo de leucócitos mononucleares em tecidos inflamados é uma característica do modelo de edema de orelha induzido por óleo de Croton, uma vez que está relacionado à geração de ácido araquidônico pela expressão da cicloxigenase (COX-2) e vasodilatação com liberação de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) (SANCHES; MORENO, 1999; GÁBOR, 2003). A NAG é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, especialmente macrófagos. A ativação dos macrófagos provoca desgranulação com liberação mediadores inflamatórios tais como aminas bioativas (histamina e serotonina), citocinas, quimiocinas e eicosanoides (LAWRENCE; GILROY, 2007). No presente estudo, a infiltração de células mononucleares foi indiretamente quantificada pela avaliação da atividade de NAG que está presente em macrófagos ativados (MENDES et al., 2009). Após 24 horas de tratamento, ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e CNI (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) reduziram a atividade da NAG (Figura 13B), indicando que houve uma diminuição dos leucócitos mononucleares e da vasodilatação.

A ação da cnicina (0,1 e 1 mg/orelha) foi mais potente que a dexametasona (Figura 13B). Mais uma vez, os dados de espessura e massa (Figura 4) são confirmados mediante os resultados relacionados à NAG.

O óxido nítrico (ON) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. Este constituinte é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (DUSSE et al., 2003). A síntese do ON resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima ON-sintase (NOS) a partir de uma variedade de isoformas encontrada em diferentes tecidos de mamíferos (SOBREVIA et al., 2016). Essas isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{2+}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE et al., 2003; SOBREVIA et al., 2016; STEINHORN et al., 2015). O ON produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial, levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à consequente produção de ON. O ON produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular, o que promove a vasodilatação (MUTCHLER; STRAUB, 2015). Dessa forma, ON é uma molécula de sinalização de processos fisiológicos e fisiopatológicos foi avaliada (FLORENTINO et al., 2017). A produção e liberação de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (ON) durante o processo inflamatório resulta na modulação negativa do recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (BRITO et al., 2013; SECCO et al., 2003). Sendo assim, verificamos a influência do extrato ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) sobre o ON e sua relação com a migração de leucócitos induzida pelo óleo de Croton. Nossos resultados mostram que o tratamento do tecido inflamado com extrato ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) proporcionaram a diminuição das concentrações de ON, corroborando assim com os resultados de MPO e NAG que indicam o potencial anti-inflamatório das substâncias em análise (Figura 13C). Foi verificado também que tanto o extrato ECB quanto a cnicina foram mais potentes que a dexametasona em inibir a formação de ON (Figura 13C). Portanto, os resultados corroboram os achados de espessura, massa, mieloperoxidase e N-acetil- β -D-

glicosaminidase, mostrando um potencial anti-inflamatório do extrato ECB e da cnicina no tratamento de processos inflamatórios cutâneos.

Como já mencionado, a inflamação é uma resposta de adaptação provocada por estímulos ou condições desfavoráveis, tais como infecções e lesão tecidual (STAMATAS et al. 2013). O papel principal da inflamação é a resolução de infecções e o reparo de danos, para que as células voltem à condição de homeostasia. A inflamação aguda é reconhecida por uma resposta de curto prazo, que resulta em infiltração de leucócitos, perda do estímulo e reparo tecidual (STAMATAS et al., 2013). Com relação ao estudo histopatológico, nossos resultados mostraram o grupo controle negativo (indução da inflamação com óleo de Croton sem tratamento) mostrou que houve uma maior extensão da área do tecido inflamado, o que demonstra a presença do edema, assim como a presença de vasodilatação mais acentuada e maior número de leucócitos na área da inflamação (COLORADO et al., 1991). Contudo, a dexametasona, uma droga de referência para o tratamento de processo inflamatório, protegeu o tecido inflamado com redução dos parâmetros inflamatórios. Vale considerar que este fármaco é largamente utilizado comercialmente como adrenocorticoide, antiasmático, antialérgico e anti-inflamatório e sua administração pode ser feita por diferentes vias, incluindo a dermatológica (PEREIRA et al., 2007; MEHTA et al., 2016). Considerando esses aspectos, o extrato ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e a cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) foram capazes de reduzir os parâmetros inflamatórios de espessura do edema, vasodilatação e migração leucocitária (Figura 14), confirmando os resultados das medidas de espessura e massa, mieloperoxidase, N-acetil- β -D-glicosaminidase e óxido nítrico, sendo eficazes no tratamento de inflamação aguda. Esses resultados são promissores e podem ser usados como base para preparação de formulações tópicas para o tratamento de inflamação cutânea e, provavelmente, para processos inflamatórios de cicatrização de feridas.

O uso do fenol como agente flogístico que causa alterações no tecido da pele e mimetiza a dermatite de contato nos seres humanos (LIM et al., 2004). Sua ação é independente da proteína quinase C (PKC), envolve o rompimento da membrana plasmática dos queratinócitos, células mais presentes na epiderme, liberação de IL-1 α pré-formada, IL-8, TNF- α , mediadores inflamatórios como o ácido araquidônico e radicais livres (WILMER et al., 1994; MURRAY et al., 2007). Nossos resultados mostraram que o extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) e cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) tiveram efeito inibidor do processo inflamatório induzido por fenol, o que pode ser potencialmente eficaz frente as dermatites de contato. Além disso, assim como para o óleo de Croton, a inflamação induzida pelo fenol ativa diferentes vias, entre elas a formação de metabólitos do ácido araquidônico e espécies

reativas de oxigênio (EROS) na resposta inflamatória instalada (MURRAY et al., 2007). Assim, os resultados sugerem que o extrato ECB e a cnicina podem exercer suas ações anti-inflamatória por inibir a geração desses mediadores, corroborando os achados demonstrados no modelo do óleo de Croton. Neste ensaio, ambos os efeitos sobre a espessura e massa foram confirmados quando comparados ao grupo controle negativo. No entanto, assim como no modelo do óleo de Croton, o efeito sobre a massa parece ser mais expressivo e foram semelhante aquele demonstrado pela dexametasona, controle positivo.

O uso de capsaicina como indutor de inflamação em edema de orelha em camundongos leva a uma inflamação neurogênica da pele (GABOR; RAZGA, 1992). O contato da capsaicina com a pele (epiderme), ativa receptores de potencial transitório vanilóide do Tipo 1 (TRPV1) que é um canal permeável ao cálcio que pode ser ativado pelo endocanabinóide anandamida; além de seu agonista exógeno; a capsaicina gerando a liberação de neuropeptídeos (substância P, peptídeos relacionados ao gene calcitonina e taquicininas) e monoaminas (serotonina e histamina) (INOUE, NAGATA, KOSHIHARA, 1993; INOUE, NAGATA, KOSHIHARA, 1995). Como consequência apresenta sinais de inflamação aguda como vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo e elevação da temperatura local (SZOLCSÁNYI, 1988; MATRAN et al., 1989; LEMBECK, HOLZER, 1979). A aplicação tópica do o extrato de *C. benedicta* (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) mostrou uma redução significativa da inflamação induzida pela capsaicina (Figuras 16A e 16B). Ao contrário, cnicina (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) não foi efetiva contra o processo inflamatório, especialmente a dose de 1 mg/orelha que potencializou o efeito deste agente flogístico, o qual foi bem evidenciado após medida da massa (Figura 16B). Isto significa que cnicina não bloqueou a substância (capsaicina) nem nas vias inflamatórias ativadas pelo agente flogístico.

A histamina é uma amina vasoativa liberada por mastócitos ativados pelas proteínas do complemento C3a e C5a e por leucócitos ativados por IgE, sendo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e tem ação vasodilatadora (RANG et al., 2007). Por sua ação rápida, a histamina também está envolvida nas reações de hipersensibilidade do tipo imediata (BRAND et al., 2002) e é sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas, neurônios histaminérgicos, linfócitos e células enterocromafínicas, sendo estocada em vesículas ou grânulos liberados sob estimulação (CRIADO et al., 2010). Sua síntese ocorre a partir do aminoácido histidina, sob ação L-histidina descarboxilase (HDC), sendo um potente mediador de numerosas reações fisiológicas. Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de

receptores: receptor de histamina (HR)₁, HR₂, HR₃ e HR₄ (CRIADO et al., 2010; HUANG et al., 2018; THANGAM et al., 2018).

O receptor H1 (HR₁) é codificado no cromossomo humano 3, sendo o responsável por muitos sintomas das doenças alérgicas, tais como o prurido, a rinorreia, o broncoespasmo e a contração da musculatura lisa intestinal. A ativação do HR₁ estimula as vias sinalizadoras do fosfolípide inositol, culminando na formação do inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃) e do diacilglicerol (DAG), levando ao aumento do cálcio intracelular. Além disso, o HR₁, quando estimulado, pode ativar outras vias de sinalização intracelular, tais como a via da fosfolipase D e a da fosfolipase A. Além disso, o estímulo do HR₁ pode levar a ativação do fator de transcrição nuclear NFκB, estando ambos envolvidos nas doenças alérgicas (HUANG et al., 2018).

A histamina desempenha um papel central na patogênese de várias doenças alérgicas, como a dermatite atópica, a rinite alérgica e a asma alérgica, através da regulação diferencial dos linfócitos T auxiliares. O aumento da secreção de citocinas Th2 [como interleucina (IL) - 5, IL-4, IL-10 e IL-13] e a inibição da produção de citocinas Th1 [interferon-γ (IFN-γ), IL-12 de monocinas e IL-2] são mediadas pela histamina. Assim, a histamina regula o equilíbrio efetivo entre as células Th1 e Th2, auxiliando a mudança para Th2. A ativação de mastócitos mediada por histamina desempenha um papel crítico em várias doenças alérgicas. A histamina pode induzir a liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas via RH₄ em mastócitos humanos derivados de sangue de cordão CD34⁺ (JEMIMA et al., 2014). Além disso, os mastócitos interagem diretamente com as bactérias e parecem desempenhar um papel vital na defesa do hospedeiro contra patógenos. Drogas, como os glicocorticoides, a ciclosporina e o cromoglicato, mostraram ter efeitos inibitórios na desgranulação dos mastócitos e na liberação do mediador (AMIN, 2012). Considerando a formação do edema, anti-histamínicos e corticosteroides (dexametasona, por exemplo) apresentam redução do edema em modelos induzido por histamina.

Com base nos resultados apresentados, é possível destacar que o extrato ECB (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) foi efetivo em reduzir a espessura do edema induzido pela histamina nos intervalos de tempos avaliados (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos). Já a cnicina não inibiu o edema nos primeiros 15 minutos, sendo observado uma resposta a partir de 30 min na dose de 1 mg/orelha, o que culminou em uma resposta positiva após 90 min de tratamento (0,1, 0,5 e 1 mg/orelha) (Figura 17). Curiosamente, nos tempos de 60 e 70 min, a cnicina potencializou a ação da histamina (Figuras 17D e 17E). Sob este aspecto, é sabido que existe um equilíbrio dos receptores de histamina frente à exposição a agonistas neutros, agonistas parciais,

completos e inversos. Com base no modelo em dois estados, os ligantes dos receptores de histamina podem ser classificados em agonistas, tanto completos como parciais, os quais estabilizam o receptor em estado ativo (R^*) e aumentam a sinalização efetora do receptor. Os agonistas inversos, tanto completos como parciais, estabilizam os receptores de histamina no estado inativo (R) e diminuem a sinalização efetora basal dos receptores de histamina. Os antagonistas neutros têm afinidade tanto pelo receptor ativo como pelo inativo; assim não afetam o equilíbrio entre eles, porém reduzem a capacidade tanto do agonista como do agonista inverso em se ligar aos receptores (CRIADO et al., 2010).

Quando a massa dos fragmentos foi avaliada, observou-se uma resposta semelhante ao da espessura após 90 minutos de tratamento. O extrato ECB (1 mg/orelha) produziu um efeito igual ao da dexclorfeniramina. É provável que outros constituintes do extrato estejam exercendo ação de antagonista o receptor de histamina H_1 ou agindo como agonista inverso.

Os efeitos discutidos acima podem estar relacionados com a ação de *Cnicus benedictus* L. que mostrou um alto nível de atividade cicatrizante em ratos com produto isolado a partir de pó de raiz em cicatrização de feridas após 14 dias, a qual foi associada com a presença de polifenóis (DJAMILA et al., 2013). O uso de *C. benedicta* para curar doença da pele tem sido extensivamente aplicado pela população, uma vez que dados da literatura mencionam o grande potencial de uso de *Cnicus* para tratamento terapêutico da pele (DJAMILA et al., 2013). Constituintes fitoquímicos como taninos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, açúcar redutor e vários outros compostos aromáticos demonstraram ser responsáveis pelo efeito anti-inflamatório de feridas que podem ser encontrados em diferentes partes da planta como folhas e cabeças de flores (KATARIA, 1995). Muitos outros efeitos importantes na pele foram determinados como atividade antimicrobiana atribuída aos constituintes de cnicina e poliacetileno (DJAMILA et al., 2013). O principal produto responsável pela reação cicatrizante é a cnicina, por exemplo, que possui atividade antibacteriana e antifúngica. Da mesma forma, a cnicina foi o sesquiterpeno mais ativo contra uma variedade de fungos em outro estudo (PANAGOULEAS et al., 2003).

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, este estudo comprovou a propriedade anti-inflamatória das folhas de *C. benedicta* através do modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos e, a cnicina, uma lactona sesquiterpênica, é uma das substâncias responsáveis por este efeito.

Considerando as substâncias irritantes usadas no modelo de edema, o mecanismo de ação está relacionado à inibição de uma ou mais vias da resposta inflamatória.

O extrato e a cnicina podem ser promissores agentes anti-inflamatórios para o tratamento de patologias da pele, como psoríase, dermatite de contato e dermatite atópica, abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento novos produtos farmacêuticos e dermocosméticos.

9. REFERENCIAS

ADEKENOV, S. M. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. **Fitoterapia**, v. 121, p. 16-30, 2017.

ALEXANDRE, J. T. M.; SOUSA, L. H. T.; LISBOA, M. R. P.; FURLANETO, F. A. C.; DO VAL, D. R.; MARQUES, M.; VASCONCELOS, H. C.; DE MELO, I. M.; LEITÃO, R.; BRITO, G. A. C.; GOES, P. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. **Clinical Oral Investigation**, v. 22, n. 6, p. 2175-2185, 2018.

AL-SNAFI, A. E. The constituents and pharmacology of *Cnicus benedictus* – A review. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 3, n. 2, p.129-135, 2016.

ALJEBAB, F.; CHOONARA, I.; CONROY, S. Systematic review of the toxicity of short-course oral corticosteroids in children. **Archives of Disease in Childhood**, v. 101, n. 4, p. 365-370, 2016.

ALJEBAB, F.; CHOONARA, I.; CONROY, S. Systematic review of the toxicity of long-course oral corticosteroids in children. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2017.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9-14, 2012.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 4-9, 2004.

ASHIMA, M. Medicinal plants used in the treatment of skin diseases – A review. **Research and Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 79-85, 2016.

ASHLEY N.T; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZA, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products.

Molecules, v. 21, n. 10, 2016.

BACH, S. M.; FORTUNA, M. A.; ATTARIAN, R.; TRIMARCO, J. T.; CATALÁN, C. A.

N.; AV-GAY, Y.; BACH, H. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 163-166, 2011.

BACHELIER, A.; MAYER, R.; KLEIN, C. D. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 21, p. 5605–5609, 2006.

BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCIO, J. F. 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. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p. 139-144, 2007.

BARREDA, V. D.; PALAZZESI, L.; TELLERÍA, M. C.; OLIVERO, EDUARDO B.;

RAINE, J. I.; FOREST, F. Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of Antarctica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 35, p. 10989-10994, 2015.

BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 360-376, 2011.

BECKER, D. E. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. **Anesthesia Progress**, v. 60, n. 1, p. 25-32 2013.

BHAGYASRI, Y.; LAVAKUMAR, V.; DIVYA SREE, M.S.; ASHOK KUMAR, C.K. An overview on anti-inflammatory activity of Indian herbal plants. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences**, v. 4, p. 1-9, 2015.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 12, p. 2080-2095, 2006.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammations: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v. 51, n. 6, p. 283-289, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. 2. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2015.

BRITO, T. V.; PRUDÊNCIO, R. S.; SALA, A. B.; JUNIOR, F. C. V.; CANDEIRA, S. J. N.; FRANCO A. X.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; SOUMA, M. H. L. P.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. N. P.; MEDEIROS, J. R.; BARBOSA, A. L. R. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 724-733, 2013.

BROK, P. M.; SCHMITZ, M. L.; KUNT, M.; ESCHER C.; HEINRICH M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-KappaB. **FEBS Letters**, v. 402, n. 1, p.85-90, 1997.

CAN, Z.; BALTAS, N.; KESKIN, S.; YILDIZ, O.; KOLAYH, S. Properties of antioxidant and anti-inflammatory activity and phenolic profiles of Şevketi Bostan (*Cnicus benedictus* L.)

Cultivated in Aegean Region from Turkey. **Turkish Journal of Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 308-314, 2017.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WASGSTAFF, C. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780-12805, 2013.

CHIBLI, L. A.; RODRIGUES, K. C.; GASPARETTO, C. M.; PINTO, N. C.; FABRI, R. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 330-338, 2014.

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. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1271-1278, 2003.

COLORADO, A.; SLAMA, J. T.; STAVINOHA, W. B. A new method for measuring auricular inflammation in the mouse. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 26, n. 1, p. 73-77, 1991.

CRIADO, P. R.; CRIADO, R. F. J.; MARUTA, C. W.; MACHADO FILHO, C. D´A. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

DAINICHI, T.; HANAKAWA, S.; KABASHIMA, K. Classification of inflammatory skin diseases: A proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, n. 2, p. 81-89, 2014.

DAWID-PAC´, R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 30, n. 3, p. 170-177, 2013.

DA SILVA, L. M.; FARIAS, J. A.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; BEBER, A. P.; CURY, B. J.; SANTIN, J. R.; ANDRADE, S. F. Hydroalcoholic extract from inflorescences of *Achyrocline satureioides* (Compositae) ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by attenuation in the production of inflammatory cytokines and oxidative mediators. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

DE OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; PIRES, M.G.; DA SILVA, G. L.; MANFREDINI, V.; VARGAS, C. R.; GNOATTO, S. C.; DE OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113-1123, 2012.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DELLA, P. C. S. P.; IWAMOTO, R. D.; ANTUNES, E.; BORGHI, A. A.; SAWAYA, A. C. H. F.; LANDUCCI, E. C. T. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 50-56, 2019.

DE SOUZA, K. C.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v.14, n. 2-3, p. 102-108, 2007.

DJAMILA, C.; AKYM, A.; FAIZA, M.; CHAHINEZ, B.; NACER-BEY N. Anatomical, phytochemical and pharmacological studies of roots of *Cnicus benedictus* L. **International Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 2, p. 204-208, 2013.

DONNARUMMA, G.; PAOLETTI, I.; BUOMMINO, E.; FUSCO, A.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; TUFANO, M. A.; BARONI, A. AV119, a natural sugar from avocado gratissima, modulates the LPS-induced proinflammatory response in human keratinocytes. **Inflammation**, v. 34, n. 6, p. 568-575, 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EREL, S. B.; KARAALP, C.; BEDIR, E.; KAEHLIG, H.; GLASL, S.; KHAN, S.; KRENN, L. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 8, p. 840–849, 2011.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v. 356, p. 1026-1030, 2017.

FERREIRA, F.S.; SARAIVA, B. R. A.; ARARUNA, M. K. A.; MENEZES, I. R. A.; COSTA J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 514–520, 2010.

FLORENTINO, I. F.; SILVA, D. P. B.; SILVA, D. M.; CARDOSO, C. S.; MOREIRA, A. L. E.; BORGES, C. L.; SOARES, C. M. A.; GALDINO, P. M.; LIÃO, L. M.; GHEDINI, P. C.; MEGENATTI, R.; COSTA, E. A. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 35-44, 2017.

FUNK, VICKI A.; SUSANNA, ALFONSO; STUESSY, TOD F.; BAYER, RANDALL J. **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae**. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, 2009. P. 171-189.

FÜRSTENBERGER, G.; CSUK-GLÄNZER, B. I.; MARKS, F.; KEPPLER, D. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 12, p. 2823-2827, 1994.

GÁBOR, M. Models of Acute Inflammation in the Ear. In: Winyard, P.G.; Willoughby, D.A. **Inflammation Protocols: Methods in Molecular Biology**, Humana Press, p. 129–137. 2003.

GABOR, M.; RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p.83-86, 1992.

GERRY, C. J.; SCHREIBER, S. L. Chemical probes and drug leads from advances in synthetic planning and methodology. **Natural Review Drug Discovery**, v.17, p. 333-352, 2018.

GHIASY-OSKOEAA, M.; AGHAALIKHANIA, M.; SEFIDKONB, F.; MOKHTASSI-BIDGOLIA, A.; AYYARIC, M. Blessed thistle agronomic and phytochemical response to nitrogen and plant density. **Industrial Crops & Products**, v.122, p. 566-573, 2018.

GIAMBANELLI, E.; D'ANTUONO, L. F.; FERIOLI, F.; FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZALEZ, R. Sesquiterpene lactones and inositol 4-hydroxyphenylacetic acid derivatives in wild edible leafy vegetables from Central Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.72, p.1-6, 2018.

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. **Analysis Biochemistry**, v.126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUPTA, P.; KUMAR, A.; SHARMA, N.; PATEL, M.; MAURYA, A.; SRIVASTAVA, S. A review on phytomedicines used in treatment of most common skin diseases. **Indian Journal of Drugs**, v. 5, n. 4, p. 150-164, 2017.

HAHNEL, E.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; KOTTNER, J. The epidemiology of skin conditions in the aged: A systematic review. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, p. 20-28, 2017.

HAMILTON, A. C. Medicinal plants, conservation and livelihoods. **Biodiversity and Conservation**, v.13, p. 1477- 1517, 2004.

HUANG, H.; LI, Y.; LIANG, J.; FINKELMAN, F. D. Molecular regulation of histamine synthesis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-7, 2018.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 4, p. 1614- 1620, 1993.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Involvement of substance P as a mediator in capsaicin-induced mouse ear oedema. **Inflammation Research**, v. 44, n.11, p. 470- 474, 1995.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, J. L.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p.2868-2885, 2007.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v.7, n.1, p. 1-7, 2017.

JEMIMA, E.A.; PREMA, A.; THANGAM, E. B. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. **Molecular Immunology**, v. 62, p. 19–28, 2014.

JÖHRER, K.; OBKIRCHER, M.; NEUREITER, D.; PARTELI, J.; ZELLE-RIESER, C.; MAIZNER, E.; KERN, J.; HERMANN, M.; HAMACHER, F.; MERKEL, O.; WACHT, N.; ZIDORN, C.; SCHEIDELER, M.; GREIL, R. Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 6, p. 681-693, 2012.

KATARIA, H. Phytochemical investigation of medicinal plant *Cnicus wallichii* and *Cnicus benedictus* L. **Asian Journal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 227-228, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 8 ed. Skokie: Saunders, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 16, 2013.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 211-222, 2004.

LACHANCE, H.; WETZEL, S.; KUMAR, K.; WALDMANN, H. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5989-6001, 2002.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution?. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n.2, p. 85-94, 2007.

LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator fo antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 310, n. 2 p. 175-183, 1979.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of pro inflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LOVECKA, P.; LIPOV, J.; THUMOVA, K.; MACURKOVA, A. Characterization of Biologically Active Substances from *Calendula officinalis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 14, p. 1167-1174, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MABONA, U; VUUREN, S. F. V. Southern African medicinal plants used to treat skin diseases. **South African Journal of Botany**, v. 87, p. 175-193, 2013.

MATRAN, R.; ALVING, K.; MARTLING, C. R.; LACROIX, J. S.; LUNDBERG, J. M. Effects of neuropeptides and capsaicin on tracheobronchial blood flow of the pig. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 135, n. 3 p. 335-342, 1989.

MEHTA, A. B.; NADKARNI, N.; PATIL, S. P.; GODSE, K. V.; GAUTAM, M.; AGARWAL, S. Topical corticosteroids in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 82, n. 4, p. 371-378, 2016.

MENDES, B. J.; ROCHA, M. A.; ARAÚJO, F. A.; MOURA, S. A. L.; FERREIRA, M. A. N. D.; ANDRADE, S. P. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvascular Research**, v.78, p. 265-271, 2009.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 1, p.115-130, 2002.

MIZUNO, H.; USUKI, T. Ionic liquid-assisted extraction and isolation of cynaropicrin and cnicin from Artichoke and Blessed thistle. **Chemistry Select**, v. 3, p. 1781-1786, 2018.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKADA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF- α) in phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced *in vivo* oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1769-1777, 2007.

MUTCHLER, S. M.; STRAUB, A. C. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. **Nitric Oxide**, v. 49, p. 8-15, 2015.

NESTLE, F. O.; MEGLIO, P. D.; QIN, J.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, 679-691, 2009.

NGUYEN, T.; FARALDOS, J. A.; VARDAKOU, M.; SALMON, M.; O'MAILLE, P. E.; RO, D. Discovery of germacrene A synthases in *Barnadesia spinosa*: The first committed step in sesquiterpene lactone biosynthesis in the basal member of the Asteraceae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 4, p. 622-627, 2016.

NOGUEIRA, N. P.; REIS, P. A.; LARANJA, G. A.; PINTO, A. C.; AIUB, C. A.; FELZENSZWALB, I.; PAES, M. C.; BASTOS, F. F.; BASTOS, V.L.; SABINO, K. C.; COELHO, M. G. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 513-522, 2011

OGUNTIBEJU, O. O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, p. 307-317, 2018.

O'NEILL, L. A. J. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 7, p. 549-463, 2006.

PAUL, E. L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; DE OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C. M.; MOREIRA, K. B.; NUNES, F. B.; GOSMANN, G.; DE OLIVEIRA, J. R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2009.

PANAGOULEAS, C.; SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; SKAL TSOUNIS, A. L.; SOKOVIC, M. Antifungal activity of secondary metabolites of *Centaurea raphanina* ssp. mixta, growing wild in Greece. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 4, p. 266-270, 2003.

PARENTE, L. M.; LINO, J. R. S., TRESVENZOL, L. M.; VINAUD, M. C.; DE PAULA, J. R.; PAULO, N. M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-Based Complementary and alternative medicine**, v. 2012, p. 7, 2012.

PENG, Y; JIANA, Y; ZULFIQARB, A; LI, B; ZHANGA, K; LONG, F; PENG, C; CAI, X; KHAN, I. A.; WANG, W. Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*. **Natural Product Research**, v. 31, n.19, p. 2211-2217, 2017.

PERASSOLO, M.; CARDILLO, A. B.; BUSTO, V. D.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. R.. Biosynthesis of sesquiterpene lactones in plants and metabolic engineering for their biotechnological production. In: SULSEN, V. P.; MARTINO, V. S. **Sesquiterpene Lactones: advances in their Chemistry and Biological Aspects**. Springer, cap. 4, p. 47-91, 2018.

PEREIRA, A. L. C.; BOLZANI, F. C. B., STEFANI, M.; CHARLÍN, R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 35, n. 1, p. 35-50, 2007.

PREETHI, K. C.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. **Indian Journal of Experiemantal Biology**, v. 47, n. 2, p. 113-120. 2009.

PUNGERÓ, V.; TURULL, A.; QUERALT, J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. **Inflammation**, v. 22, n. 3, p. 307-314, 1998.

RABELO, A. C. S.; COSTA, D. C.A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 296, p. 65-75, 2018.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal plants and the human needs. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-2, 2012.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids-mechanisms of action in health and disease. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15-31, 2016.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. Trad.: Raimundo Rodrigues Santos [et al]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAVI, R.; BEDI, A. NF- κ B in cancer—A friend turned foe. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 1, p. 53-67, 2004.

REUTER, S.; GUPTA S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p. 1603-1616, 2010.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

RODRIGUES, K.C.; CHIBLI, L. A.; SANTOS, B. C.; TEMPONI, V.S.; PINTO, N. C.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S., SOUSA, O.V. Evidence of bioactive compounds from *Vernonia polyanthes* leaves with topical anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1929, 2016.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SANTANA, J. D. G. **Investigação da atividade antibacteriana de extrato de lavagem foliar e do glaucilideo A de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. 109p.

SARGENT, M. G. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 476-481, 1987.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SECCO, D. D.; PARON, J. A.; OLIVEIRA, S. H. P.; FERREIRA S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, n. 3, p. 153-164, 2003.

SHEEHAN, M.; WONG, H. R.; HAKE, P. W.; MALHOTRA, V.; O'CONNOR, M.; ZINGARELLI, B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 953-963, 2002.

SIGMUNSDOTTIR, H. Improving topical treatments for skin diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 239-245, 2010.

SILVA, B. A. F.; COSTA, R. H. S.; FERNANDES, C. N.; LEITE, L. H. I.; RIBEIRO-FILHO, J.; GARCIA, T. R.; COUTINHO, H. D. M.; WANDERLEY, A. G.; MENEZES, I. R. A. HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v.119, p. 199-205, 2018.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129–151, 2015.

SLOTTA, U.; RÜTHER, L.; MEHRWALD, R.; RÖMER, L. Breathable shield against irritants – effective protection for stressed skin with functional silk polypeptides. **SOFW-Journal**, v. 141, n. 7, p. 26-31, 2015.

SOBREVIA, L.; OOI, L.; RYAN, S.; STEINERT, J. R. Nitric oxide: A regulator of cellular function in health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-2, 2016.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.

STAMATAS, G. N.; MORELLO, A. P.; MAYS, D. A. Early inflammatory processes in the skin. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 8, p. 1250-1269, 2013.

STEINHORN, B. S.; LOSCALZO, J.; MICHEL, T. Nitroglycerin and nitric oxide — A rondo of themes in cardiovascular therapeutics. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 277-280, 2015.

SZABÓ, I.; PALLAG, A.; BLIDAR, C-F. The antimicrobial activity of the *Cnicus benedictus* L. extracts. **Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie**, v. XVI, n. 1, p. 126-128, 2009.

SZOLCSÁNYI, J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. **Agents Actions**, v. 23, n. 1-2, p. 4-11, 1988

TAKAKI, E. Y.; MODESTO, M. S.; FIGUEIREDO, L. H. M. Proteção intelectual e análise de mercado da biodiversidade brasileira. **Revista Ciências Agrárias**, n. 48, p. 143-159, 2007.

TEMPONI, V.S.; SILVA, J.B.; ALVES, M.S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J.J.R.G.; YAMAMOTO, C.H.; PINTO, M.A.O.P.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O.V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3887–3899, 2012.

THANGAM, E. B.; JEMIMA, E. A.; SINGH, H.; BAIG, M. S.; KHAN, M.; MATHIAS, C. B.; CHURCH M. K.; SALUJA, R. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA-LOGGIA, R. The croton oil test revisited. **Agents Actions**, v. 17, p. 347-349, 1985.

ULBRICHT, C.; BASCH, E.; DACEY, C.; HAMMEMESS, P.; HASHMI, S.; SEAMON, E.; VORA, M.; WEISSNER, W. An evidence-based systematic review of blessed thistle (*Cnicus benedictus*) by the natural standard research collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 5, n. 4, 2008.

VOLLHARDT, K. P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: estrutura e função**. 4. ed. trad. Ricardo Bicca de Alencastro [et al]. Porto Alegre: Bookman, 2004.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p. 665-700, 2013.

WILMER, J. L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.102, n. 6, p. 915-922, 1994.

YAZDI, A. S.; RÖCKEN, M.; GHORESCHI, K. Cutaneous immunology: basics and new concepts. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 1, p. 3-10, 2016.